

**ADRIANA DELLA TORRE**

**“ÓLEO ESSENCIAL DE *BACCHARIS TRIMERA* (LESS.) DC.:  
ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS  
ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA E MUTAGÊNICA”**

**CAMPINAS  
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**ADRIANA DELLA TORRE**

**“Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC.: estudo fitoquímico e avaliação *in vitro* das atividades antiproliferativa e mutagênica”**

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata

**Adriana Della Torre**

  
e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

CAMPINAS,  
2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D38o Della Torre, Adriana, 1985-  
Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. : estudo fitoquímico e avaliação *in vitro* das atividades antiproliferativa e mutagênica / Adriana Della Torre. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Baccharis trimera*. 2. Células CHO. 3. Testes de mutagenicidade. 4. Óleo essencial. 5. Micronúcleo. I. Ruiz, Ana Lúcia Tasca Gois. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** *Baccharis trimera* (Less.) DC. essential oil : phytochemical study and *in vitro* evaluation of antiproliferative and mutagenic activities

**Palavras-chave em inglês:**

*Baccharis trimera*

CHO cells

Mutagenicity testing

Essential oil

Micronucleus

**Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

**Titulação:** Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

**Banca examinadora:**

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz [Orientador]

Patricia Santos Lopes

Mary Ann Foglio

**Data de defesa:** 28-06-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 28 de junho de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz (orientadora)



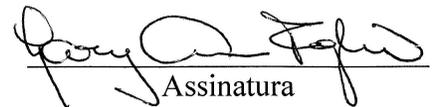
Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes



Assinatura

Dra. Mary Ann Foglio



Assinatura

Dra. Débora Barbosa Vendramini Costa

Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

*Dedico este trabalho a minha amada família, pelo constante apoio, incentivo, compreensão e carinho em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus pela vida, por ser minha Luz, força, meu conforto, por me mostrar novos caminhos e ter proporcionado ao longo dos anos o encontro com pessoas tão queridas e especiais.

Aos meus pais Osmar e Cecília, pelo amor e constante incentivo, pelos ensinamentos de vida, pela confiança e presença em todas as escolhas e momentos.

Aos meus irmãos Henrique e Bruna, pelo imprescindível apoio, pelos momentos divertidos e compreensão quando estive ausente.

À Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, minha querida orientadora, pela oportunidade, confiança em meu trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, conselhos e palavras de incentivo, enfim, pela paciência e carinho com os quais orientou este trabalho.

À Dra. Vera Lúcia Rehder e à mestranda Adriana da Silva Santos de Oliveira, da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (CPQBA/UNICAMP), pela colaboração e importantes contribuições na área fitoquímica.

Ao Dr. Ílio Montanari Jr., da Divisão de Agrotecnologia (CPQBA/UNICAMP), pelo auxílio na obtenção da planta e ensinamentos sobre a espécie vegetal estudada.

Ao Dr. João Ernesto Carvalho, coordenador da divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA/UNICAMP), pela receptividade e por disponibilizar a infraestrutura laboratorial para a realização dos experimentos *in vitro*.

À querida Sirlene, técnica da Divisão de Farmacologia e Toxicologia, pela eficiência, disposição, comprometimento em todas as atividades e por contribuir com valiosas sugestões e ensinamentos.

À Dra. Mary Ann Foglio (CPQBA/UNICAMP), ao Dr. Rodrigo Ramos Catharino (FCM/UNICAMP), à Dra. Cristina Pontes Vicente (IB/UNICAMP), à Dra. Patricia Santos Lopes (UNIFESP) e à Dra. Débora Barbosa Vendramini Costa (IQ/UNICAMP) pelas relevantes contribuições e sugestões apresentadas na análise prévia e na defesa da dissertação.

À Letícia, Brenda, Caroline, Suellem e Leandro, estagiários da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, pelo imprescindível apoio na coleta e processamento do material

vegetal; ao Lucas, Jéssica e Tatiane, estagiários da Divisão de Farmacologia e Toxicologia, pelo coleguismo e prontidão nas atividades laboratoriais.

Aos queridos amigos e colegas da Divisão de Farmacologia e Toxicologia e aos agregados: Larissa, Rafael, Paula Paiva, Giovanna Fiorito, Giovanna Longato, Paula Monteiro, Débora, Gabriela, Karin, Ana, Michelle, Vanessa, Tiago, Mariana, Humberto, Fabiana, Marianinha, Ícaro, Ricardo e a todos com os quais convivi durante o período de desenvolvimento do Mestrado, agradeço pelo acolhimento, sugestões, contribuições, enfim, pela harmoniosa e agradável convivência.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP), ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, pela estrutura e oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo nº 2011/03540-0) pela concessão das bolsas de Mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

---

A “carqueja”, *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), é uma espécie vegetal característica de regiões tropicais, muito utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, no tratamento de problemas hepáticos e renais, bem como para disfunções estomacais e intestinais. Recentemente, estudos demonstraram potencial atividade esquistossomicida sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (linhagem BH) para o óleo essencial (OE). Assim, este projeto teve por objetivo avaliar as atividades antiproliferativa e mutagênica, além da composição química do OE de *B. trimera* cultivada no campo experimental do CPQBA/UNICAMP. Coletas mensais (Janeiro/2012 a Dezembro/2012) das partes aéreas de *B. trimera* foram realizadas para a preparação do OE. Além disso, na época de floração em Julho, foram coletadas amostras das partes aéreas de indivíduos machos e fêmeas de *B. trimera*, diferenciadas morfologicamente pelas inflorescências. Todos os OEs preparados por hidrodestilação foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM) e avaliados quanto à atividade antiproliferativa *in vitro* e quanto à mutagenicidade no modelo de indução de micronúcleos com bloqueio da citocinese, com e sem ativação metabólica. A análise por CG/EM indicou que os compostos majoritários dos OEs foram biciclogermacreno, *E*-cariofileno, germacreno D,  $\beta$ -pineno, globulol,  $\beta$ -mirceno e  $\delta$ -cadineno. Também foi observada uma variação na proporção relativa dos compostos presentes nos OEs obtidos das plantas fêmeas em relação aos machos. No teste de atividade antiproliferativa, em linhagens tumorais e não-tumorais, observou-se um perfil de atividade citostática semelhante para todas as amostras, independente da época de coleta, com valores de GI<sub>50</sub> maiores que 25  $\mu$ g/mL. No teste do micronúcleo (MN) sem ativação metabólica, os OEs coletados no inverno (Jul/2012) e primavera (Out/2012) induziram um aumento na frequência de MNs, em relação ao controle de células sem tratamento, nas concentrações de 25 e 12,5  $\mu$ g/mL, enquanto os OEs obtidos no verão (Jan/2012) e outono (Abr/2012) apresentaram indução de MNs, estatisticamente significativa, somente na concentração de 25  $\mu$ g/mL. Nos experimentos realizados com os OEs extraídos de partes aéreas dos indivíduos machos e fêmeas, verificou-se que as plantas fêmeas não apresentaram potencial mutagênico nas três concentrações testadas (6,25; 12,5 e 25  $\mu$ g/mL), enquanto o OE obtido a partir dos indivíduos machos induziu aumento na frequência de MNs nas mesmas concentrações. Esses resultados sugerem que os sesquiterpenos hidrocarbonetos que predominam no OE obtido das partes aéreas das plantas machos (54,07%) podem estar envolvidos na ação mutagênica. Por outro lado, no teste com ativação metabólica, verificou-se uma redução significativa na frequência de MNs induzida pelos OEs em relação ao teste sem ativação, sugerindo que a metabolização dos OEs resultou em compostos com menor potencial mutagênico. Finalmente, no teste preliminar de antimutagenicidade, evidenciou-se no pós-tratamento e no tratamento simultâneo do OE com o metilmetanosulfonato uma possível reversão ou redução da clastogenicidade causada por este indutor de MNs. Esses dados sugerem possíveis atividades antimutagênica e mutagênica do OE das partes aéreas de *B. trimera*, com diferença significativa no potencial indutor de MNs entre indivíduos machos e fêmeas e que essa atividade é reduzida na presença de enzimas metabólicas, sugerindo uma potencial segurança de uso *in vivo*.

## ABSTRACT

---

“Carqueja”, *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) is a native species from tropical regions widely used in folk medicine as anti-inflammatory, to treat liver and kidney problems as well as stomach and intestinal disorders. Recent studies have demonstrated the potential of *B. trimera* essential oil (EO) as schistosomicidal on adult worms of *Schistosoma mansoni* (BH strain). Therefore, this project aimed the evaluation of chemical composition, antiproliferative and mutagenic activities of EO obtained from *B. trimera* aerial parts cultivated in CPQBA/UNICAMP experimental field. *B. trimera* aerial parts were collected monthly (January/2012 to December/2012) and immediately submitted to EO extraction by hydrodistillation. Moreover, samples of males and females of *B. trimera* aerial parts morphologically differentiated by inflorescences were collected during the flowering season (July/2012). All EOs were analyzed by gas chromatography coupled to mass detector (GC/MS). They were also evaluated for antiproliferative activity *in vitro* and mutagenicity in cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN), with and without metabolic activation. GC/MS analysis indicated that EOs major compounds were bicyclogermacrene, *E*-caryophyllene, germacrene D,  $\beta$ -pinene, globulol,  $\beta$ -myrcene and  $\delta$ -cadinene, besides a variation on relative proportion of compounds between EOs of female and male plants. Antiproliferative assay in tumor and non-tumor cell lines showed a similar cytostatic activity profile for all samples, independent of the collection time, with  $GI_{50}$  values above 25  $\mu\text{g/mL}$ . In CBMN assay without metabolic activation, EOs collected in winter (Jul/2012) and spring (Oct/2012) induced at 25 and 12.5  $\mu\text{g/mL}$  an increase in micronuclei frequency in comparison to untreated control cells, whereas EOs obtained in summer (Jan/2012) and autumn (Apr/2012) showed statistically significant micronuclei induction only at 25  $\mu\text{g/mL}$ . CBMN assay performed with male and female aerial parts EOs demonstrated that female plants showed no mutagenic potential in three concentrations (6.25, 12.5 and 25  $\mu\text{g/mL}$ ) whereas male aerial parts EO induced an increase in micronuclei frequency at the same concentrations. These results suggested that sesquiterpenes hydrocarbons predominately present in male aerial parts EO (54.07%) should be involved in mutagenic action. Moreover, there was a reduction in micronuclei frequency induced by EOs when CBMN assay was carried out with metabolic activation, which suggests that enzymatic metabolism of EOs resulted in compounds with low mutagenic potential. Finally, preliminary evaluation of antimutagenicity has evidenced that simultaneous and post treatments of EO with methylmetanesulfonate (MMS) could reverse and/or reduce clastogenicity caused by this inducer of MNs. These data suggest possible antimutagenic and mutagenic activities of aerial parts of *B. trimera* EO, with a significant difference in potential inducer of MNs between males and females plants. Moreover, mutagenic activity decreased in the presence of metabolic enzymes, suggesting a potential safe use *in vivo*.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> ... <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC .....	4
<b>Figura 2</b> Fotomicroscopia da linhagem celular CHO-K1, aumento de 100x.....	9
<b>Figura 3</b> Origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro .....	11
<b>Figura 4</b> Alterações que podem ser avaliadas pelo Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese .....	12
<b>Figura 5</b> Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de atividade antiproliferativa .....	19
<b>Figura 6</b> Processos de hipotonia, fixação e coloração das células CHO-K1 .....	22
<b>Figura 7</b> Esquema representativo das etapas do teste do micronúcleo anteriores ao processo de fixação.....	24
<b>Figura 8</b> Esquema representativo do processo de hipotonia, fixação e coloração das células CHO-K1. ....	25
<b>Figura 9</b> Esquema representativo do teste de antimutagenicidade.....	27
<b>Figura 10</b> Sistema para extração do óleo essencial .....	29
<b>Figura 11</b> Perfil do rendimento dos óleos essenciais em bases fresca e seca (% m/m) .....	30
<b>Figura 12</b> Perfil do teor de umidade (% m/m) das partes aéreas de <i>B. trimera</i> , coletadas no período de Janeiro a Dezembro de 2012, em comparação com o rendimento. ....	31
<b>Figura 13</b> Estrutura química dos compostos majoritários identificados no OE de <i>B. trimera</i> .....	34
<b>Figura 14</b> Grupos de compostos presentes nos óleos essenciais de <i>Baccharis trimera</i> .....	36

<b>Figura 15</b> Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento .....	38
<b>Figura 16</b> Fotomicrografias referentes aos tratamentos das células (CHO-K1) submetidas ao Teste do Micronúcleo.....	52
<b>Figura 17</b> Fotomicrografias das células (CHO-K1) submetidas ao Teste do Micronúcleo.....	54
<b>Figura 18</b> Incremento na indução de micronúcleos (%) em função das concentrações dos óleos essenciais.....	57
<b>Figura 19</b> Compostos identificados nos óleos essenciais de plantas fêmeas e machos .....	59
<b>Figura 20</b> Composição relativa (%) dos óleos essenciais obtidos a partir de plantas fêmeas e machos e da coleta mista realizada em Julho de 2012 .....	59
<b>Figura 21</b> Incremento de indução de micronúcleos (%) em função da época de coleta dos OEs na concentração de 25 µg/mL, nos experimentos com e sem S9 .....	62

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b>	Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas densidades de inoculação (DI). ....	18
<b>Tabela 2</b>	Valores referentes às massas de partes aéreas coletadas mensalmente, de óleos essenciais extraídos, bem como, os rendimentos em base seca e fresca e o teor de umidade.....	29
<b>Tabela 3</b>	Compostos identificados, por CG/EM, nos óleos essenciais das partes aéreas de <i>B. trimera</i> (Less.) DC. ....	33
<b>Tabela 4</b>	Composição dos óleos essenciais de <i>Baccharis trimera</i> por grupos de compostos.....	36
<b>Tabela 5</b>	Valores de TGI (em µg/mL) após o tratamento com o óleo essencial de <i>B. trimera</i> frente a linhagens tumorais e não-tumorais.....	48
<b>Tabela 6</b>	Valores de GI <sub>50</sub> (em µg/mL) após o tratamento com o óleo essencial de <i>B. trimera</i> frente às linhagens tumorais e não-tumorais. ....	49
<b>Tabela 7</b>	CBPI, RI e Frequência de micronúcleo (MN) das células tratadas com meio, DMSO e MMS, hipotonia com solução de citrato de sódio e de fixação com metanol:ácido acético 3:1.....	52
<b>Tabela 8</b>	CBPI, RI e Frequência de micronúcleo (MN) das células tratadas com meio, DMSO e MMS, hipotonia com solução de citrato de sódio +formaldeído 1% e fixação com metanol:ácido acético 3:1 .....	52
<b>Tabela 9</b>	CBPI, RI e Frequência de micronúcleos dos óleos essenciais de <i>B. trimera</i> no experimento sem ativação metabólica.....	56
<b>Tabela 10</b>	CBPI, RI e Frequência de micronúcleos dos óleos essenciais de <i>B. trimera</i> obtido das folhas de indivíduos machos e fêmeas .....	58
<b>Tabela 11</b>	CBPI, RI e Frequência de micronúcleos dos óleos essenciais de <i>B. trimera</i> , no experimento com ativação metabólica .....	62

<b>Tabela 12</b>	Comparação entre os valores representativos da frequência de MNs nos experimentos com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica S9 .....	63
<b>Tabela 13</b>	Teste de atividade antimutagênica com tratamento simultâneo (4 h).....	64
<b>Tabela 14</b>	Teste de atividade antimutagênica com pré e pós-tratamento (2 h + 2 h).....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

% m/m: porcentagem massa/massa

µg/mL: microgramas por mililitro

786-0: linhagem celular de adenocarcinoma de rim

ATCC: *American Type Culture Collection*

C: controle de células

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBMN: *Cytokinesis-Block Micronucleus Assay*

CBPI: *Cytokinesis-Block Proliferation Index*

CCD: Cromatografia de camada delgada

CG/EM: Cromatografia Gasosa acoplada a detector de massas

CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CHO-K1: *Chinese Hamster Ovary* (célula de ovário de *hamster* chinês)

Cit-B: Citocalasina B

CLS: *Cell Line Service*

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

CPA: Ciclofosfamida

CPMA: Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DI: densidade de inoculação

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECVAM: *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ESAC: *Scientific Advisory Committee*

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FOP: Faculdade de Odontologia de Piracicaba

GI<sub>50</sub>: *Growth Inhibition 50*

HaCaT: linhagem celular de queratinócito humano

HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal

IB: Instituto de Biologia

ICH: *International Conference on Harmonization*

IQ: Instituto de Química

IRR<sub>cal</sub>: Índice de Retenção Relativa calculada

IRR<sub>lit</sub>: Índice de Retenção Relativa descrito na literatura

K-562: linhagem celular de leucemia

MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MMS: Metilmetanosulfonato

MN(s): Micronúcleo(s)

NCI: *National Cancer Institute*

NCI-ADR/Res: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas

NCI-H460: linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células

OE: óleo essencial

OECD: *Organization for Economic Cooperation and Development*

OVCAR-3: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário

p/v: peso/volume

PBS: *Phosphate buffered saline* (solução salina tamponada)

PC-3: linhagem celular de adenocarcinoma de próstata

Querc.: quercetina

RI: *Replicative Index*

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

S9-: Sem Ativação Metabólica S9

S9+: Com Ativação Metabólica S9

SFB: Soro Fetal Bovino

SFTG: *Société Française de Toxicologie Génétique*

SRB: Sulforrodamina B

T: média das absorvâncias das células tratadas

T<sub>0</sub>: média das absorvâncias das células no tempo 0

TCA: Ácido Tricloroacético

TGI: *Total Growth Inhibition*

t<sub>r</sub>: tempo de retenção

U-251: linhagem celular de glioblastoma

UACC-62: linhagem celular de melanoma

UEL: Universidade Estadual de Londrina

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

v/v: volume/volume

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Plantas e a Fitoterapia .....	1
1.2. Família Asteraceae – Gênero <i>Baccharis</i> .....	2
1.2.1. <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. (Asteraceae) .....	3
1.3. Princípios de mutagênese .....	5
1.4. Toxicogenética e o sistema de cultura de células .....	7
1.5. Teste de Indução de Micronúcleo .....	10
1.5.1. Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN).....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. Geral.....	14
2.2. Específicos.....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. Material vegetal .....	15
3.2. Estudo fitoquímico .....	15
3.2.1. Obtenção do óleo essencial (OE) .....	15
3.2.2. Rendimento do OE (% m/m) e Teor de Umidade (% m/m) .....	16
3.2.3. Análise qualitativa por cromatografia a gás acoplada a detector de massas (CG/EM) .....	16
3.3. Análise Biológica em modelos <i>in vitro</i> .....	17
3.3.1. Cultivo celular.....	17
3.3.2. Atividade antiproliferativa em cultura de células .....	18
A. Preparo das suspensões celulares.....	18
B. Preparo e aplicação das amostras.....	19
C. Análise dos resultados .....	20
3.4. Teste de Indução de Micronúcleo <i>in vitro</i> .....	21
3.4.1. Padronização das condições experimentais .....	21

3.4.2. Avaliação da mutagenicidade dos óleos essenciais .....	24
A. Experimento sem ativação metabólica (S9-) .....	25
B. Experimento com ativação metabólica (S9+) .....	26
3.4.3. Testes iniciais de antimutagenicidade .....	26
3.4.4. Análise dos resultados de indução de micronúcleo .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1. Rendimento do OE e Teor de Umidade .....	29
4.2. Análise fitoquímica do OE por CG-EM .....	32
4.3. Atividade antiproliferativa em cultura de células .....	37
4.4. Teste de Indução de Micronúcleo .....	51
4.4.1. Padronização das condições experimentais .....	51
4.4.2. Avaliação do potencial mutagênico dos óleos essenciais .....	55
A. Experimento sem ativação metabólica S9 .....	55
B. Experimento com ativação metabólica S9 .....	61
4.4.3. Teste de antimutagenicidade .....	64
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
ANEXO 1 - Cromatogramas dos óleos essenciais de <i>Baccharis trimera</i> , obtidos por CG/EM .....	85
ANEXO 2 - Certificado de Registro no Cadastro Nacional de Biodiversidade .....	90
ANEXO 3 – Aprovação do relatório referente à autorização de acesso ao patrimônio genético .....	92

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Plantas e a Fitoterapia

O uso de plantas com fins terapêuticos constitui uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade e está descrito em relatos das antigas civilizações, seja para tratamento, cura ou prevenção de doenças (Pezzuto, 1997; Calixto, 2000; Gurib-Fakim, 2006). O emprego correto das plantas pela população requer o uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêutica, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais (Lorenzi e Matos, 2002; Veiga Jr. *et al.*, 2005).

O interesse pelas plantas medicinais tem aumentado o volume de investigações científicas sobre seus efeitos biológicos em seres humanos e animais (Veiga Jr. *et al.*, 2005). Assim, o potencial das plantas como fonte de novas drogas oferece grande campo para investigação científica uma vez que, das cerca de 250.000 a 500.000 espécies conhecidas, apenas uma fração destas já foi avaliada quanto ao potencial farmacológico (Rates, 2001; Robotin, 2011). Essa pequena fração mostrou-se uma rica fonte, pois, segundo Cragg e Newman (2012), do total de fármacos introduzidos na terapêutica no período de 1981-2010, 75% são ou produtos naturais *per si* ou compostos, sintéticos ou semissintéticos, baseados em produtos naturais.

Um dos motivos que faz dos produtos naturais fontes ricas de compostos com potencial terapêutico é que grande parte deles são metabólitos secundários produzidos por organismos para defesa contra predação e também para comunicação, sendo muitas vezes tóxicos e, portanto, com potenciais antiproliferativos ou irritativos (Cragg *et al.*, 2009). Outra característica desses metabólitos secundários é que, em geral, são evolutivamente selecionados para se ligarem a macromoléculas representando, portanto, estruturas privilegiadas que são excelentes moldes para a síntese de novas moléculas (Denny, 2002). Nesse sentido, estudos de relação estrutura-atividade são realizados para aperfeiçoar a produção dessas novas moléculas (Cragg *et al.*, 2009).

Os produtos naturais constituem uma promissora fonte de compostos químicos, que podem ou não ter ações sinérgicas ou antagônicas. Muitas plantas contêm substâncias que podem atuar como mutagênicos ou carcinogênicos naturais (Schimmer e Kühne, 1990). Assim, antes de disseminar o uso de ervas com efeitos medicinais, amplos estudos devem ser realizados a fim de evitar riscos adicionais à saúde humana (Manteiga *et al.*, 1997). A avaliação do risco/benefício é

a finalidade dos estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. De maneira geral, vários estudos são realizados para comprovar a ação farmacológica de plantas, porém, poucos são realizados para a verificação da toxicidade (Fonseca e Pereira, 2004; Alonso, 2008; Costa *et al.*, 2008; Horn e Vargas, 2008).

Ribeiro *et al.* (2003) constataram um aumento nas taxas de mutação devido à utilização constante de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos dentre outros. Nos extratos naturais, a diversidade química é abundante e cada uma destas moléculas pode apresentar atividades mutagênica, teratogênica e/ou carcinogênica nos sistemas testados. Evidências dos efeitos deletérios de extratos de plantas sobre os sistemas biológicos foram relatados por Santos *et al.* (2008). Os autores ressaltam a importância de estudos que abordam efeitos genotóxicos e toxicológicos de compostos terapêuticos, uma vez que componentes genotóxicos podem intercalar com a molécula de DNA, provocando danos genéticos no controle do ciclo celular e nos processos de morte celular, acelerando processos neoplásicos.

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies vegetais localizadas em diferentes regiões, resultando em ecossistemas diversos como a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, o Cerrado, a Caatinga, o Pantanal e os Pampas. Na busca de novos fármacos anticâncer, o laboratório de cultura de células da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, através de projetos financiados pelo CNPq (630009/95-3), FAPESP (95/09607-5) e verbas obtidas com a prestação de serviços, implantou um teste de atividade antiproliferativa *in vitro*, baseado no experimento desenvolvido pelo *National Cancer Institute* (NCI) (Rubinstein *et al.*, 1990; Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991), em um painel de dez linhagens tumorais humanas (nove tumores sólidos e uma leucemia) que vem sendo utilizado para triagem da atividade antiproliferativa de amostras obtidas a partir de extratos vegetais e de síntese orgânica (Kohn *et al.*, 2006; Denny *et al.*, 2007; Denny *et al.*, 2008; Sacoman *et al.*, 2008; Spindola *et al.*, 2009; Vendramini-Costa *et al.*, 2010; Longato *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011).

## **1.2. Família Asteraceae - Gênero *Baccharis***

Expressiva em número de espécies, a família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies.

Em sua quase totalidade, os gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte que são encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Cancelli *et al.*, 2007).

O gênero *Baccharis*, incluído na tribo Astereae da família Asteraceae, está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. As espécies do gênero *Baccharis* são, no geral, arbustos que medem em média de 0,5 a 4,0 m de altura. Apresentam elevado valor sócio-econômico e, em geral, são consumidas principalmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas como remédio para o processo de desintoxicação do organismo (Korbes, 1995; Verdi *et al.*, 2005).

#### **1.2.1. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae)**

De acordo com Lorenzi e Matos (2002), a espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC., conhecida como carqueja (Figura 1) é amplamente utilizada no Brasil, em medicina popular, hábito herdado de indígenas que há séculos a utilizavam para o tratamento de várias doenças. O primeiro registro escrito do uso da carqueja no país é de 1931, empregada na forma de infusão das folhas e ramos para o tratamento da esterilidade feminina e da impotência masculina, atribuindo-lhe ainda propriedades tônicas, febrífugas e estomáquicas (Corrêa 1931; Lorenzi e Matos, 2002).

Tradicionalmente, *Baccharis trimera* é administrada sob a forma de infusão das partes aéreas e utilizada como analgésica, diurética e para doenças renais, estomacais e intestinais, assim como em feridas e ulcerações (Pavan, 1952; Soicke e Leng-Peschlow, 1987; Pedrazzi *et al.*, 1997; Di Stasi *et al.*, 2002; Ladeira, 2002; Agra *et al.*, 2007; Biavatti *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2008; Fachinetto e Tedesco, 2009; Pádua *et al.*, 2010; Biondo *et al.*, 2011), para o tratamento de reumatismo (Nakasugi e Komai, 1998) e, também, em casos de hipertensão e diabetes (Di Stasi *et al.*, 2002). A planta ainda é utilizada como aperiente e contra anemia, obesidade e gota (Martins *et al.*, 1995; Mors *et al.*, 2000; Ladeira, 2002; Dickel *et al.*, 2007).

**Figura 1:** *Baccharis trimera* (Less.) DC.



(A) *Baccharis trimera* (Less.) DC - Cultivar CPQBA 1, (B) período de florescimento, (C) e (D) detalhes da inflorescência dos indivíduos fêmeas e machos, respectivamente.

As diferentes propriedades atribuídas à carqueja na medicina tradicional vêm sendo estudadas e algumas foram validadas (Lorenzi e Matos 2002). Vários trabalhos descreveram os efeitos hepatoprotetor do extrato acetato de etila (Soicke e Leng-Peschlow, 1987), vasorelaxante sobre musculatura lisa para diterpenos isolados do extrato clorofórmico (Torres *et al.*, 2000), além de moderada atividade antioxidante para o extrato hidroalcoólico (Mendes *et al.*, 2007; Pádua *et al.*, 2010). Bara e Vanetti (1998) comprovaram que extratos alcoólicos de carqueja têm potencial antimicrobiano e Avancini *et al.* (2000) confirmaram essa atividade *in vitro* a partir do decocto de plantas de *B. trimera*.

As propriedades digestiva, antiúlcera e antiácida foram validadas em estudos com cobaias, em que foi mostrado que os extratos da planta reduziram a secreção gástrica (Biondo *et al.*, 2011) e tiveram efeito analgésico (Gamberini *et al.*, 1991) e anti-inflamatório (Gené *et al.*, 1992; Gené *et al.*, 1996). A confirmação do efeito hipoglicemiante foi feita com extratos de *B. trimera* nos estudos de Oliveira *et al.* (2005). A atividade esquistossomicida (*Schistosoma mansoni*, linhagem BH) para o óleo essencial (Oliveira *et al.*, 2012) também foi recentemente relatada. Além disso, Nakasugi e Komai (1998) descreveram os efeitos antimutagênicos do extrato metanólico de *B. trimera* no teste de Ames, enquanto Fachinetti e Tedesco (2009) e Pinho e colaboradores (2010) relataram efeitos mutagênicos para a infusão das partes aéreas de *B. trimera* no experimento com *Allium cepa*.

### **1.3. Princípios de mutagênese**

A mutação é a principal fonte de toda a variação genética e é fundamental para o processo evolutivo. Sem as mutações não há variabilidade genética e, assim, não há evolução (Snustad e Simmons, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003). Apesar dessa grande relevância evolutiva, a maioria das mutações pode ter efeitos prejudiciais, incluindo malformações, desenvolvimento de câncer, envelhecimento e morte (Erdtmann, 2003).

Kirsch-Volders *et al.* (2002) classificam as mutações em três níveis, a saber, as mutações gênicas; as aberrações cromossômicas estruturais, como as deleções, duplicações, inversões e translocações; e as aberrações cromossômicas numéricas, como as aneuploidias e euploidias.

Os agentes mutagênicos que causam danos no DNA podem ser classificados como aqueles que atuam diretamente sobre a molécula; agentes indiretos, que precisam ser metabolizados para que seus metabólitos causem danos; os que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio e aqueles que causam inibição no reparo e na síntese do DNA (Lee e Steinert, 2003). Agentes que interagem com o DNA e/ou com seus componentes celulares (fibras do fuso) e enzimas (topoisomerasas) são conhecidos como genotóxicos. Assim, a genotoxicidade refere-se à capacidade de tais agentes causarem lesões genômicas que são passíveis de correção por vias de reparo do DNA nas células. No entanto, a mutagenicidade é uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (Dearfield *et al.*, 2002).

Viver em ambiente aeróbico faz com que todos os organismos vivos estejam contínua e inevitavelmente expostos a espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Essas espécies podem ter origem endógena, como subprodutos dos processos metabólicos aeróbicos, ou exógena, quando as células são expostas a alguma injúria ambiental (Martindale e Holbrook, 2002). As espécies reativas reagem com DNA, proteínas intracelulares e lipídeos das membranas danificando essas estruturas e, conseqüentemente, as células (Valko *et al.*, 2007).

No caso do câncer, o processo de carcinogênese envolve três etapas, a saber, iniciação, promoção e progressão. Assim, agentes quimiopreventivos podem prevenir a ocorrência de mutação no DNA, agindo sobre a fase de iniciação e, com isso, reduzir o risco de ocorrência de lesões neoplásicas. Já os compostos com ação sobre proliferação celular, diferenciação e apoptose apresentarão efeitos sobre as etapas de promoção e progressão da carcinogênese (Chen e Kong, 2004).

Além de fonte de novos fármacos, as plantas podem ser grandes aliadas na prevenção do surgimento do câncer e essa ação parece relacionar-se com diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, imunomodulação e capacidade antioxidante (Tsuda *et al.*, 2004). Apesar de ampla utilização dos produtos naturais, pouca informação encontra-se disponível sobre os constituintes de tais extratos, bem como sobre os riscos oferecidos à saúde humana. Assim, estudos *in vitro* e *in vivo* acerca da genotoxicidade e mutagenicidade de plantas medicinais têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse de comprovação da eficácia das mesmas nas mais diversas finalidades farmacológicas (Della Torre *et al.*, 2011; Esteves-Pedro *et al.*, 2011; Serpeloni *et al.*, 2011; Cariddi *et al.*, 2012; Esteves-Pedro *et al.*, 2012; Raymundo *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2012; dos Santos *et al.*, 2013; Rebouças *et al.*, 2013).

Embora não seja medida de carcinogenicidade, a mutagenicidade é frequentemente associada ao aparecimento do câncer (Azevedo *et al.*, 2003). A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (Kanai, 2008). A literatura tem mostrado que mutações em vários genes (proto-oncogenes e genes supressores) podem ser encontradas nas neoplasias (Wenzel e Röthlisberger, 2008). O aumento de danos no DNA, quebras ou perdas cromossômicas

são importantes fatores para o desenvolvimento de muitos tipos de câncer (Hagmar *et al.*, 1998; Bonassi *et al.*, 2000).

O processo de carcinogênese é resultante do acúmulo de lesões genéticas (Diaz, 2005) e as alterações genéticas no câncer mais importantes ocorrem nos genes que controlam a proliferação celular, resultando em um crescimento descontrolado característico de uma célula maligna. Além disso, há ainda o descontrole dos genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, que quando inativos, podem elevar a taxa de mutação das células, acelerando ainda mais o acúmulo de alterações moleculares importantes (Ojopi e Neto, 2004).

Desse modo, estudos para detecção e avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos de compostos de origem vegetal e o entendimento dos benefícios e potencial toxicidade dessas plantas à saúde, são de fundamental importância para reduzir os possíveis riscos desses agentes e aumentar a segurança do uso feito pela população das plantas medicinais (Bast *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003). Assim, tanto nos modelos *in vivo* como *in vitro* podemos listar vantagens e desvantagens, porém, ambos são necessários quando se pretende comprovar a ação farmacológica e toxicológica de um determinado extrato e/ou princípio ativo e, sobretudo, para elucidar o mecanismo de ação de extratos totais ou de princípios ativos isolados de plantas (Calixto, 2000).

#### **1.4. Toxicogenética e o sistema de cultura de células**

Para garantir a segurança terapêutica de um agente farmacológico, natural ou sintético, deve ser comprovado por meio de estudos farmacológicos, histopatológicos e toxicológicos que o seu uso não seja nocivo à saúde humana, sendo então necessária a avaliação da possível atividade genotóxica e/ou mutagênica deste agente. Esta prática é de especial importância no caso de produtos derivados das plantas medicinais, pois estas sintetizam substâncias tóxicas que, na natureza, possuem o papel de defesa frente a outros agentes patogênicos (Kricher, 1997). Além disso, as plantas contêm inúmeros constituintes em seus extratos que, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes (Maciel *et al.*, 2002). A fitoterapia deve, então, ser acompanhada de estudos científicos que correlacionem pesquisas de qualidade, eficácia e segurança (Khan, 2006).

Devido à importância de se assegurar a integridade genética aos organismos, a área da genética toxicológica ou toxicogenética vem ganhando destaque. A Genética Toxicológica é uma das áreas da ciência que tem se dedicado à pesquisa das propriedades genotóxicas e mutagênicas de agentes aos quais os organismos estão expostos, fazendo uso de diversos testes que avaliam o dano que estes podem vir a causar ao DNA na presença ou ausência de sistemas de metabolização (Vogel, 1987). Alterações no DNA ou no RNA que afetam o gene, qualitativa ou quantitativamente, são consideradas mutações e podem ser transmitidas aos descendentes, gerando indivíduos geneticamente diferentes (Fonseca e Pereira, 2004).

Os testes citogenéticos *in vitro* e *in vivo*, juntamente com os testes de mutação gênica em bactérias (teste de Ames) e em células de mamíferos têm fornecido informações primárias fundamentais para o estabelecimento do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos, bem como do potencial antimutagênico de muitos compostos naturais. O estudo de danos no DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da Genética Toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese (Albertini *et al.*, 2000).

O potencial mutagênico de xenobióticos pode ser avaliado através de testes *in vitro* desde que obedecem a critérios básicos, tais como, sensibilidade para revelar com facilidade e precisão estatística mesmo um pequeno defeito mutagênico, aliada à reprodutibilidade e capacidade para avaliar eventos genéticos que possam estar diretamente relacionados ao homem, fornecendo um dos parâmetros para o cálculo de risco ou nível de segurança para a população exposta (Rabello-Gay *et al.*, 1991). Vários métodos para detecção de mutações são utilizados e, dependendo da finalidade do estudo, do tipo de material a ser avaliado, do nível de informação que se deseja obter e das condições laboratoriais existentes, determina-se qual o sistema-teste e parâmetro a ser avaliado são os mais adequados.

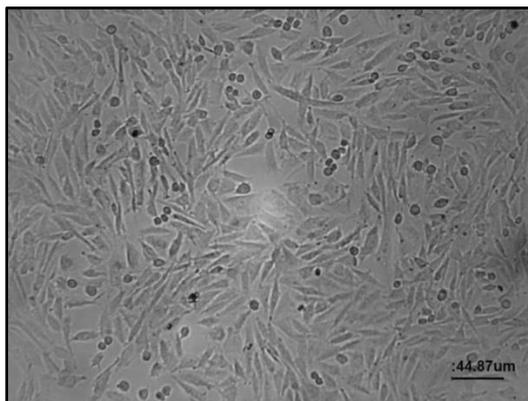
Os experimentos com cultura de células constituem uma importante ferramenta de investigação básica, servindo a diversas áreas de investigação, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia *in vitro* (Lewinska *et al.*, 2007). Testes com cultura de células de mamíferos apresentam várias vantagens, tais como, facilidade para padronizar as condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional); possibilidade de tratamento das células em várias fases do ciclo celular; economia, rapidez e boa reprodutibilidade; organização dos cromossomos e do DNA igual às células *in vivo* (Rabello-Gay

*et al.*, 1991), além de eficiência estatística, uma vez que o número de células analisadas é maior em relação a outros testes.

A maior desvantagem de experimentos em células de cultura é que a maioria das linhagens celulares não tem capacidade de metabolização de drogas, necessitando da adição de um sistema exógeno de metabolização como a fração S9 (Preston, 1997). No entanto, segundo Kuroda *et al.* (1992), embora os experimentos com animais reproduzam com maior semelhança as condições humanas, os sistemas *in vitro* têm se mostrado eficazes na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos. Botham (2004) sugere a utilização de testes *in vitro* como suplementos a testes *in vivo*, indicando uma melhor seleção de dose a ser testada e reduzindo o número de animais a serem utilizados.

Na tentativa de padronizar esses testes, diversos sistemas de células têm sido utilizados. Conforme Gebhart (1992), células de mamíferos são classicamente conhecidas e utilizadas para estudos de mutagênese e antimutagênese, tais como as linhagens CHO (células de ovário de *hamster* chinês) (Figura 2), V79 (células do pulmão de *hamster* chinês) e DON (células do rim de *hamster* chinês). Células humanas do tipo linfócitos do sangue periférico, fibroblastos primários, células de hepatoma, entre outras, também são difundidas em testes *in vitro*. As citadas inicialmente apresentam algumas vantagens, tais como: facilidade de manipulação e crescimento durante o cultivo, pequeno número cromossômico, ciclo celular curto (10 a 14 horas, aproximadamente), fornecem uma alta frequência de metáfases analisáveis e são bem caracterizadas quanto ao cariótipo (Preston *et al.*, 1987; Kuroda *et al.*, 1992; Doyle e Griffiths, 1998).

**Figura 2:** Fotomicroscopia da linhagem celular CHO-K1, aumento de 100x.



Sistemas apropriados de avaliação da genotoxicidade de novos agentes químicos, bem como modelos de protocolos, têm sido frequentemente determinados pelas diretrizes regulatórias internacionais. Um grande progresso tem sido obtido na tentativa de se padronizar os protocolos para testes de genotoxicidade, particularmente por esforços da *International Conference on Harmonization (ICH)*, e da *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)* (Ribeiro *et al.*, 2003).

### **1.5. Teste de Indução de Micronúcleo**

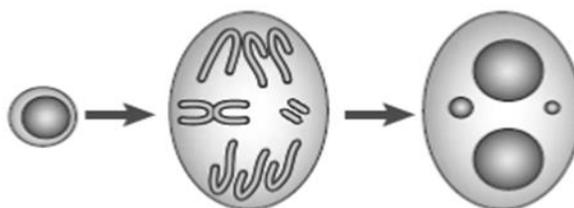
Nas técnicas clássicas de citogenética, os cromossomos são estudados diretamente pela observação e quantificação de aberrações em metáfases. Assim, a citogenética clássica fornece informações detalhadas nas análises, porém, a complexidade e o dispendioso trabalho laboratorial enumerando as aberrações nas anáfases e o efeito dos artefatos da técnica estimularam o desenvolvimento de outros métodos para determinação dos danos cromossômicos (Fenech, 2000).

Uma alternativa mais simples às técnicas da citogenética clássica foi proposta por Schmid (1975) e Heddle *et al.* (1978) avaliando os danos cromossômicos pela quantificação de micronúcleos. O teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea e do sangue periférico é um dos mais eficientes testes citogenéticos na área de toxicologia genética (Fenech, 2000). Entre os testes de aberração cromossômica e o teste de micronúcleo *in vitro*, há um nível de concordância de 80 a 90% (Lorge *et al.*, 2006). Além disso, o teste do micronúcleo oferece vantagens em relação aos testes cromossômicos por ser uma metodologia simples e mais rápida, aplicável em vários tipos celulares, permite contagem de maior número de células, conferindo maior poder estatístico e detecção de agentes aneugênicos não detectados pelo outro método (Diaz *et al.*, 2007).

Os micronúcleos (MNs) são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas. Originam-se de fragmentos cromossômicos, resultantes de lesões/aductos ao nível do DNA ou cromossomos (efeito clastogênico), ou cromossomos inteiros que não se ligaram às fibras do fuso e não foram incluídos nos núcleos filhos principais durante a divisão nuclear, em consequência de lesões ao nível de proteínas envolvidas na segregação cromossômica, ou seja, por uma disfunção do

aparato mitótico (efeito aneugênico) (Figura 3). Assim, a quantificação de MNs é um valioso e confiável índice de quebras e/ou perdas cromossômicas, sendo essencial na composição da bateria de testes de genotoxicidade, emergindo como um dos métodos recomendados para avaliação dos danos cromossomais (Heddle e Carrano, 1977; Viaggi *et al.*, 1987; Albertini *et al.*, 2000; Fenech, 2000; Majer *et al.*, 2001; Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Fenech, 2005; Mateuca *et al.*, 2006; OECD 487, 2010; Samanta e Dey, 2010).

**Figura 3:** Origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (Fenech, 2007).



Com relação ao teste de indução de micronúcleo *in vitro*, inúmeros trabalhos corroboram a robustez e aplicabilidade do teste em vários tipos celulares, na presença ou ausência de citocalasina B (Zhang *et al.*, 1995; Albertini *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998; Kalweit *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 1999; Matsushima *et al.*, 1999; von der Hude *et al.*, 2000; Garriott *et al.*, 2002; Elhajouji e Lorge, 2006; Kirkland, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011; Honma e Hayashi, 2011). Além disso, há estudos de validação internacional coordenados pela *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (Aardema *et al.*, 2006; Clare *et al.*, 2006; Lorge *et al.*, 2006; Oliver *et al.*, 2006; Wakata *et al.*, 2006) e os relatórios da *International Workshop on Genotoxicity Testing* (Kirsch-Volders *et al.*, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Os dados disponíveis também têm sido reavaliados pela *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) e o método do teste foi aprovado como cientificamente válido pela *Scientific Advisory Committee* (ESAC) (ECVAM, 2006; ESAC, 2006; Corvi *et al.*, 2008).

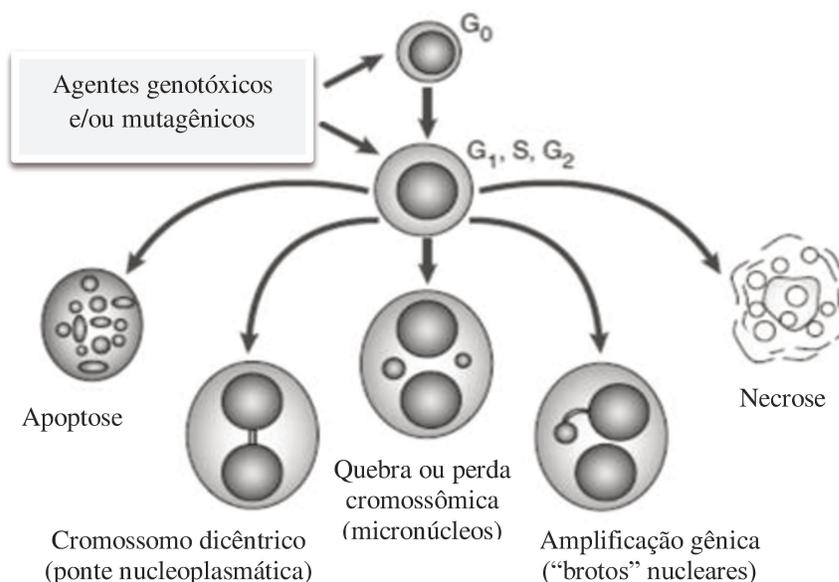
### **1.5.1. Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN)**

Os MNs são expressos em células que completaram a divisão nuclear, portanto, devem ser quantificados no estágio binucleado do ciclo celular. Assim, é importante identificar as células

que completaram uma divisão nuclear, e o método de escolha para tal no teste do micronúcleo é o bloqueio da citocinese. Nesse método, o bloqueio da citocinese acontece pela adição de citocalasina B (Cit-B), e as células que completaram uma divisão nuclear podem ser identificadas pela sua aparência. A Cit-B é isolada do fungo *Helminthosporium dermatoidium* e atua bloqueando a citocinese por ser um potente inibidor da polimerização de microfilamentos de actina na placa equatorial formada no final da telófase, observando-se uma cariocinese com ausência de citocinese (Falck *et al.*, 1997; Fenech e Crott, 2002).

Esse método foi inicialmente desenvolvido para cultura de células de linfócitos humanos, mas tem sido adaptado para aplicação em vários tipos celulares (Fenech, 2000). Adicionalmente, o teste de MN com bloqueio da citocinese permite a avaliação de toxicidade celular ou atraso no ciclo celular por meio da determinação da proliferação pós bloqueio da citocinese (CBPI) proposto por Surrallés *et al.* (1995), além de ser usado para avaliar pontes nucleoplasmáticas, brotamentos nucleares, morte celular (necrose ou apoptose) e taxa de divisão nuclear, através da contagem de células mono, bi e multinucleadas (Fenech, 2006 e 2007) (Figura 4).

**Figura 4:** Alterações que podem ser avaliadas pelo Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (Fenech, 2007).



Este teste apresenta algumas vantagens e desvantagens. As vantagens incluem sensibilidade e precisão, baixo custo e detecção de perda cromossômica (Fenech, 1997). As desvantagens se referem à necessidade de divisão celular para a análise de MN, já que esta técnica só é efetiva em populações de células em constante divisão; a citocalasina B pode causar interferência na detecção de compostos que podem inibir a citocinese ou a polimerização dos filamentos de actina (Ribeiro *et al.*, 2003), além do teste não fornecer informações sobre os tipos de aberrações cromossômicas estruturais ocorridas (Corvi *et al.*, 2008).

Tendo em vista o potencial uso medicinal do óleo essencial de *B. trimera*, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial mutagênico do óleo essencial da carqueja através do modelo de indução de micronúcleo *in vitro*, além do estudo fitoquímico, buscando correlacionar a composição química com as atividades observadas, contribuindo assim para o conhecimento da atividade farmacológica e de segurança para uso medicinal de *B. trimera*.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Geral

- Estudo fitoquímico e avaliação preliminar *in vitro* da segurança do óleo essencial da espécie *Baccharis trimera*.

### 2.2. Específicos

- Extração do óleo essencial de *B. trimera* e análise da composição de compostos voláteis;
- Monitoramento sazonal das amostras no período de Janeiro a Dezembro de 2012;
- Implantação do teste de indução de micronúcleos em cultura de células;
- Avaliação do óleo essencial quanto à atividade antiproliferativa frente a um painel de linhagens tumorais humanas;
  - Avaliação da mutagenicidade do óleo essencial frente à linhagem celular CHO-K1, em experimentos com e sem ativação metabólica;
  - Avaliação preliminar de antimutagenicidade do óleo essencial;
  - Correlação entre as atividades observadas e a composição de voláteis.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1. Material Vegetal

A coleta das partes aéreas de *B. trimera* foi realizada na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em Paulínia, São Paulo, pertencente à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A identificação botânica foi realizada pelo Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo, e a exsicata está depositada sob o número 1286 no herbário do CPQBA. As atividades foram supervisionadas pelo Dr. Ílio Montanari Jr., pesquisador da Divisão de Agrotecnologia, do CPQBA/UNICAMP.

Por se tratar de uma espécie nativa, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), nos termos Deliberação 246/2009, emitiu autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, com a finalidade de pesquisa científica, viabilizando os estudos propostos com a espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC (Processo 010021/2012-4).

#### 3.2. Estudo Fitoquímico

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, coordenadora da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, do CPQBA/UNICAMP, e a mestranda Adriana da Silva Santos de Oliveira (IQ/UNICAMP).

##### 3.2.1. Obtenção do óleo essencial (OE)

Cerca de 2 a 3 kg de partes aéreas foram coletados mensalmente, de Jan/2012 a Dez/2012, sempre no início de cada mês, em coletas realizadas no período matutino (9:00 – 10:00 horas). As folhas frescas foram picadas, acondicionadas em três balões (aproximadamente 1 kg/balão) com 3,5 litros de água destilada e submetidas à hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, por um período de 3 horas. Os OEs obtidos foram reunidos, pesados, separados em alíquotas e conservados em freezer (-20°C) até o momento das análises química e biológica.

### 3.2.2. Rendimento do OE (% m/m) e Teor de Umidade (% m/m)

Uma alíquota das folhas picadas foi distribuída em duas bandejas (aproximadamente 100 g/bandeja) e levada para estufa de secagem a 40°C, por 48 horas, para análise do teor de umidade e cálculo do rendimento do OE em base seca.

### 3.2.3. Análise qualitativa por cromatografia a gás acoplada a detector de massas (CG/EM)

Alíquotas dos OEs (20 mg), obtidos de Janeiro/12 a Dezembro/12, foram previamente diluídas em acetato de etila (1 mL). A análise dos constituintes voláteis foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 220°C, coluna = 60°C, taxa de aquecimento de 3°C·min<sup>-1</sup> até 240°C e detector = 250°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Detetor seletivo de massas operando a 70 eV, m/z = 30 a 500 u.m.a.

A identificação dos constituintes químicos foi feita através da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com a biblioteca eletrônica do sistema CG/EM (NIST-05, Versão 2.0), com dados da literatura (Adams, 2007) e dos índices de retenção dos analitos calculados pela co-injeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos (C-8 a C-22), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Van Den Dool e Kratz, 1963).

$$IRR = 100i \left( \frac{Tr_{(x)} - Tr_{(C_{n-1})}}{Tr_{(C_n)} - Tr_{(C_{n-1})}} \right) + 100C_{(n-1)}$$

Onde:

IRR = Índice de Retenção Relativa;

Tr<sub>(x)</sub> = tempo de retenção da amostra;

Tr<sub>(C<sub>n-1</sub>)</sub> = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto (x);

Tr<sub>(C<sub>n</sub>)</sub> = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto (x);

i = diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem depois e antes;

C<sub>(n-1)</sub> = número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto (x).

### **3.3. Análise Biológica em modelos *in vitro***

A fim de evitar contaminação e garantir a viabilidade celular, os testes foram realizados sob condições assépticas em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, utilizando materiais e reagentes esterilizados de acordo com a natureza de cada um.

As linhagens tumorais humanas foram cedidas pelo NCI (*National Cancer Institute*), Frederick-MA, EUA. Já as linhagens celulares de queratinócito humano (HaCaT, CLS Cell Line Service) e ovário de *hamster* chinês (CHO-K1, ATCC CCL-61) foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Ricardo Della Coletta (FOP/UNICAMP) e pelo prof. Dr. Mário S. Mantovani (UEL), respectivamente. As linhagens estão representadas na Tabela 1.

#### **3.3.1. Cultivo celular**

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco<sup>®</sup>) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Durante os experimentos, uma solução de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1 mL/L RPMI 1640) foi adicionada ao meio de cultura.

Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell<sup>®</sup>), a 37°C, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

**Tabela 1:** Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (DI).

Linhagem celular		Nome	DI (x10 <sup>4</sup> células/mL)
<b>Linhagens tumorais</b>	Leucemia	K-562	6,0
	Mama	MCF-7	6,0
	Ovário com fenótipo de resistência	NCI-ADR/Res	5,0
	Melanoma	UACC-62	4,0
	Pulmão	NCI-H460	4,0
	Próstata	PC-3	5,0
	Cólon	HT-29	4,0
	Ovário	OVCAR-3	7,0
	Glioblastoma	U251	4,0
	Rim	786-0	4,5
<b>Linhagens não tumorais</b>	Queratinócito humano	HaCaT	4,0
	Ovário de <i>hamster</i> chinês	CHO-K1	4,0

### 3.3.2. Atividade antiproliferativa em cultura de células

#### A. Preparo das suspensões celulares

Os experimentos de atividade antiproliferativa dos OEs, provenientes das coletas realizadas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2012, foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks e colaboradores (1991). O crescimento celular foi determinado por espectrofotometria, utilizando-se o corante proteico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich®) e as análises foram baseadas na metodologia de triagem *in vitro* para drogas anticâncer realizada pelo NCI, EUA, que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (NCI60) (Monks *et al.*, 1991; Shoemaker, 2006). De modo diferente de outros métodos, este protocolo inclui a determinação da densidade celular no tempo 0 (momento de adição das amostras), o que possibilita o cálculo da concentração que inibe totalmente o crescimento celular (Shoemaker, 2006).

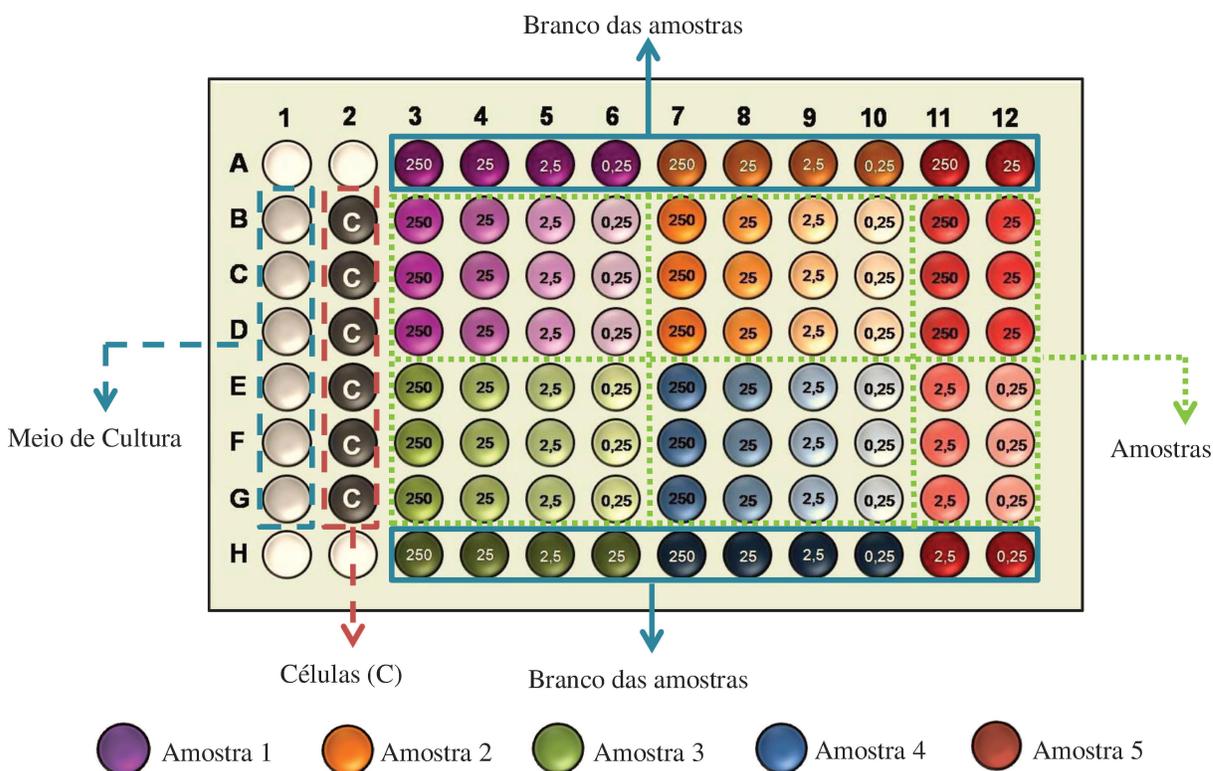
No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), em suas respectivas densidade de inoculação (Tabela 1). Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de

CO<sub>2</sub> e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T<sub>0</sub>), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

### B. Preparo e aplicação das amostras

As amostras dos OEs coletadas de Janeiro a Dezembro/2012 e os OEs obtidos dos indivíduos machos e fêmeas no mês de Julho/2012 foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura RPMI com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina (2 mg/L), o que evitou a toxicidade do DMSO. As amostras dos OEs foram adicionadas nas microplacas (cinco amostras por microplaca) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido (Figura 5). Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

**Figura 5:** Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de atividade antiproliferativa.



No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle  $T_0$  foram fixadas com a adição de 50  $\mu\text{L}$ /compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal no tempo 0.

Após 48 horas de tratamento, as células foram fixadas com 50  $\mu\text{L}$ /compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas por 1 hora, a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após isso, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$ /compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) a 0,4 % (p/v) dissolvido em ácido acético a 1 % (v/v) e, a seguir, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150  $\mu\text{L}$ /compartimento de Trizma Base (10  $\mu\text{M}$ , pH 10,5) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices<sup>®</sup>, modelo VersaMax).

### **C. Análise dos resultados**

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir, foi determinado o crescimento celular (em porcentagem) de cada linhagem celular em função das concentrações de cada amostra testada.

Se  $T > C$ , a amostra estimulou o crescimento.

Se  $T_0 \leq T < C$ , a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$ .

Se  $T < T_0$ , a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$ .

Sendo  $T$  a média das absorbâncias das células tratadas,  $C$  o controle de células e  $T_0$  a média das absorbâncias das células no tempo 0.

Esses resultados foram expressos em curvas de crescimento celular para cada linhagem em função da concentração da amostra e, a partir deles, foram calculadas as concentrações efetivas TGI (*Total Growth Inhibition*, concentração necessária para inibição total de crescimento

celular) e GI<sub>50</sub> (concentração necessária para inibição de 50% da viabilidade celular), através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).

### **3.4. Teste de Indução de Micronúcleo *in vitro***

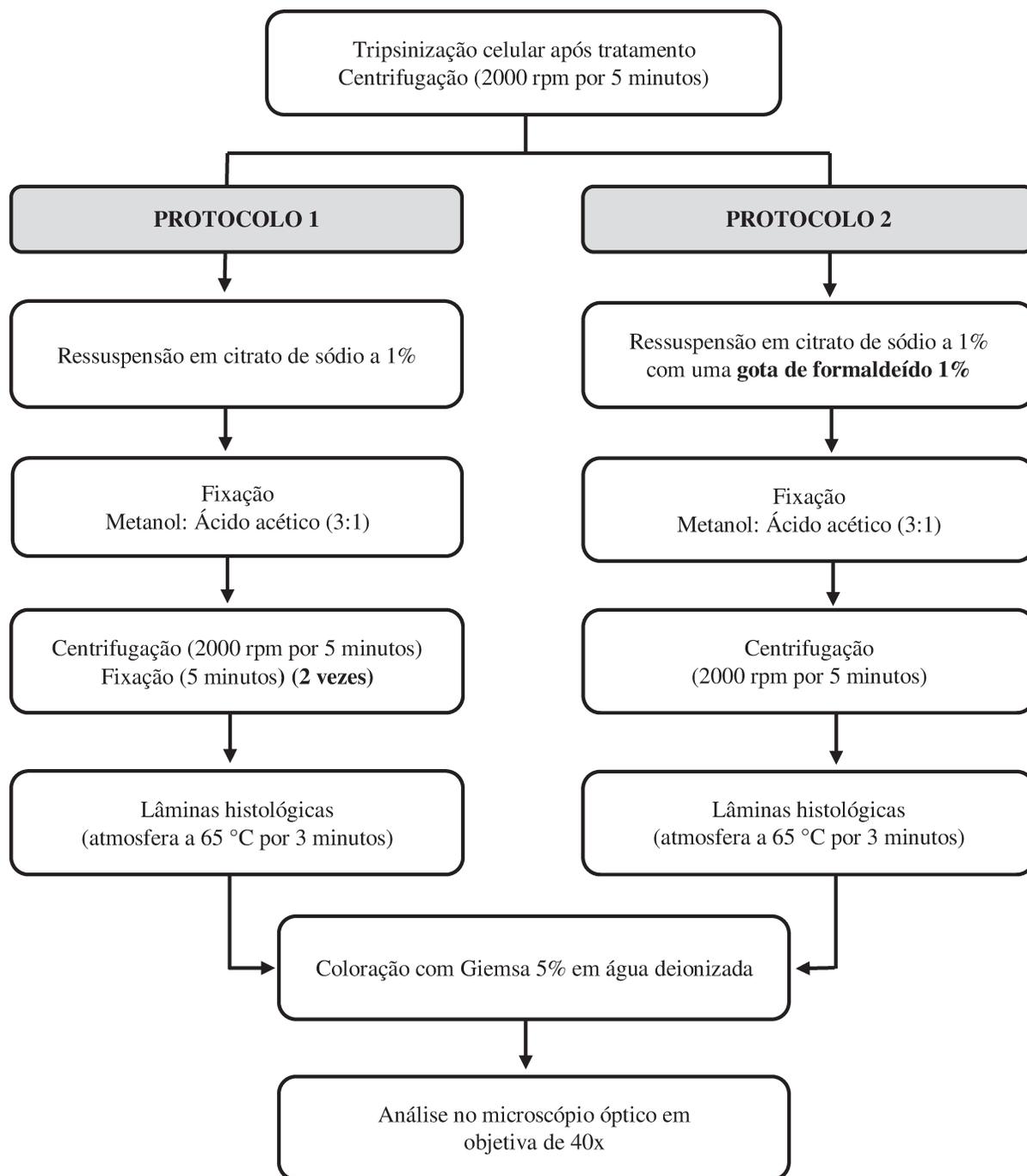
#### **3.4.1. Padronização das condições experimentais**

Inicialmente, buscou-se padronizar um protocolo visando à verificação da mutagenicidade de produtos naturais através do teste de indução de micronúcleo *in vitro*. O procedimento implantado para este trabalho foi desenvolvido de acordo com o guia da OECD 487 (2010).

O teste foi conduzido em placa de 6 compartimentos. As células CHO-K1, na densidade de inoculação de  $2 \times 10^5$  células/compartimento, foram semeadas e incubadas por 24 horas, a 37 °C, em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, iniciou-se o tratamento das células com meio de cultura (RPMI 1640, controle de células) e com as soluções de DMSO (0,25% em RPMI 1640) e MMS (metilmetanosulfonato, 25 µg/mL em RPMI 1640). Após 4 horas, o meio de cultura foi aspirado dos compartimentos, seguido da adição de solução de citocalasina B (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, 3 µg/mL em RPMI 1640). As culturas retornaram à incubadora úmida de CO<sub>2</sub>, permanecendo por 20 horas. Ao final do período, iniciaram-se os processos de hipotonia, fixação e preparação das lâminas (Figura 6).

Para padronização dessas etapas, avaliou-se a influência da temperatura da solução de citrato de sódio 1% (em temperatura ambiente e a 4°C) no processo de hipotonia, enquanto para a fixação, avaliou-se a adição de uma solução de formaldeído 1% à solução de citrato de sódio antes da utilização da solução de metanol:ácido acético 3:1. Além disso, também foram avaliadas as condições para o preparo das lâminas (em temperatura ambiente, a 4°C e sob banho termostaticado a 65°C). A Figura 6 resume as condições avaliadas.

**Figura 6:** Processos de hipotonia, fixação e coloração das células CHO-K1.



Inicialmente, após o período de incubação por 20 horas, o meio de cultura foi aspirado de todos os compartimentos. Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato (pH 7,0) e tripsinizadas com solução de Tripsina/EDTA 0,25% (Vitrocell<sup>®</sup>), sendo que o conteúdo de cada compartimento foi transferido para um tubo cônico correspondente. A suspensão celular foi centrifugada (2000 rpm, 5 minutos) e o *pellet* de células foi ressuscitado em 5 mL de citrato de sódio 1% (p/v) (Synth<sup>®</sup>), a temperatura ambiente, sendo adicionada 1 gota de formaldeído 1% (Synth<sup>®</sup>) em metade das suspensões celulares. Após 5 minutos, 5 mL de fixador foi adicionado aos tubos. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos) e o *pellet* foi ressuspensão em metanol:ácido acético (3:1, 5 mL) por 5 minutos (fixação celular) e novamente centrifugados (2000 rpm, 5 minutos). Esta etapa foi repetida por mais 2 vezes para as suspensões tratadas com citrato de sódio, enquanto as suspensões celulares tratadas previamente com citrato de sódio:formaldeído foram ressuspensas apenas uma vez, conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2003). Concluída a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando-se cerca de 1 mL de fixador para ressuspender o *pellet*. A suspensão celular foi gotejada em três lâminas histológicas, que foram mantidas sob atmosfera a 65°C sobre banho termostatizado por 3 minutos. As lâminas dos dois protocolos foram deixadas para secar em temperatura ambiente e em local livre de poeira. Por fim, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa (Dinâmica<sup>®</sup>), a 5% em água deionizada, por 15 minutos. Após rápida lavagem em água destilada e secagem das mesmas, iniciou-se a análise em microscópio óptico com objetiva de 40x.

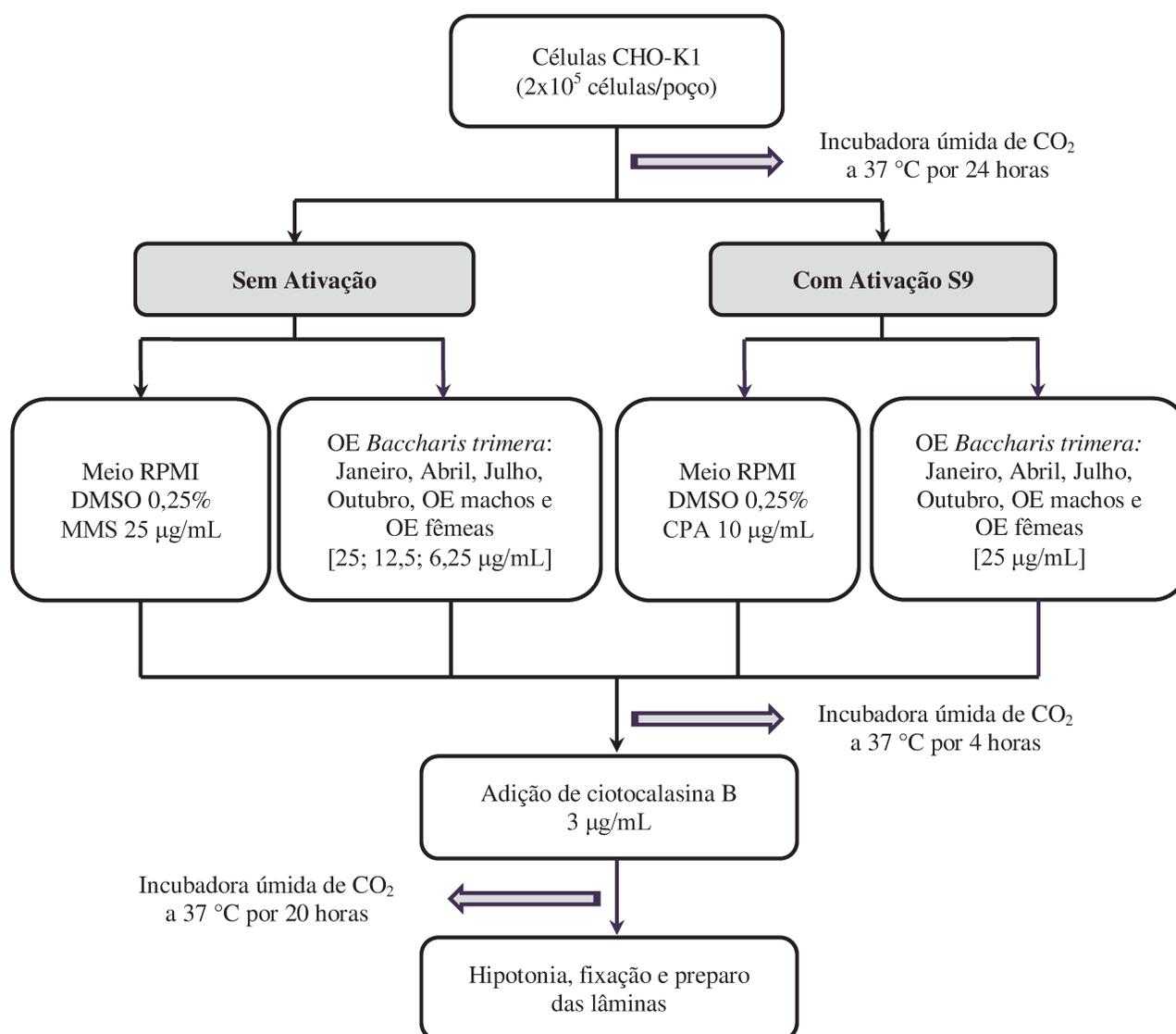
Em um segundo experimento, foi avaliada a influência da temperatura da solução de citrato de sódio 1% (p/v), comparando-se a solução à temperatura ambiente e a 4°C, sem a adição de formaldeído. As etapas de fixação com metanol:ácido acético (3:1, 5 mL) e de preparação da lâmina foram realizadas como descrito anteriormente. Finalmente, mantiveram-se as etapas de hipotonia (solução de citrato de sódio em temperatura ambiente) e de fixação (solução de metanol:ácido acético (3:1, 5 mL), duas vezes) e foram variadas as condições de preparo das lâminas, empregando-se lâminas previamente resfriadas a 4°C (Menoli *et al.*, 2001), mantidas a temperatura ambiente (Kashino *et al.*, 2004) e sob atmosfera a 65 °C sobre banho termostatizado (Santos, 2011), por 3 minutos. Todas as lâminas preparadas foram deixadas para secar em temperatura ambiente e em local livre de poeira. Por fim, as lâminas foram coradas com solução de *Giemsa* (Dinâmica<sup>®</sup>), a 5% em água deionizada, por 15 minutos. Após rápida lavagem em

água destilada e secagem das mesmas, iniciou-se a análise em microscópio óptico com objetiva de 40x.

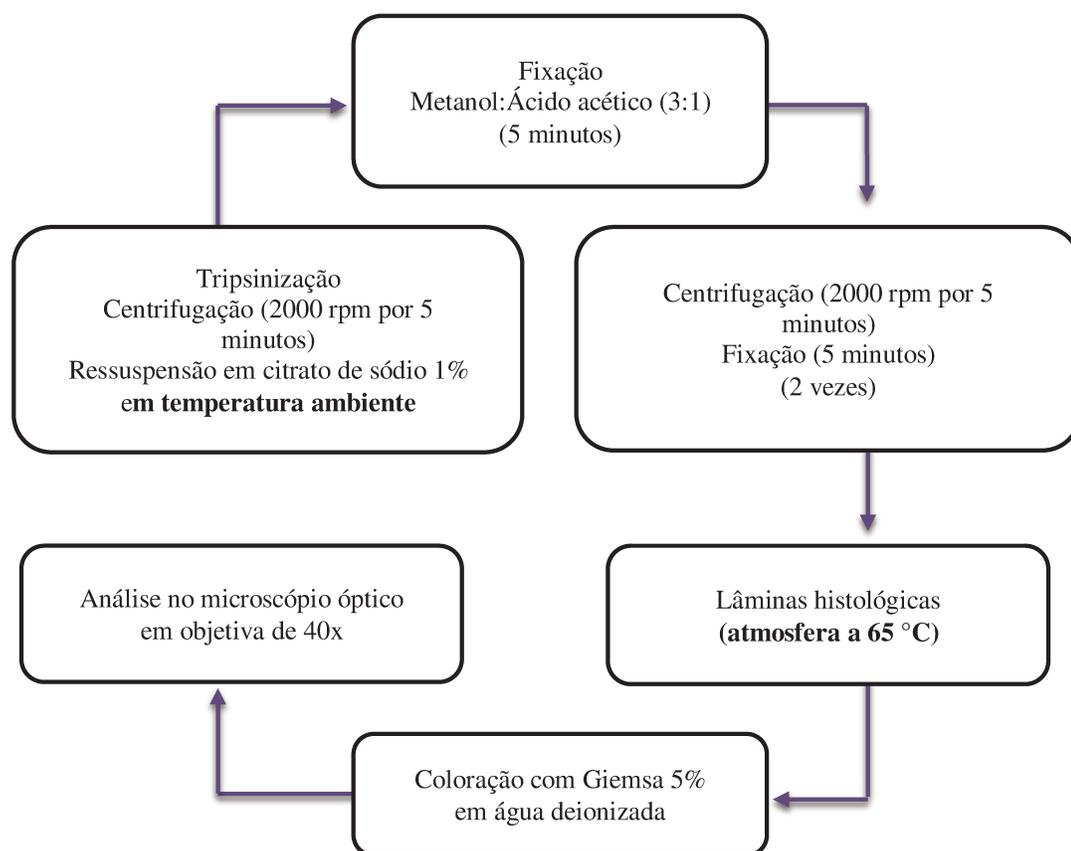
### 3.4.2. Avaliação da mutagenicidade dos óleos essenciais

Uma vez estabelecidas as condições experimentais, avaliou-se a mutagenicidade dos óleos essenciais (Figura 7 e 8).

**Figura 7:** Esquema representativo das etapas do teste do micronúcleo anteriores ao processo de fixação.



**Figura 8:** Esquema representativo do processo de hipotonia, fixação e coloração das células CHO-K1.



#### **A. Experimento sem ativação metabólica (S9-)**

Após padronização das condições experimentais, o teste sem a ativação metabólica S9 (S9-) foi feito com as amostras dos óleos essenciais extraídos nos meses de Janeiro, Abril, Julho e Outubro (representativas para as estações verão, outono, inverno e primavera, respectivamente) e dos óleos essenciais provenientes das partes aéreas de indivíduos machos e fêmeas, coletados em Julho, mês no qual foi possível diferenciar os indivíduos pelas inflorescências. Essas amostras foram avaliadas com relação ao potencial mutagênico nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25 µg/mL, em duplicata. As placas tratadas foram levadas à incubadora úmida de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Após esse período, solução de citocalasina B foi adicionada aos poços na concentração final 3 µg/mL. As culturas retornaram a incubadora, permanecendo por 20 horas (Figura 7). Ao final do período, iniciou-se o processo de hipotonia, fixação e preparação das lâminas (Figura 8). Como controles foram utilizados meio de cultura RPMI 1640 (controle negativo), DMSO 0,25%

(controle do solvente das amostras) e MMS 25 µg/mL (controle positivo de indução de micronúcleos).

### **B. Experimento com ativação metabólica (S9+)**

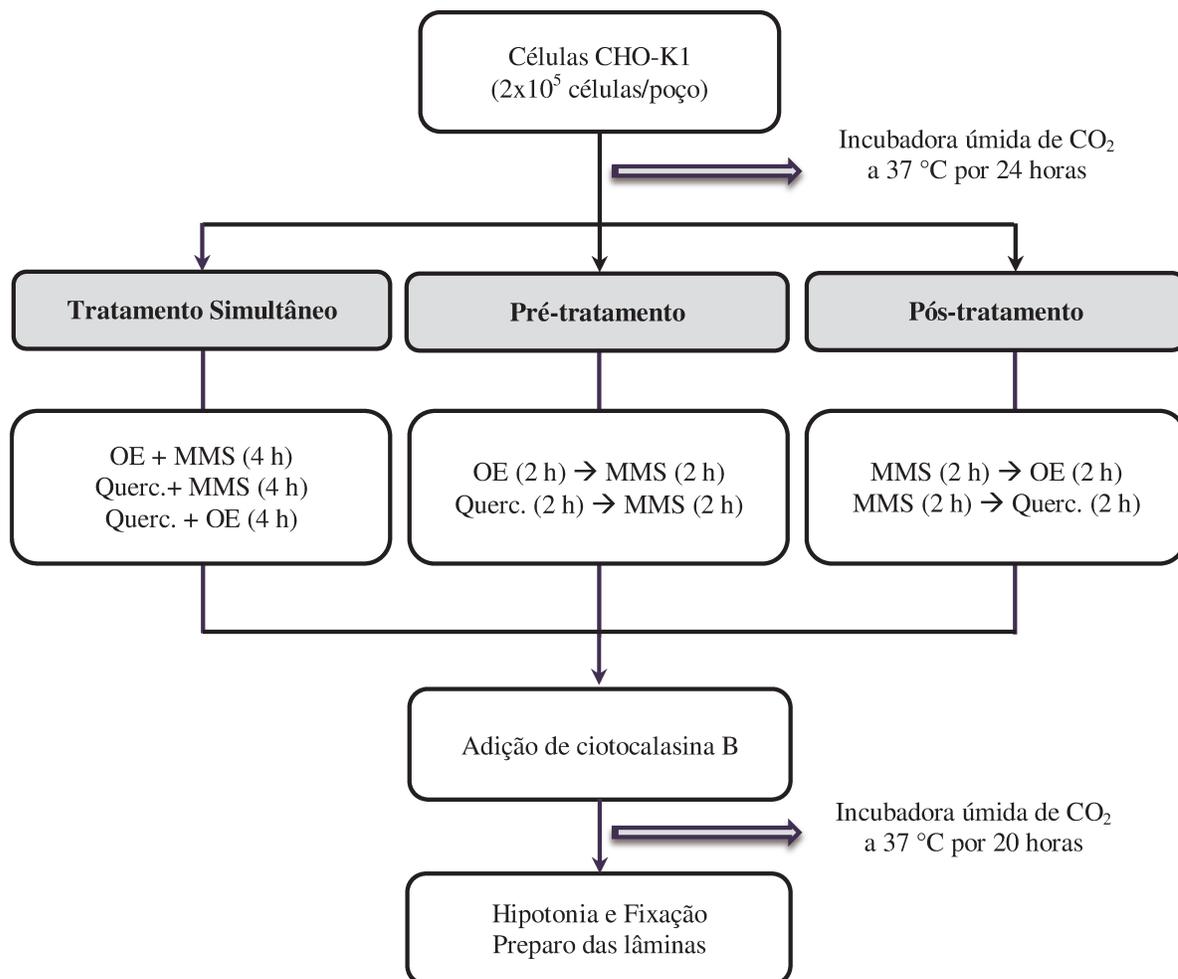
Os óleos essenciais avaliados no teste de indução de micronúcleos sem ativação metabólica também foram analisados com relação ao potencial mutagênico na concentração de 25 µg/mL, empregando-se um sistema de metabolização.

Para este experimento, a 1 mL água destilada foram adicionados 1,75 mL de tampão fosfato pH 7,4, 100 µL de NADP (76,5 mg/mL), 25 µL de glicose 6-fosfato (282,1 mg/mL), 25 µL de KCl (1,65 M), 25 µL de MgCl<sub>2</sub> (0,4 M) e 100 µL de fração S9 (mistura de enzimas hepáticas humanas, Sigma-Aldrich®). Este mix foi adicionado às placas (90 µL/compartimento, concentração final de S9 de 2%) juntamente com as amostras a serem testadas. Além dos controles negativo (meio de cultura) e do solvente (DMSO), utilizou-se ciclofosfamida (10 µg/mL) como controle positivo. As placas foram então levadas à incubadora de CO<sub>2</sub>, por 4 horas. Ao final deste período, aspirou-se todo o meio de cultura e as células foram lavadas com solução tampão fosfato pH 7,0 (2 mL/compartimento). Após retirada da solução tampão, adicionou-se meio de cultura RPMI 1640 contendo citocalasina B (3 µg/mL, 1,5 mL/compartimento). Após 20 horas de incubação, iniciou-se o procedimento para preparo das lâminas (Figura 8).

#### **3.4.3. Testes iniciais de antimutagenicidade**

Para avaliação inicial da atividade antimutagênica, as células CHO-K1 foram tratadas com a amostra do óleo essencial extraído no mês de Julho (25 µg/mL) e o indutor de MN (MMS, 25 µg/mL). No tratamento simultâneo, as células foram tratadas com a mistura de amostra e indutor de MN e incubadas por 4 horas. No pré-tratamento, as células foram expostas à amostra por 2 horas, lavadas com tampão PBS e expostas ao indutor de MN por mais 2 horas. Já no pós-tratamento, as células foram expostas por 2 horas ao indutor de MN, lavadas com PBS e expostas à amostra em teste por mais 2 horas. Paralelamente aos tratamentos, foi realizado um controle negativo (células sem qualquer tratamento) e um positivo (células tratadas com o indutor de MN) (Figura 9).

**Figura 9:** Esquema representativo do teste de antimutagenicidade.



Além das amostras supracitadas, realizou-se também os três tratamentos com quercetina, 2,5 µg/mL, flavonoide com expressiva atividade antioxidante.

Ao final do período de 4 horas, foram seguidas as etapas finais descritas no teste de indução de micronúcleo, a saber, bloqueio de citocinese (citolasina B, 3 µg/mL), hipotonia, fixação, preparo das lâminas e contagem dos micronúcleos.

#### **3.4.4. Análise dos resultados de indução de micronúcleo**

Todas as lâminas foram analisadas por microscopia óptica e de cada tratamento foram contadas no mínimo 2000 células, sendo pelo menos 1000 células em cada cultura. Nessa população foi contada a incidência de células binucleadas com 1, 2 ou 3 micronúcleos. Além

disso, foram contadas também a quantidade de células mononucleadas e multinucleadas. Com esses valores experimentais, foram calculados o Índice de Proliferação Pós-Bloqueio da Citocinese (CBPI do inglês, *Cytokinesis-Block Proliferation Index*), o Índice de Replicação (RI do inglês, *Replication Index*), ambos para inferir a citotoxicidade das amostras, e a frequência (porcentagem) de micronúcleos, segundo as fórmulas descritas pela OECD 487 (2010):

$$CBPI = \frac{(n^{\circ} \text{ mononucleadas}) + 2(n^{\circ} \text{ binucleadas}) + 3(n^{\circ} \text{ multinucleadas})}{n^{\circ} \text{ total de células}}$$

$$RI = \frac{((n^{\circ} \text{ binucleadas}) + 2(n^{\circ} \text{ multinucleadas})) / (n^{\circ} \text{ total de células da cultura})}{((n^{\circ} \text{ binucleadas}) + 2(n^{\circ} \text{ multinucleadas})) / (n^{\circ} \text{ total de células do controle})} \times 100$$

$$\% \text{ frequência micronúcleos} = \frac{n^{\circ} \text{ total de micronúcleos}}{\text{total células binucleadas}} \times 100$$

A ação protetora da amostra em teste foi expressa como a porcentagem de redução (%RED) da ocorrência de micronúcleos, calculada por  $\%RED = 100 \times [(MN_A - MN_B) / (MN_A - MN_C)]$ , onde  $MN_A$  é o número de células com micronúcleo após o tratamento com MMS,  $MN_B$  é o número de células com micronúcleo após o tratamento com a amostra mais MMS e  $MN_C$  é o número de células com micronúcleo no grupo controle negativo.

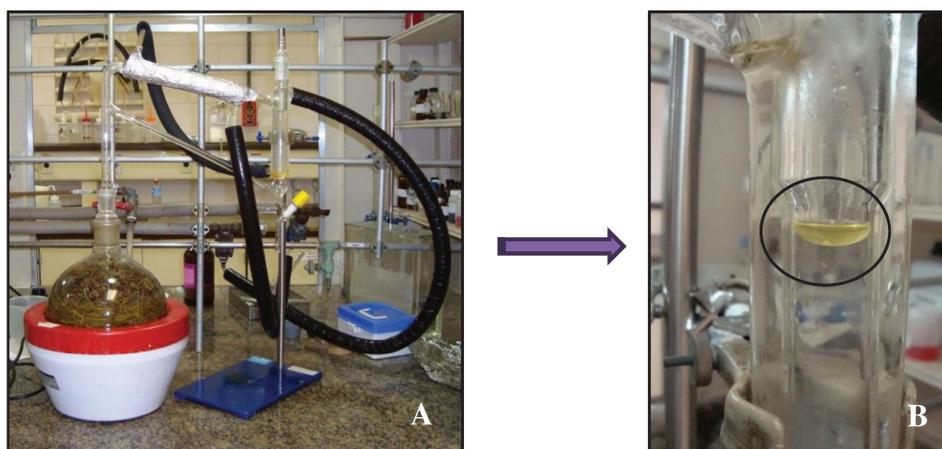
Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico  $p \leq 0,05$  para que seja considerada diferença significativa entre os grupos, seguida de Teste de Duncan com auxílio do software Statistica, versão 5.5.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Rendimento do OE e Teor de Umidade

Após o processo de hidrodestilação (Figura 10), foram calculados os rendimentos do OE em base fresca e em base seca, bem como o teor de umidade das partes aéreas coletadas (Tabela 2).

**Figura 10:** Sistema para extração do óleo essencial.



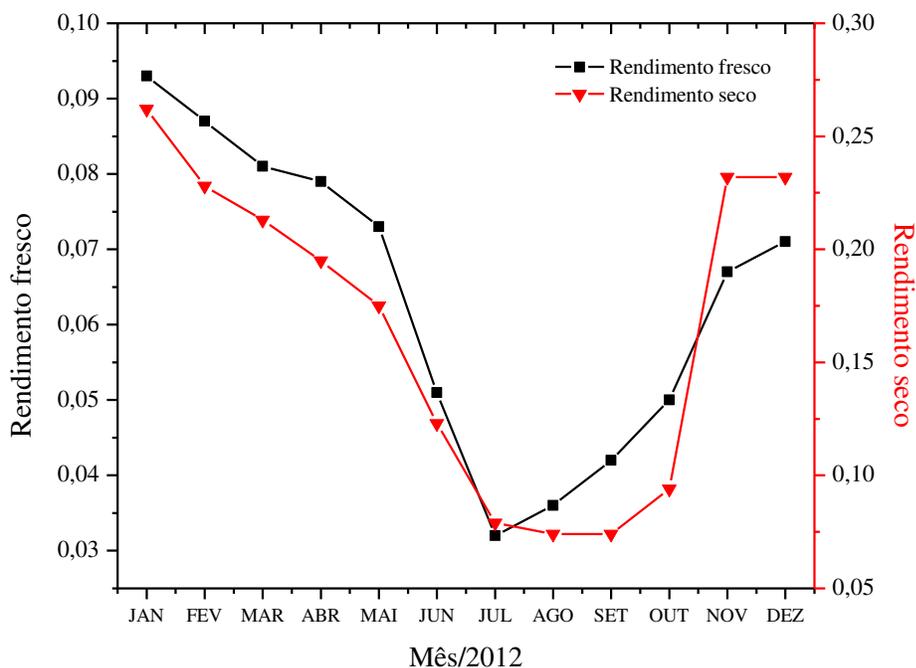
(A) Sistema de hidrodestilação e (B) detalhe do óleo essencial recolhido.

**Tabela 2:** Valores referentes às massas de partes aéreas coletadas mensalmente, de óleos essenciais extraídos, bem como, os rendimentos em base seca e fresca e o teor de umidade.

	Massa de planta (g)	Massa OE (g)	Rendimento fresco (% m/m)	Rendimento seco (% m/m)	Teor de umidade (% m/m)
<b>Janeiro</b>	1471,64	1,3703	0,093	0,262	64,41
<b>Fevereiro</b>	1825,59	1,5805	0,087	0,228	62,02
<b>Março</b>	2346,05	1,9063	0,081	0,213	61,91
<b>Abril</b>	2165,00	1,7184	0,079	0,195	59,35
<b>Mai</b>	2400,01	1,7580	0,073	0,175	58,25
<b>Junho</b>	2706,30	1,3748	0,051	0,123	58,73
<b>Julho</b>	3139,41	1,0062	0,032	0,079	59,43
<b>Agosto</b>	2663,89	0,9645	0,036	0,074	50,77
<b>Setembro</b>	1633,17	0,6915	0,042	0,074	42,49
<b>Outubro</b>	1881,29	0,9365	0,050	0,094	46,97
<b>Novembro</b>	1740,57	1,1726	0,067	0,232	70,97
<b>Dezembro</b>	1397,18	0,9977	0,071	0,232	69,16

Nas Figuras 11 e 12 estão apresentados os perfis dos rendimentos dos OEs extraídos de Janeiro a Dezembro, em bases seca e fresca, assim como o teor de umidade (em % m/m).

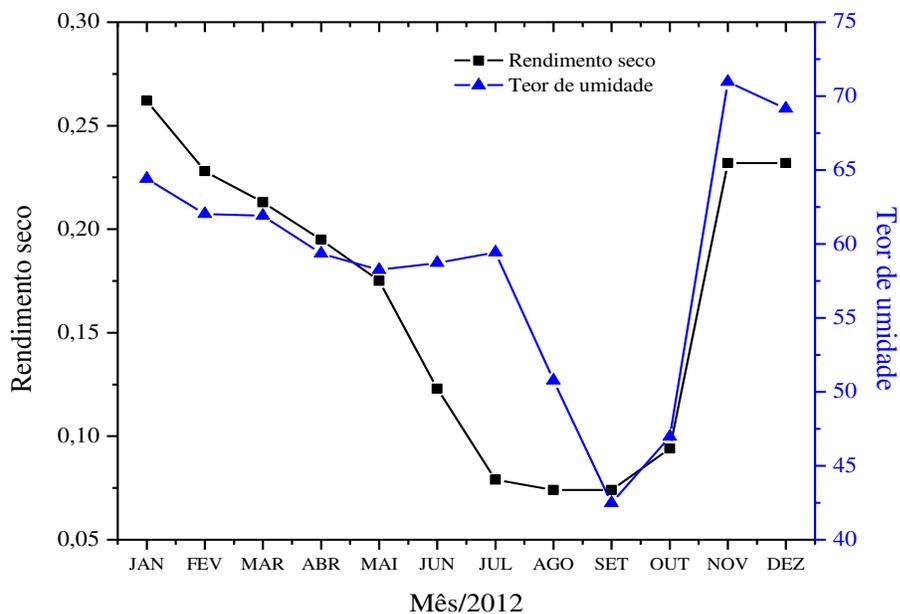
**Figura 11:** Perfil do rendimento dos óleos essenciais em bases fresca e seca (% m/m).



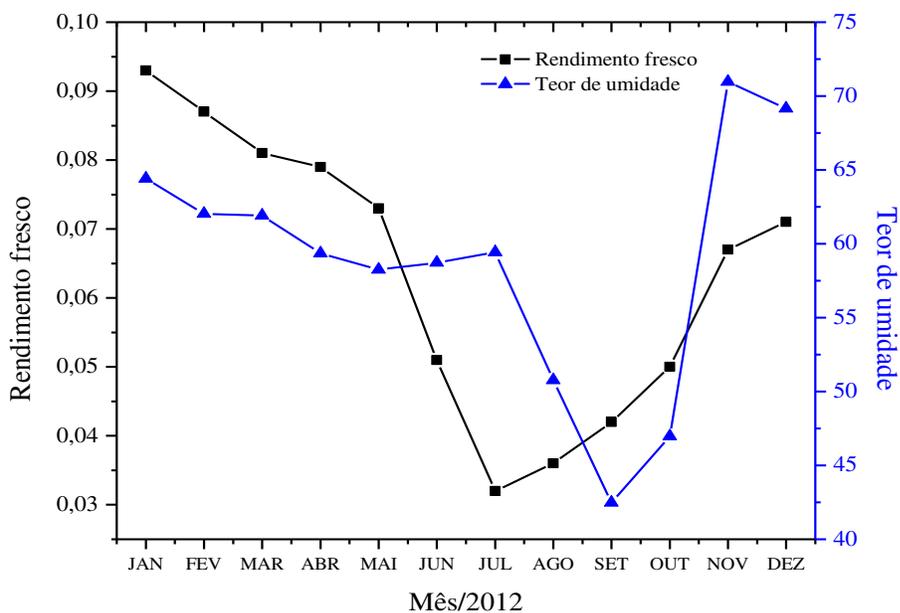
OEs obtidos das partes aéreas de *B. trimera* coletadas no período de Janeiro a Dezembro de 2012.

Com base nos dados obtidos (Tabela 2, Figura 11), pode-se observar que com pequenas variações, tanto o rendimento em base seca quanto em base fresca refletem o mesmo padrão de variação ao longo do ano. Assim, o maior rendimento (base seca) do OE foi obtido no mês de Janeiro (0,262%); posteriormente, houve uma redução pequena e gradativa no rendimento até o mês de Maio (0,175%), com uma queda acentuada entre os meses de Maio e Julho (de 0,175% a 0,079%), trimestre que compreende o período de florescimento da planta, e recuperação do rendimento a partir de Novembro (0,232%).

**Figura 12:** Perfil do teor de umidade (% m/m) das partes aéreas de *B. trimera*, coletadas no período de Janeiro a Dezembro de 2012, em comparação com o rendimento.



**A**



**B**

(A) Rendimento do OE em base seca; (B) Rendimento do OE em base fresca.

Foi interessante observar que o teor de umidade se manteve com pequenas alterações até o mês de Julho (64,41% em Janeiro e 59,43% em Julho), apresentando queda nos meses de Agosto e Setembro (50,77% e 42,49%, respectivamente) e recuperação a partir do mês de Outubro (46,97%) (Tabela 2, Figura 12). Essa queda no teor de umidade pode ser a explicação para o aumento no rendimento em base fresca, em relação ao rendimento obtido para coleta no mês de Julho (0,032%), observado nos meses de Agosto a Outubro (0,036% a 0,050%) (Tabela 2, Figura 12).

Esta variação no rendimento, em base seca, do OE (de 0,262% em Janeiro/2012 para 0,094% em Outubro/2012) está em concordância com aquela descrita por Silva *et al.* (2007). Estes autores avaliaram a variabilidade sazonal do OE em populações de *B. trimera*, natural e cultivada, coletadas no estado de Minas Gerais. Neste estudo, os óleos foram extraídos a partir do material seco e os rendimentos dos óleos obtidos a partir das plantas cultivadas variaram de 0,23 e 0,25%, em Abril/2003 e Janeiro/2004, com uma redução do rendimento (0,19%) a partir de Maio/2003, com manutenção desse patamar até Outubro/2003 (0,11%).

#### **4.2. Análise fitoquímica do OE por CG/EM**

Nas Tabelas 3 e 4 estão descritos os compostos identificados nos OEs extraídos de Janeiro a Dezembro de 2012 e dos OEs obtidos das partes aéreas dos indivíduos macho e fêmea, coletados em Julho de 2012, em plena floração.

**Tabela 3:** Compostos identificados, por CG/EM, nos óleos essenciais das partes aéreas de *B. trimera* (Less.) DC.

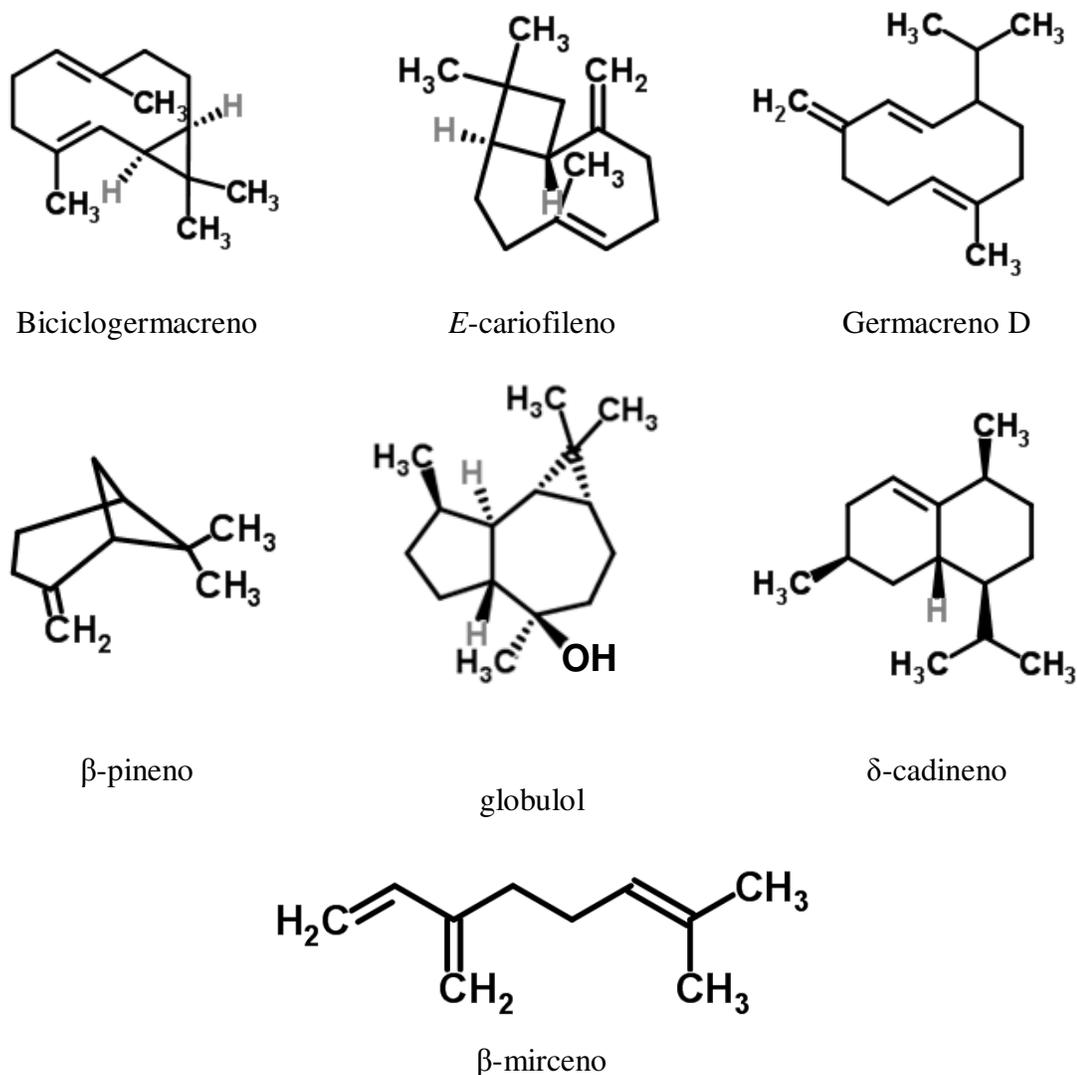
t <sub>R</sub> (min)	Composto	IRR <sub>Cal</sub>	IRR <sub>Lit</sub>	% área relativa													
				Jan/ 12	Fev/ 12	Mar/ 12	Abr/ 12	Mai/ 12	Jun/ 12	Jul/ 12	Ago/ 12	Set/ 12	Out/ 12	Nov/ 12	Dez/ 12	Jul/12 OE <sub>♂</sub>	Jul/12 OE <sub>♀</sub>
5,87	α-pineno	933	932	0,95	1,20	1,06	1,14	1,20	1,45	0,96	0,93	0,82	0,68	0,59	0,51	1,56	1,61
<b>7,06</b>	<b>β-pineno*</b>	977	974	<b>7,12</b>	<b>8,76</b>	<b>8,03</b>	<b>8,31</b>	<b>8,27</b>	<b>10,66</b>	<b>7,54</b>	<b>7,17</b>	<b>5,92</b>	<b>5,21</b>	<b>4,98</b>	<b>4,22</b>	<b>11,53</b>	<b>11,66</b>
<b>7,43</b>	<b>β-mirceno*</b>	991	988	<b>5,91</b>	<b>6,39</b>	<b>6,42</b>	<b>5,25</b>	<b>6,45</b>	<b>7,40</b>	<b>6,56</b>	<b>5,09</b>	<b>4,79</b>	<b>3,91</b>	<b>3,09</b>	<b>2,39</b>	<b>7,11</b>	<b>11,01</b>
9,33	<i>E</i> -β-ocimeno	1047	1044	2,35	2,10	2,31	2,42	2,81	3,72	2,15	2,13	1,51	1,72	1,22	1,20	3,81	3,83
22,71	α-copaeno	1375	1374	0,70	0,76	0,76	0,74	0,75	0,58	0,64	0,72	0,60	0,61	0,59	0,57	0,75	0,81
23,39	β-elemeno	1392	1389	0,67	0,90	0,79	0,99	0,67	0,86	0,67	0,85	0,86	0,84	0,83	0,82	1,08	0,94
<b>24,54</b>	<b><i>E</i>-cariofileno*</b>	1420	1417	<b>13,10</b>	<b>13,49</b>	<b>13,57</b>	<b>14,14</b>	<b>13,92</b>	<b>12,14</b>	<b>13,70</b>	<b>14,32</b>	<b>12,72</b>	<b>12,81</b>	<b>16,72</b>	<b>16,71</b>	<b>14,94</b>	<b>11,44</b>
25,29	α-guaiaeno	1438	1437	2,98	2,82	3,21	3,18	3,63	3,07	2,99	2,98	2,55	2,21	1,82	2,55	2,89	2,49
25,88	α-humuleno	1453	1452	1,56	1,54	1,59	1,59	1,55	1,37	1,61	1,73	1,70	1,67	1,85	1,83	1,66	1,39
26,16	aloaromadendreno	1460	1458	0,64	0,61	0,74	1,04	1,17	1,08	0,83	0,79	0,77	0,57	-	0,47	-	0,89
26,84	γ-muuroleno	1477	1478	2,08	2,08	2,02	2,05	2,03	1,68	1,73	1,62	1,48	1,72	1,43	1,60	1,97	1,83
<b>27,02</b>	<b>germacreno D*</b>	1481	1484	<b>8,78</b>	<b>9,83</b>	<b>9,35</b>	<b>8,33</b>	<b>7,37</b>	<b>7,03</b>	<b>8,69</b>	<b>10,79</b>	<b>11,74</b>	<b>13,24</b>	<b>17,70</b>	<b>14,15</b>	<b>8,56</b>	<b>6,73</b>
27,20	β-selineno	1486	1489	0,61	0,60	0,65	0,64	0,64	0,54	0,60	0,58	0,50	0,62	0,65	0,57	-	0,58
<b>27,66</b>	<b>biciclogermacreno*</b>	1497	1500	<b>13,33</b>	<b>12,94</b>	<b>14,64</b>	<b>13,14</b>	<b>13,98</b>	<b>12,64</b>	<b>15,19</b>	<b>17,34</b>	<b>17,54</b>	<b>16,51</b>	<b>19,39</b>	<b>22,18</b>	<b>12,56</b>	<b>9,49</b>
27,77	α-muuroleno	1500	1500	1,31	1,32	1,28	1,29	1,25	1,09	1,10	1,08	1,09	1,15	1,04	1,11	1,28	1,12
28,03	δ-guaiaeno	1507	1509	0,57	0,60	0,61	0,66	1,27	0,65	0,37	0,49	0,50	1,30	1,53	1,33	-	1,13
28,30	γ-cadineno	1514	1513	1,28	1,28	1,19	1,27	1,17	1,06	0,63	0,57	0,53	1,10	0,91	1,01	0,52	0,49
<b>28,69</b>	<b>δ-cadineno*</b>	1523	1522	<b>6,44</b>	<b>6,56</b>	<b>6,23</b>	<b>6,44</b>	<b>6,15</b>	<b>5,70</b>	<b>6,01</b>	<b>5,73</b>	<b>5,21</b>	<b>5,75</b>	<b>5,11</b>	<b>5,26</b>	<b>7,86</b>	<b>6,30</b>
30,07	germacreno B	1559	1559	0,56	0,48	0,50	0,54	0,59	0,55	0,61	0,64	0,58	0,62	0,63	0,64	-	0,45
30,77	espatulenol	1577	1577	0,54	0,55	0,63	0,75	0,82	0,86	1,41	2,56	4,43	2,24	-	-	1,01	1,05
<b>31,03</b>	<b>globulol*</b>	1584	1590	<b>6,91</b>	<b>5,97</b>	<b>6,10</b>	<b>6,84</b>	<b>6,99</b>	<b>7,31</b>	<b>7,52</b>	<b>7,62</b>	<b>6,06</b>	<b>7,00</b>	<b>3,68</b>	<b>4,54</b>	<b>6,08</b>	<b>6,77</b>
31,32	viridiflorol	1592	1592	4,22	3,50	3,57	3,88	4,17	4,08	3,92	3,35	3,41	3,51	2,74	3,30	3,30	3,36
31,70	Ledol	1602	1602	2,29	1,97	1,90	2,02	2,02	2,15	2,19	1,63	1,53	1,52	0,80	1,13	1,77	2,10
33,19	epi-α-muurolol	1642	1640	3,23	2,91	2,48	2,72	2,27	2,33	2,35	2,06	2,33	2,78	2,76	2,68	2,67	2,31
33,66	α-cadinol	1655	1652	3,54	3,39	2,66	2,73	2,37	2,53	2,35	1,97	2,56	2,94	3,57	3,24	2,98	2,50

t<sub>R</sub>: tempo de retenção (min); IRR<sub>cal</sub>: índice de retenção relativa calculado; IRR<sub>lit</sub>: índice de retenção relativa descrito na literatura (Adams, 2007).

\*Em destaque, as porcentagens relativas dos compostos majoritários.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, os compostos majoritários presentes nos OEs, ao longo dos doze meses, foram o biciclogermacreno (12,64% a 22,18%), *E*-cariofileno (12,14% a 16,72%), germacreno D (7,03% a 14,15%),  $\beta$ -pineno (4,98% a 10,66%), globulol (3,68% a 7,62%),  $\beta$ -mirceno (2,39% a 7,40%) e  $\delta$ -cadineno (5,11% a 6,56%) (Figura 13).

**Figura 13:** Estrutura química dos compostos majoritários identificados no OE de *B. trimera*.



Com relação aos óleos extraídos de inflorescências diferenciadas morfológicamente em machos e fêmeas, coletadas no mês de Julho, houve semelhança na composição qualitativa com diferenças nas concentrações relativas dos compostos majoritários. Assim, o OE do indivíduo macho apresentou maiores concentrações relativas de *E*-cariofileno (14,94%), biciclogermacreno

(12,56%) e germacreno D (8,56%) enquanto o OE do indivíduo fêmea apresentou maior concentração relativa de  $\beta$ -mirceno (11,00%) e de globulol (6,77%); ambos os OEs apresentaram teores semelhantes de  $\beta$ -pineno (11,53% e 11,66% para macho e fêmea, respectivamente) (Tabela 3).

Lago *et al.* (2008) analisaram quimicamente o óleo volátil das folhas de indivíduos macho e fêmea de *Baccharis trimera*, coletados em Campos do Jordão/SP. Os autores verificaram variação significativa na composição química e na proporção relativa dos óleos obtidos, a qual pode estar relacionada às diferenças fisiológicas que geralmente, em espécies dióicas, interferem no metabolismo secundário. Nas plantas dióicas, as fêmeas alocam mais energia e nutrientes para a reprodução do que as plantas masculinas. Assim, as plantas fêmeas têm seu crescimento reduzido, o estado nutricional baixo e são menos atacadas por insetos herbívoros que as plantas masculinas (Cipollini *et al.*, 1994; Carneiro *et al.*, 2006).

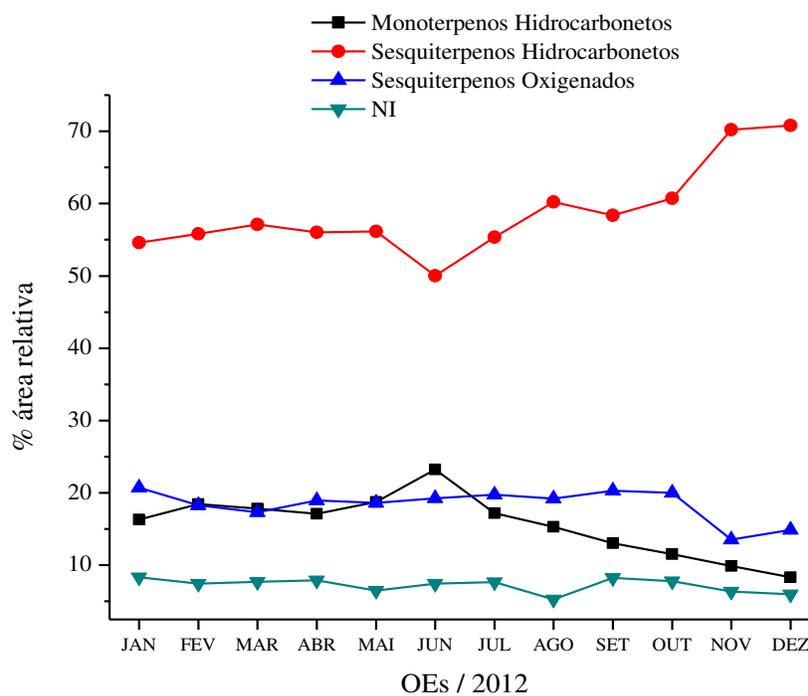
Analisando-se os compostos identificados agrupados de acordo com o esqueleto químico básico (Tabela 4), foi possível observar que entre as substâncias voláteis presentes no óleo essencial de *B. trimera* há um predomínio de sesquiterpenos hidrocarbonetos (50,04 a 70,80%).

Nas plantas machos, coletadas em Julho/12, há um teor maior de sesquiterpenos hidrocarbonetos (54,07%) em relação ao observado nas plantas fêmeas (46,08%) e um pouco menor de monoterpenos hidrocarbonetos (24,01% e 28,11%, respectivamente) (Tabela 4, Figura 14). Além disso, tanto plantas machos quanto fêmeas apresentaram quantidades relativas semelhantes de sesquiterpenos oxigenados (17,81% e 18,09%), com um teor maior de compostos não identificados no óleo essencial das plantas fêmeas (7,72%) em relação ao óleo das plantas machos (4,11%).

**Tabela 4:** Composição dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* por grupos de compostos.

OEs/2012	% área relativa			
	Monoterpenos Hidrocarbonetos	Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	Sesquiterpenos oxigenados	Não Identificados
<b>Janeiro</b>	16,33	54,61	20,73	8,33
<b>Fevereiro</b>	18,45	55,81	18,29	7,45
<b>Março</b>	17,82	57,13	17,34	7,71
<b>Abril</b>	17,12	56,04	18,94	7,90
<b>Mai</b>	18,73	56,14	18,64	6,49
<b>Junho</b>	23,23	50,04	19,26	7,47
<b>Julho</b>	17,21	55,37	19,74	7,68
<b>Agosto</b>	15,32	60,23	19,19	5,26
<b>Setembro</b>	13,04	58,37	20,32	8,27
<b>Outubro</b>	11,52	60,72	19,99	7,77
<b>Novembro</b>	9,88	70,20	13,55	6,37
<b>Dezembro</b>	8,32	70,80	14,89	5,99
<b>Macho</b>	24,01	54,07	17,81	4,11
<b>Fêmea</b>	28,11	46,08	18,09	7,72

**Figura 14:** Grupos de compostos presentes nos óleos essenciais de *Baccharis trimera*.



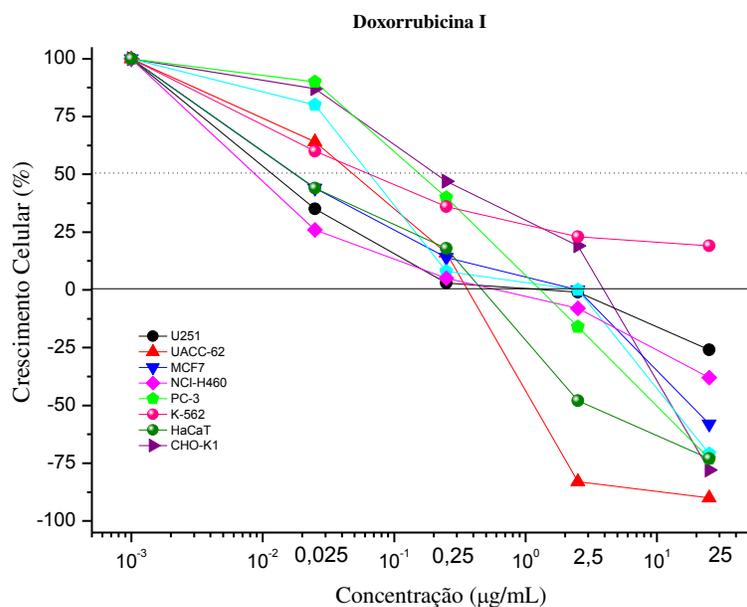
### 4.3. Atividade antiproliferativa em cultura de células

A fim de agregar informações sobre outras possíveis atividades biológicas do OE de *B. trimera*, realizou-se o teste de atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas.

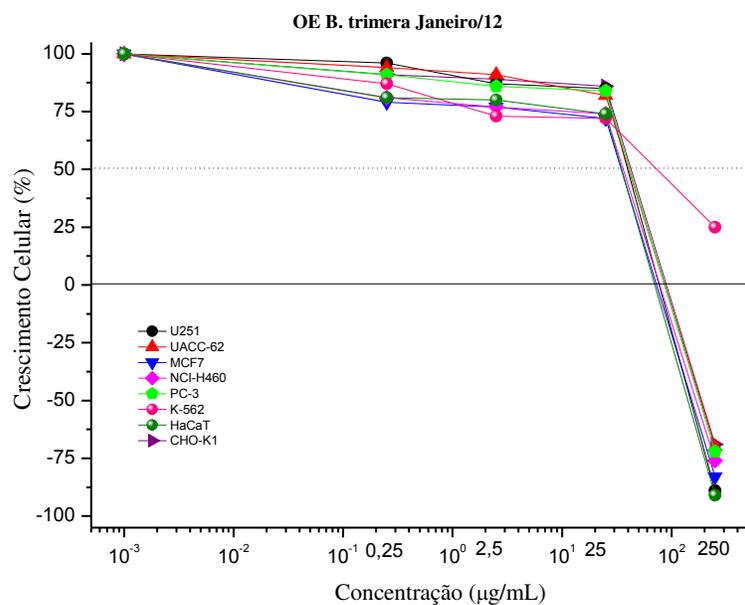
Para análise da proliferação celular, utilizou-se o método não-clonogênico da sulforrodamina B, que é um corante proteico que se liga aos resíduos dos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste. Para a fixação das células viáveis foi empregado o ácido tricloroacético (TCA) que atua como um fixador, precipitando proteínas. Desta forma, as células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis são lavadas. Trata-se de um método independente do metabolismo celular e que permite a quantificação de proteínas de modo linear com o número de células da cultura, além de ser consideravelmente rápido, simples e apresentar sensibilidade comparável à de metodologias fluorescentes. Outra vantagem é a estabilidade da placa para leitura, pois as células são primeiramente fixadas, coradas e a medida da absorbância pode ser realizada várias semanas após o término do experimento (Rubinstein *et al.*, 1990; Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991; Keepers *et al.*, 1991; Vichai e Kirtikara, 2006; Houghton *et al.*, 2007).

Os gráficos gerados relacionam o crescimento celular em função da concentração das amostras testadas (Figura 15, A-Q). Os valores entre 100% e 0 representam proliferação celular, sendo a linha 0 o marco para a inibição total de crescimento, ou seja, quando a quantidade de células ao final do experimento era a mesma do momento de adição das amostras (placa T<sub>0</sub>). Já os valores negativos representam morte celular, pois a quantidade de células (inferida através da dosagem de proteínas coradas) era menor do que aquela do momento de adição das amostras (placa T<sub>0</sub>) (Monks *et al.*, 1991).

**Figura 15:** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



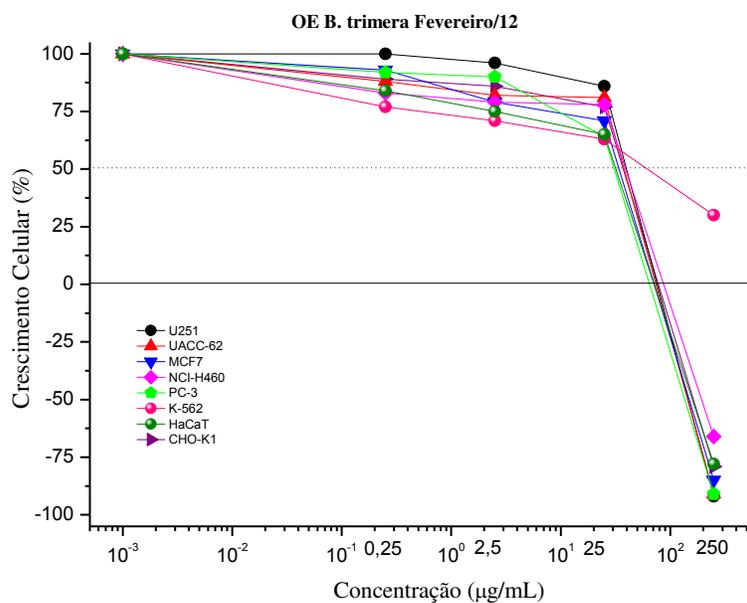
**A**



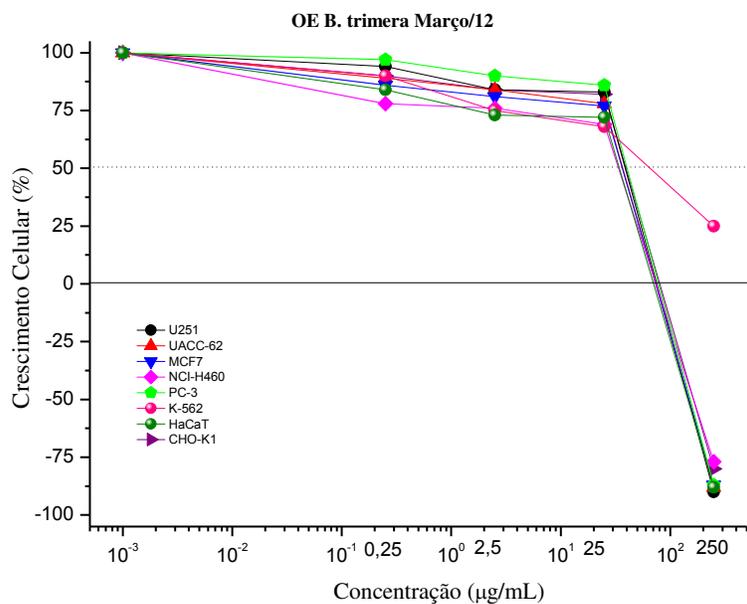
**B**

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). **(A)** controle do quimioterápico para análise dos OEs extraídos nos meses de Jan, Fev, Mar, Abr e Mai/12; **(B)** OE Jan/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



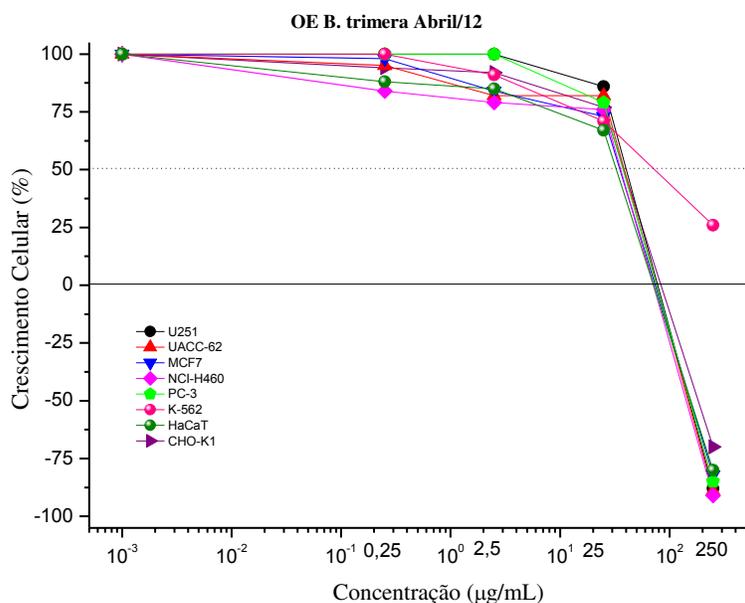
**C**



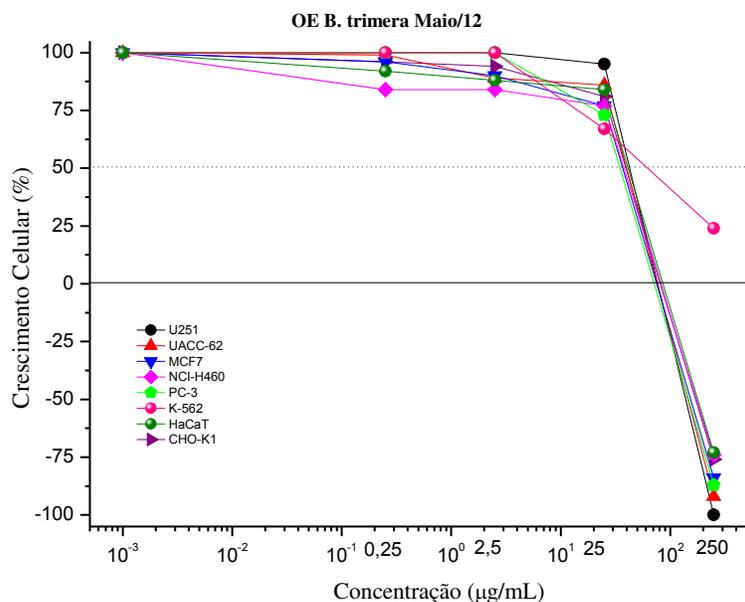
**D**

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). (C) OE Fev/12; (D) OE Mar/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



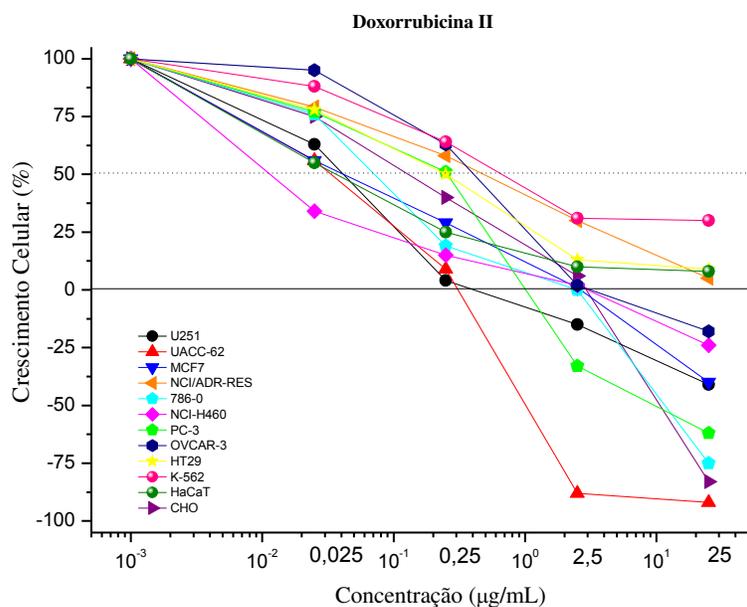
**E**



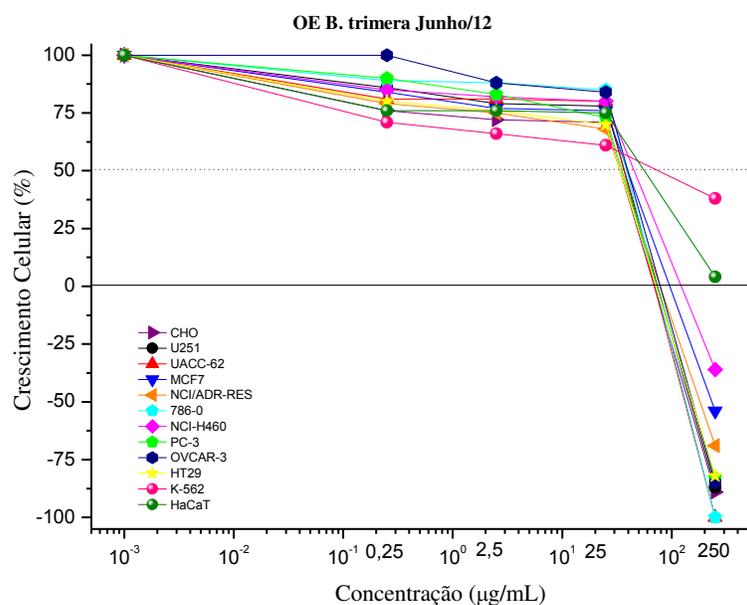
**F**

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). **(E)** OE Abr/12; **(F)** OE Maio/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



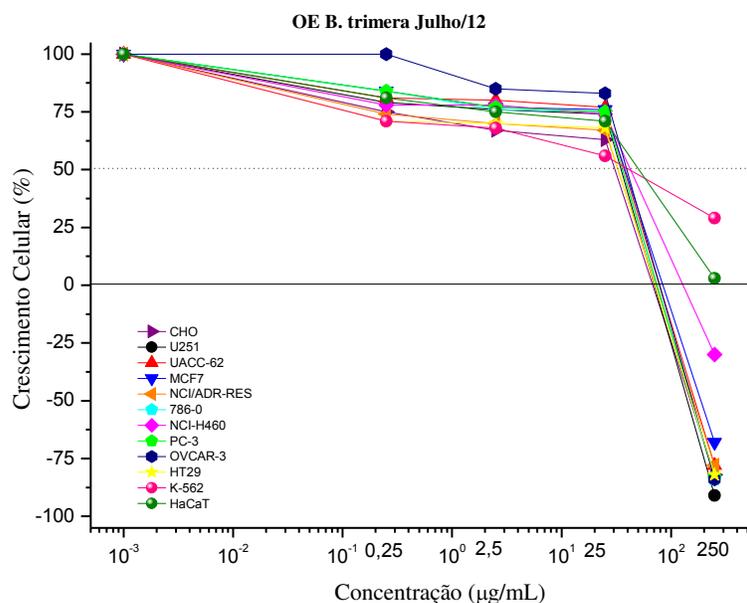
**G**



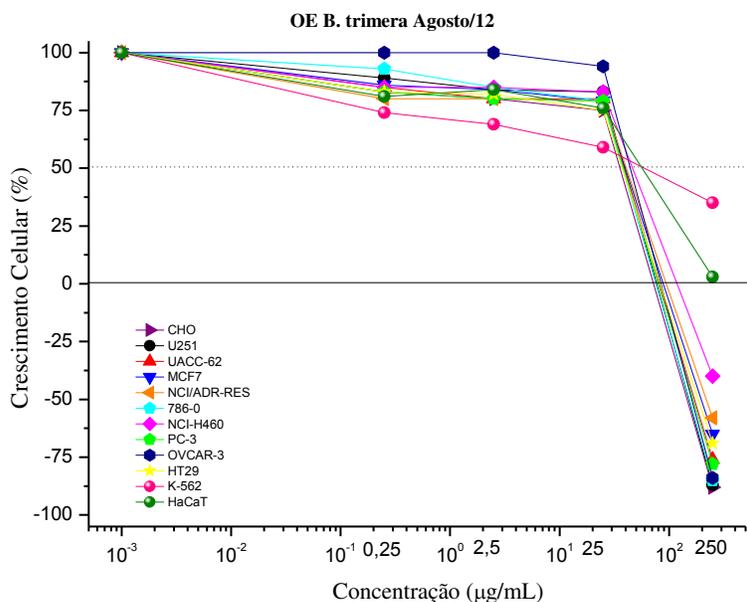
**H**

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (côlon), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). **(G)** controle do quimioterápico para análise dos OEs extraídos nos meses de Jun, Jul, Ago/12 e dos indivíduos machos e fêmeas; **(H)** OE Jun/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



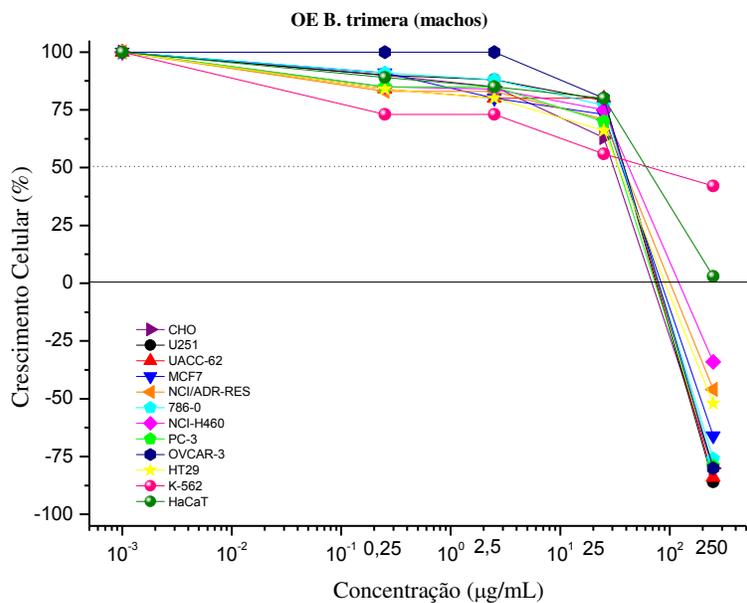
**I**



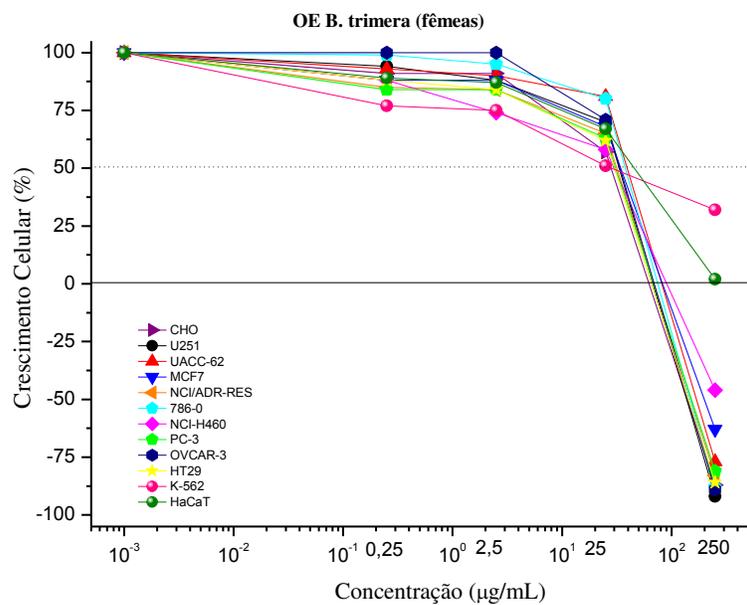
**J**

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (côlon), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). **(I)** OE Jul<sub>total</sub>/12; **(J)** OE Ago/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



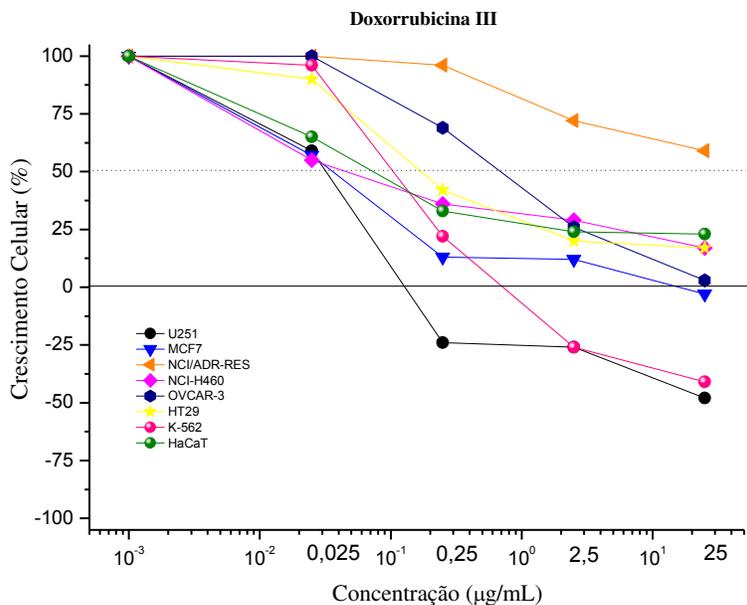
**K**



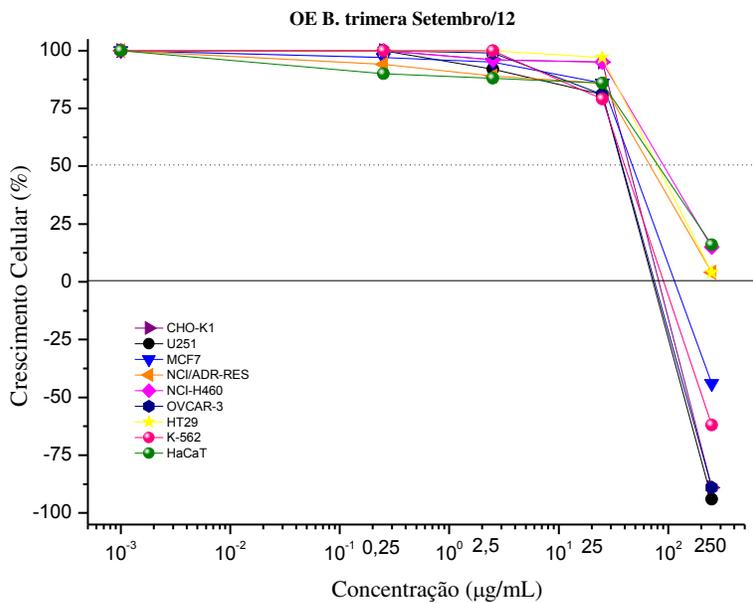
**L**

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (côlon), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). **(K)** OE Jul<sup>♂</sup>/12; **(L)** OE Jul<sup>♀</sup>/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



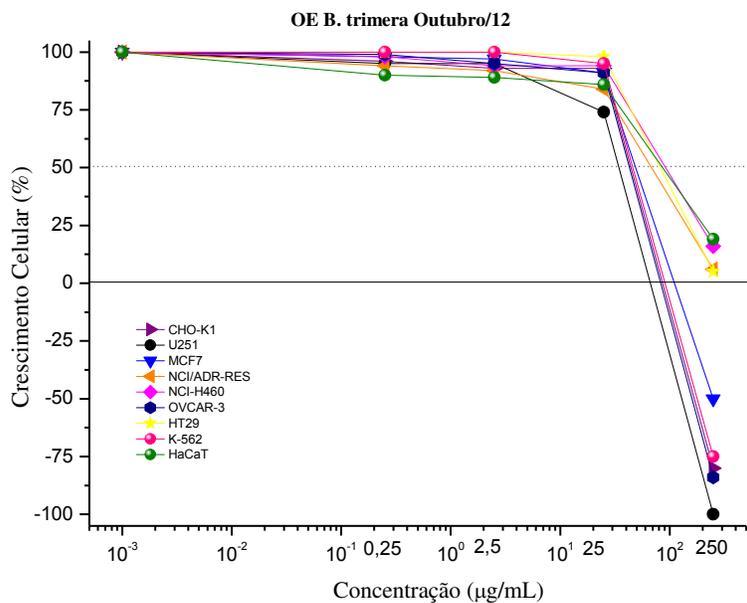
**M**



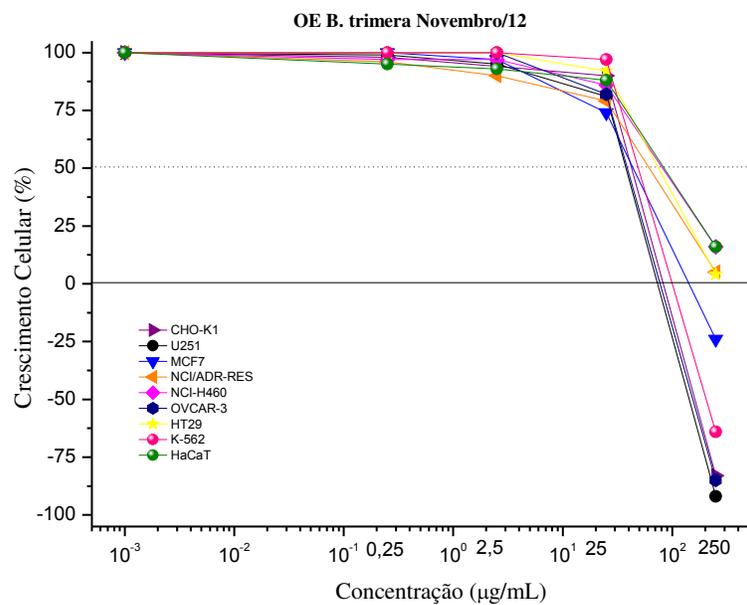
**N**

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (cólon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de *hamster* chinês). **(M)** controle do quimioterápico para análise dos OEs extraídos nos meses de Set, Out, Nov e Dez/12; **(N)** OE Set/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



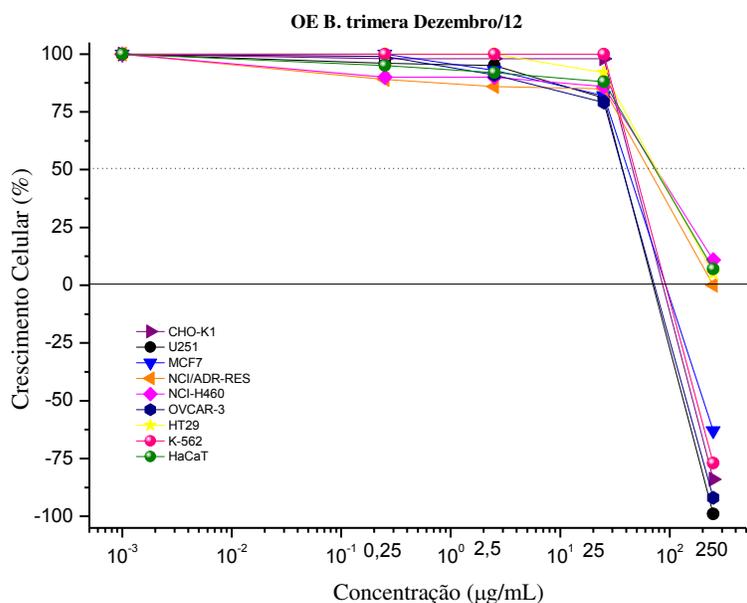
**O**



**P**

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (cólon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de hamster chinês). **(O)** OE Out/12; **(P)** OE Nov/12.

**Figura 15 (cont.):** Atividade antiproliferativa *in vitro* dos óleos essenciais em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.



Q

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano), CHO-K1 (célula epitelial de ovário de hamster chinês). (Q) OE Dez/12.

De acordo com os gráficos apresentados, foram realizados três experimentos independentes, sendo as amostras de Janeiro a Maio testadas em um primeiro experimento, enquanto as amostras de Junho, Julho e os óleos dos indivíduos fêmeas e machos foram avaliados no segundo experimento, ficando as amostras de Setembro a Dezembro para um terceiro teste, cada um deles com seu respectivo controle. Por essa razão, houve uma variação entre as linhagens que estavam disponíveis em cada um dos experimentos.

Os resultados obtidos demonstraram que todas as coletas resultaram em OEs com perfil semelhante de atividade antiproliferativa, caracterizada por atividade citocida na concentração de 250 µg/mL e ausência de atividade antiproliferativa nas concentrações de 0,25; 2,5 e 25 µg/mL.

Os valores de TGI e GI<sub>50</sub> calculados para essas amostras estão descritos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Fouche *et al.* (2008) descreveu critérios para classificação de amostras com atividade antiproliferativa de acordo com os valores médios de TGI e de GI<sub>50</sub>. Assim, com base no TGI, a atividade antiproliferativa pode ser separada em quatro categorias, a saber, inativo

(média TGI > 50 µg/mL), atividade fraca (15 µg/mL < média TGI < 50 µg/mL), atividade moderada (6,25 µg/mL < média TGI < 15 µg/mL) e atividade potente (média TGI < 6,25 µg/mL). Utilizando-se esses critérios, foi possível concluir que as amostras testadas de OEs foram inativas (média TGI > 50 µg/mL) (Tabela 5). Pela análise dos gráficos (Figuras 15A-15Q), foi possível observar que as amostras apresentaram atividade citocida apenas na maior concentração testada sem seletividade, ou seja, atuando indistintamente sobre todas as linhagens celulares. Dos valores apresentados na Tabela 5, pode-se destacar a ação citostática fraca sobre a linhagem U251 (glioma, valores de TGI iguais a 34,02; 39,84 e 49,97 µg/mL) promovida pelos OEs obtidos das folhas coletadas em Maio/12, Outubro/12 e Dezembro/12; e sobre as linhagens 786-0 (rim, TGI = 43,72 µg/mL) e UACC-62 (melanoma, TGI = 44,02 µg/mL) induzidas pelo OE obtido das folhas coletadas em Junho/12.

**Tabela 5:** Valores de TGI (em µg/mL) após o tratamento com o óleo essencial de *B. trimera* frente a linhagens tumorais e não-tumorais.

	2*	U*	M*	A*	7*	4*	P*	K*	O*	H*	Média TGI <sup>a</sup>	CaT <sup>#</sup>	CHO <sup>#</sup>
<b>Janeiro</b>	73,58	92,83	67,68			76,34	93,14	>250			>108,93 I	60,79	99,97
<b>Fevereiro</b>	70,26	66,55	64,91			91,37	54,00	>250			>99,52 I	66,26	76,61
<b>Março</b>	69,93	67,60	67,87			70,59	77,62	>250			>100,60 I	62,72	81,14
<b>Abril</b>	76,30	70,23	69,59			62,31	72,15	>250			>100,10 I	66,34	86,46
<b>Maiο</b>	<b>34,02</b>	70,27	71,25			81,83	64,35	>250			>95,29 I	92,04	84,71
<b>Doxo I<sup>**</sup></b>	1,11	0,29	0,84			0,52	1,30	>25			>4,84 P	0,34	2,47
<b>Junho</b>	68,78	<b>44,02</b>	102,31	76,70	<b>43,72</b>	135,93	68,58	>250	77,67	66,93	>93,46 I	>250	60,98
<b>Julho</b>	60,85	77,53	86,62	67,83	69,30	137,59	70,34	>250	77,66	65,28	>96,30 I	>250	61,46
<b>Agosto</b>	73,92	83,07	94,13	101,99	72,07	134,45	79,73	>250	96,67	84,68	>107,07 I	>250	65,02
<b>OE Macho</b>	70,92	74,22	85,38	106,79	79,84	132,41	69,83	>250	79,06	92,15	>104,06 I	>250	63,16
<b>OE Fêmea</b>	56,69	83,46	83,47	62,13	69,49	88,17	62,33	>250	60,55	57,47	>87,38 I	>250	53,34
<b>Doxo II<sup>**</sup></b>	0,90	0,22	1,94	>25	1,11	1,86	1,17	>25	6,15	24,85	>8,82 M	>25	1,58
<b>Setembro</b>	61,95		134,55	>250		>250		98,75	69,20	>250	>159,21 I	>250	91,36
<b>Outubro</b>	<b>39,84</b>		135,76	>250		>250		112,47	89,81	>250	>161,13 I	>250	99,74
<b>Novembro</b>	65,03		155,96	>250		>250		135,51	75,40	>250	>168,84 I	>250	89,31
<b>Dezembro</b>	<b>49,97</b>		101,30	>250		>250		207,53	63,29	>250	>167,44 I	>250	112,41
<b>Doxo III<sup>**</sup></b>	0,33		10,02	>25		>25		1,31	20,22	>25	>15,27 F	>25	

\*Linhagens celulares tumorais humanas: 2 (U251, glioma), U (UACC-62, melanoma), M (MCF-7, mama), A (NCI/ADR-res, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 7 (786-0, rim), 4 (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), P (PC-3, próstata), K (K-562, leucemia), O (OVCAR-03, ovário), H (HT-29, cólon).

#Linhagens celulares não-tumorais: CaT (HaCaT, queratinócito humano), CHO (CHO-K1, célula epitelial de ovário de hamster chinês).

\*\*Doxo: Doxorubicina – quimioterápico de referência.

<sup>a</sup> Critérios de classificação: inativo (I, média TGI > 50 µg/mL), atividade fraca (F, 15 µg/mL < média TGI < 50 µg/mL), moderada (M, 6,25 µg/mL < média TGI < 15 µg/mL) e potente (P, média TGI < 6,25 µg/mL) (Fouche *et al.*, 2008).

**Tabela 6** – Valores de GI<sub>50</sub> (em µg/mL) após o tratamento com o óleo essencial de *B. trimera* frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

	2*	U*	M*	A*	7*	4*	P*	K*	O*	H*	Média log GI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CaT <sup>#</sup>	CHO <sup>#</sup>
<b>Janeiro</b>	30,60	29,90	28,03			28,86	30,37	53,22			1,53 I	28,36	30,87
<b>Fevereiro</b>	30,86	29,70	27,86			29,11	26,79	41,96			1,49 F	26,95	28,90
<b>Março</b>	30,13	30,13	28,90			27,56	30,86	48,81			1,51 I	28,03	29,91
<b>Abril</b>	30,85	29,91	28,19			28,72	29,28	70,73			1,56 I	27,25	26,42
<b>Maió</b>	34,22	30,86	28,90			28,90	28,18	62,74			1,55 I	30,37	29,69
<b>Doxo I**</b>	0,02	0,04	0,02			0,01	0,20	0,06			-1,23 P	0,02	0,22
<b>Junho</b>	29,09	29,48	28,75	27,41	30,60	29,52	26,14	58,55	30,36	27,71	1,50 I	47,67	27,88
<b>Julho</b>	28,37	28,91	28,73	27,53	28,54	28,42	28,54	23,69	30,13	27,41	1,45 F	32,87	26,67
<b>Agosto</b>	30,13	29,49	29,29	29,31	29,29	30,13	29,29	44,10	31,33	28,54	1,49 F	46,69	28,54
<b>OE Macho</b>	29,29	29,49	28,20	27,89	28,90	28,57	27,70	75,99	29,47	27,11	1,52 I	49,90	26,66
<b>OE Fêmea</b>	27,70	27,10	25,27	26,95	29,47	26,00	26,66	30,10	25,79	26,52	1,43 F	38,15	25,85
<b>Doxo II**</b>	0,03	0,029	0,042	0,41	1,57	0,01	0,25	1,00	0,34	0,21	-0,41 P	0,03	0,12
<b>Setembro</b>	29,68		30,82	58,24		106,17		29,28	29,68	83,24	1,72 I	81,95	34,24
<b>Outubro</b>	28,35		32,42	59,70		104,65		34,25	31,01	92,73	1,74 I	88,16	33,22
<b>Novembro</b>	29,68		27,78	51,89		83,01		35,67	29,89	68,00	1,67 I	87,14	27,67
<b>Dezembro</b>	29,67		29,90	43,67		72,52		50,18	29,27	71,01	1,67 I	68,09	36,73
<b>Doxo III**</b>	0,03		0,03	>25		0,04		0,22	0,70	0,25	>0,57 M	0,08	

\*Linhagens celulares tumorais humanas: 2 (U251, glioma), U (UACC-62, melanoma), M (MCF-7, mama), A (NCI/ADR-res, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 7 (786-0, rim), 4 (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), P (PC-3, próstata), K (K-562, leucemia), O (OVCAR-03, ovário), H (HT-29, cólon).

#Linhagens celulares não-tumorais: Cat (HaCaT, queratinócito humano), CHO (CHO-K1, célula epitelial de ovário de *hamster* chinês).

\*\*Doxo: Doxorubicina – quimioterápico de referência.

<sup>a</sup> Critério de classificação: inativas (I, média log GI<sub>50</sub> > 1,50), atividade fraca (F, 1,50 > média log GI<sub>50</sub> > 1,10), moderada (M, 1,10 > média log GI<sub>50</sub> > 0) e potente (P, média log GI<sub>50</sub> < 0) (Fouche *et al.*, 2008).

Por outro lado, com base nos valores de  $GI_{50}$ , amostras inativas seriam aquelas que apresentassem valores de média do  $\log GI_{50} > 1,50$  enquanto as amostras ativas podem ser classificadas em fraca ( $1,50 > \text{média } \log GI_{50} > 1,10$ ), moderada ( $1,10 > \text{média } \log GI_{50} > 0$ ) e potente ( $\text{média } \log GI_{50} < 0$ ) (Fouche *et al.*, 2008).

Segundo esses critérios para  $GI_{50}$ , foi possível observar que os OEs obtidos de folhas coletadas nos meses de Fev/12, Jul/12, Ago/12 e o OE das plantas fêmeas apresentaram atividade citostática fraca ( $1,50 > \text{media } \log GI_{50} > 1,10$ ), sem apresentar seletividade para alguma linhagem (Tabela 6).

Búfalo *et al.* (2010) verificaram a citotoxicidade do OE de *Baccharis dracunculifolia* frente à linhagem tumoral HEP-2 (carcinoma de laringe). De acordo com os autores, o OE não apresentou efeito na viabilidade celular nas concentrações de 50, 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$ , porém, em concentrações mais altas (500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) resultou em uma ação citotóxica frente à linhagem celular, de modo concentração-dependente.

Além disso, no estudo realizado por Losqui *et al.* (2009), com diluições contendo o óleo, o solvente propilenoglicol e meio de cultura (meio 199, Gibco<sup>®</sup>), em que foi estabelecido o uso de propilenoglicol para dez vezes o volume do óleo a ser diluído, e o volume do meio 199 em quantidade suficiente para 1 mL de solução para cada placa, os autores verificaram que o OE de *B. trimera* nas diluições 1:500 e 1:1000 (v/v) possui ação inibitória na diferenciação de células neuronais, *in vitro*, após 48 horas de tratamento, com redução na sobrevivência de células neuronais e diminuição da proliferação de células gliais.

Os estudos supracitados reportaram a atividade antiproliferativa dos OEs de espécies do gênero *Baccharis*, porém, este é o primeiro relato de avaliação da atividade antiproliferativa do OE de *Baccharis trimera* frente um painel de linhagens tumorais humanas. Com relação às linhagens não-tumorais, as amostras de OEs apresentaram um perfil similar ao observado para as linhagens tumorais (Tabelas 5 e 6). Com base nesses resultados, selecionou-se a faixa de concentração de 6,25, 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  para avaliação de indução de micronúcleos em células CHO-K1.

#### **4.4. Teste de Indução de Micronúcleo**

##### **4.4.1. Padronização das condições experimentais**

De acordo com o preconizado pela OECD 487 (2010), as lâminas provenientes de culturas tratadas com citocalasina B devem possuir pelo menos 2000 células binucleadas por concentração ou 1000 células binucleadas por cultura (sendo duas culturas por concentração), do contrário, os resultados de contagem podem não ser confiáveis. A frequência de micronúcleos deve ser avaliada apenas em células binucleadas, caso a quantidade destas células seja inferior ao indicado e o aumento do número de micronúcleos não seja significativo, será necessária a repetição do teste ou a diminuição das concentrações da amostra.

A escolha das concentrações a serem testadas deve considerar os testes preliminares de proliferação celular a fim de eleger a maior concentração que não seja tóxica para as células, ou seja, que garanta viabilidade celular. Além disso, durante a análise das células binucleadas, deve-se evitar a contagem daquelas com formato irregular, núcleos de tamanhos muito diferente e principalmente, não confundi-las com células multinucleadas, células estas que podem apresentar alta frequência de micronúcleos (OECD 487, 2010).

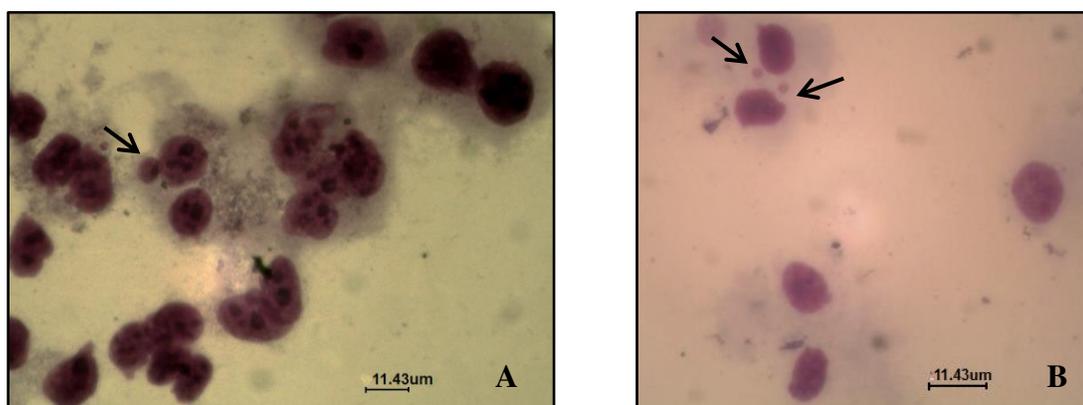
O CBPI (Índice de Proliferação Pós-Bloqueio da Citocinese) indica o número médio de ciclos que cada célula sofre durante período de exposição à citocalasina B e pode ser utilizado para calcular a proliferação celular. Além disso, o RI (Índice de Replicação) indica o número relativo de núcleos nas culturas tratadas, em comparação com o controle negativo das culturas e pode ser usado para calcular a porcentagem de células citostáticas, que corresponde à inibição do crescimento celular (Kalweit *et al.*, 1999; Fenech, 2007). Assim, o RI é uma forma de comparação do número de células binucleadas ou multinucleadas que se encontra em processo de divisão e quanto maior o seu valor, menor será a quantidade de células citostáticas, consequentemente, menor será a citotoxicidade da amostra.

O MMS foi escolhido como controle positivo de indução de MNs por ser um agente clastogênico de ação direta. Sua ação acontece em especial pela sua capacidade de alquilar moléculas nucleofílicas como o DNA, visto que todas as bases deste ácido possuem sítios susceptíveis à alquilação, especificamente no nitrogênio e oxigênio (Beranek, 1990; Moore *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 1993; Jenkins *et al.*, 2005).

Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados os resultados (CBPI, RI e frequência de micronúcleos) para as células tratadas com meio de cultura (controle negativo), DMSO (0,25%) e

MMS (25 µg/mL, agente indutor) (Figura 16). Neste primeiro experimento, foi avaliada a influência da adição ou não de formaldeído 1% à solução de citrato de sódio.

**Figura 16:** Fotomicrografias referentes aos tratamentos das células (CHO-K1) submetidas ao Teste do Micronúcleo.



(A) Lâmina correspondente ao tratamento com MMS no protocolo com formaldeído e (B) Lâmina correspondente ao MMS a partir do protocolo sem formaldeído. Coloração com solução de Giemsa 5% e MNs destacados nas setas. As fotos foram obtidas a partir da observação das lâminas ao microscópio óptico (Leica, Modelo SME), na objetiva de 40x, acompanhado de sistema de fotomicroscopia digital (Optikam B3 Digital Camera, OptikaView, Ver 7.1).

**Tabela 7:** CBPI, RI e Frequência de micronúcleo (MN) das células tratadas com meio, DMSO e MMS, hipotonia com solução de citrato de sódio e fixação com metanol:ácido acético 3:1.

Agentes	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)
Meio de cultura	1,89 ± 0,021	100	0,61 ± 0,07
MMS (25 µg/mL)	1,71 ± 0,007**	80,03**	4,95 ± 0,81**
DMSO (0,25 %)	1,89 ± 0,028	100,95	0,89 ± 0,09

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan), em relação ao controle de células em meio de cultura.

**Tabela 8:** CBPI, RI e Frequência de micronúcleo (MN) das células tratadas com meio, DMSO e MMS, hipotonia com solução de citrato de sódio + formaldeído 1% e fixação com metanol:ácido acético 3:1.

Agentes	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)
Meio de cultura	1,95 ± 0,035	100	0,62 ± 0,07
MMS (25 µg/mL)	1,66 ± 0,077*	69,26**	3,45 ± 0,51**
DMSO (0,25 %)	1,85 ± 0,028	90,5	1,05 ± 0,13

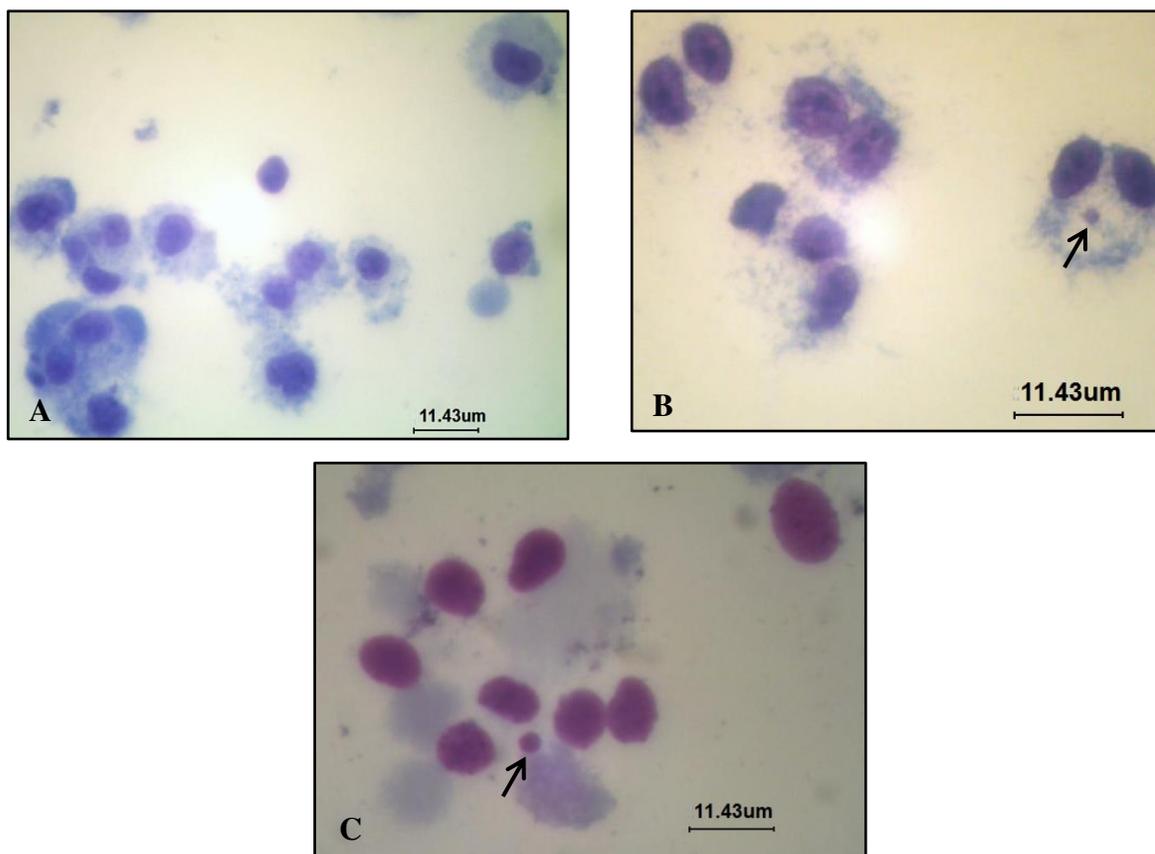
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan), em relação ao controle de células em meio de cultura.

De acordo com os resultados descritos nas Tabelas 7 e 8, foi possível concluir que as concentrações de MMS e DMSO utilizadas nos protocolos não foram citotóxicas, uma vez que os valores do CBPI são superiores a 1. Com relação ao Índice de Replicação, o controle positivo MMS apresentou valor de 69,26% no protocolo que envolveu o tratamento com formaldeído (Tabela 8), representando uma citotoxicidade de 30,74%. Este valor encontra-se ainda abaixo da faixa considerada citotóxica pela OECD 487 (2010), que determina que índices de citotoxicidade maiores que  $50 \pm 5\%$  podem induzir danos cromossômicos como efeito secundário da citotoxicidade da amostra.

Com relação à frequência de micronúcleos, como esperado, o controle positivo MMS resultou em uma frequência de micronúcleos maior em relação ao controle negativo e ao DMSO, para ambos os protocolos, sendo a frequência maior no protocolo sem utilização de formaldeído ( $4,95 \pm 0,81$ ) (Tabela 7). Dessa forma, o protocolo sem adição de formaldeído, apesar de apresentar mais etapas de centrifugação no procedimento de fixação, proporcionou a obtenção de dados mais homogêneos, com menor porcentagem de citotoxicidade das amostras e maior frequência de micronúcleos no controle positivo sugerido para o teste (Tabela 7).

Ajustado este parâmetro, avaliou-se a preparação das lâminas em diferentes temperaturas (temperatura ambiente, a 4°C e sobre atmosfera a 65 °C), a fim de melhorar o campo visual para auxiliar na análise das células (Figura 17).

**Figura 17:** Fotomicrografias das células (CHO-K1) submetidas ao Teste do Micronúcleo.



(A) Lâmina preparada a 4°C; (B) Lâmina preparada à temperatura ambiente; (C) Lâmina preparada a 65 °C. Coloração com solução de Giemsa 5% e MNs destacados nas setas. As fotos foram obtidas a partir da observação das lâminas ao microscópio óptico (Leica, Modelo SME), na objetiva de 40x, acompanhado de sistema de fotomicroscopia digital (Optikam B3 Digital Camera, OptikaView, Ver 7.1).

Como pode ser observado na Figura 17, as lâminas geladas (Fig. 17A) proporcionaram melhor conservação do citoplasma, porém a homogeneidade na cor azul do citoplasma em relação ao núcleo foi um fator que dificultou a análise das células. Já nas lâminas preparadas em temperatura ambiente (Fig. 17B), as células apresentaram citoplasma pouco evidente, porém, os resquícios azulados deste poderiam interferir na análise dos micronúcleos, uma vez que os núcleos também apresentaram tonalidade azul. Por fim, as lâminas preparadas sobre atmosfera a 65°C (Fig. 17C) resultaram em células com citoplasma pouco definido, porém, com tonalidade distinta dos núcleos (citoplasma azul e núcleo roxo), fato que auxiliou na análise das células, sendo esta a condição escolhida para os testes posteriores.

Finalmente, foi avaliada a influência da temperatura da solução de citrato de sódio 1% na eficiência do processo de hipotonia. Ao final, verificou-se que tanto a 4°C quanto à temperatura

ambiente as células não apresentaram diferenças significativas na morfologia durante a análise das lâminas. Dessa forma, a manutenção da solução de citrato de sódio à temperatura ambiente foi a condição escolhida, por permitir o uso da solução recém-preparada nos testes posteriores de avaliação do potencial mutagênico dos óleos essenciais.

#### **4.4.2. Avaliação do potencial mutagênico dos óleos essenciais**

Há relatos na literatura sobre as atividades genotóxicas e mutagênicas de *B. trimera*. Rodrigues *et al.* (2009) avaliaram as propriedades genotóxicas e antígenotóxicas do extrato aquoso de *B. trimera*, *in vivo*, por meio dos testes de MN e cometa. Segundo os autores, o extrato aquoso administrado via gavagem nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg não resultou em efeitos genotóxicos no teste cometa, porém, houve aumento na frequência de MNs, necessitando de estudos complementares para avaliação da mutagenicidade. Fachinetto e Tedesco (2009) e Pinho *et al.* (2010) evidenciaram a atividade mutagênica da infusão de *B. trimera* em teste de *Allium* cepa, com aumento também de anomalias cromossômicas em linfócitos humanos verificadas por Pinho *et al.* (2010).

Diferentemente dos testes supracitados, que avaliaram a infusão de *B. trimera*, o presente trabalho avaliou a atividade mutagênica do óleo essencial da espécie, *in vitro*, por meio do teste do MN.

#### **A. Experimento sem ativação metabólica S9**

Os OEs extraídos das folhas coletadas nos meses de Janeiro, Abril, Julho e Outubro de 2012 foram selecionados para avaliação do potencial mutagênico no teste do micronúcleo, caracterizando as estações verão, outono, inverno e primavera de 2012, respectivamente. Os valores de CBPI, RI e a frequência de MN para cada amostra estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9:** CBPI, RI e Frequência de micronúcleos dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* no experimento sem ativação metabólica.

	Amostras	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)
VERÃO	Meio de cultura	1,79 ± 0,006	100	0,73 ± 0,26
	DMSO 0,25%	1,89 ± 0,027*	113,34*	0,89 ± 0,09
	MMS 25 µg/mL	1,79 ± 0,018	101,01	3,35 ± 0,18***
	OE Janeiro 25 µg/mL	1,71 ± 0,026	89,70*	2,17 ± 0,24***
	OE Janeiro 12,5 µg/mL	1,69 ± 0,007*	87,58*	0,90 ± 0,12
	OE Janeiro 6,25 µg/mL	1,65 ± 0,065**	82,99**	0,55 ± 0,26
OUTONO	Meio de cultura	1,73 ± 0,022	100	0,67 ± 0,24
	DMSO 0,25%	1,73 ± 0,034	99,53	0,99 ± 0,11
	MMS 25 µg/mL	1,70 ± 0,033	96,81	5,70 ± 0,55***
	OE Abril 25 µg/mL	1,80 ± 0,019*	109,11*	1,45 ± 0,28*
	OE Abril 12,5 µg/mL	1,77 ± 0,023	105,23	1,16 ± 0,04
	OE Abril 6,25 µg/mL	1,78 ± 0,001	106,51	0,67 ± 0,17
INVERNO	Meio de cultura	1,87 ± 0,032	100	1,08 ± 0,10
	DMSO 0,25%	1,89 ± 0,000	102,80	1,37 ± 0,09
	MMS 25 µg/mL	1,88 ± 0,001	101,34	6,56 ± 0,42***
	OE Julho 25 µg/mL	1,84 ± 0,003	97,30	2,44 ± 0,44**
	OE Julho 12,5 µg/mL	1,85 ± 0,002	97,96	2,01 ± 0,10*
	OE Julho 6,25 µg/mL	1,80 ± 0,022*	92,57	1,34 ± 0,29
PRIMAVERA	Meio de cultura	1,77 ± 0,009	100	1,49 ± 0,37
	DMSO 0,25%	1,78 ± 0,007	101,51	1,58 ± 0,26
	MMS 25 µg/mL	1,71 ± 0,006**	93,31*	6,79 ± 0,93***
	OE Outubro 25 µg/mL	1,79 ± 0,029	103,64	3,37 ± 0,31*
	OE Outubro 12,5 µg/mL	1,76 ± 0,009	99,70	2,89 ± 0,74*
	OE Outubro 6,25 µg/mL	1,79 ± 0,010	102,66	2,76 ± 0,18

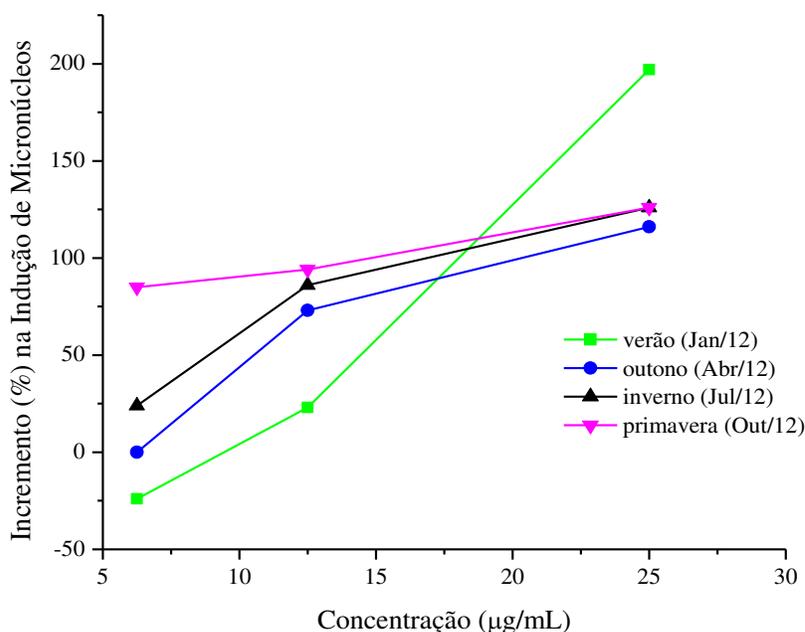
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan), em relação ao controle de células em meio de cultura.

Como apresentado na Tabela 9, todas as amostras apresentaram RI superior a 80% (citotoxicidade menor do que 20%) e CBPI acima de 1,6, dados que confirmam ausência de citotoxicidade para as concentrações testadas.

Com relação à frequência de micronúcleos, a concentração de DMSO utilizada (correspondente à quantidade empregada para diluir as amostras) não induziu a formação de MN em relação ao controle de células, enquanto o MMS elevou a frequência para 3,35 ± 0,18%, 5,70 ± 0,55, 6,56 ± 0,42 e 6,79 ± 0,93 para as amostras de Janeiro/12, Abril/12, Julho/12 e

Outubro/12, respectivamente. O OE na maior concentração (25 µg/mL) aumentou a frequência de MN, de maneira independente do mês em que as folhas foram coletadas. Por outro lado, os OEs obtidos das folhas coletadas em Julho e Outubro também foram capazes de induzir um aumento, estatisticamente significativo, da frequência de MN na concentração de 12,5 µg/mL (Tabela 9). Assim, na concentração de 6,25 µg/mL, os OEs referentes à Jul/12 e Out/12 proporcionaram um aumento na frequência de indução de MNs em cerca de 24% e 85%, respectivamente, em comparação com os controles sem tratamento; na concentração de 12,5 µg/mL, o incremento na indução de MNs para as amostras ficou entre 23% (Jan/12) e 94% (Out/12); ao passo que na concentração de 25 µg/mL, o incremento foi superior a 110% para todas as amostras, sendo o maior aumento observado para o OE de Jan/12 (197%) (Figura 18).

**Figura 18:** Incremento na indução de micronúcleos (%) em função das concentrações dos óleos essenciais.



Além disso, os OEs obtidos das folhas coletadas de indivíduos machos e fêmeas, em Julho de 2012, foram também analisados quanto à capacidade de induzir a formação de micronúcleo (Tabela 10).

**Tabela 10:** CBPI, RI e Frequência de micronúcleos dos óleos essenciais de *B. trimera* obtidos das partes aéreas de indivíduos machos e fêmeas.

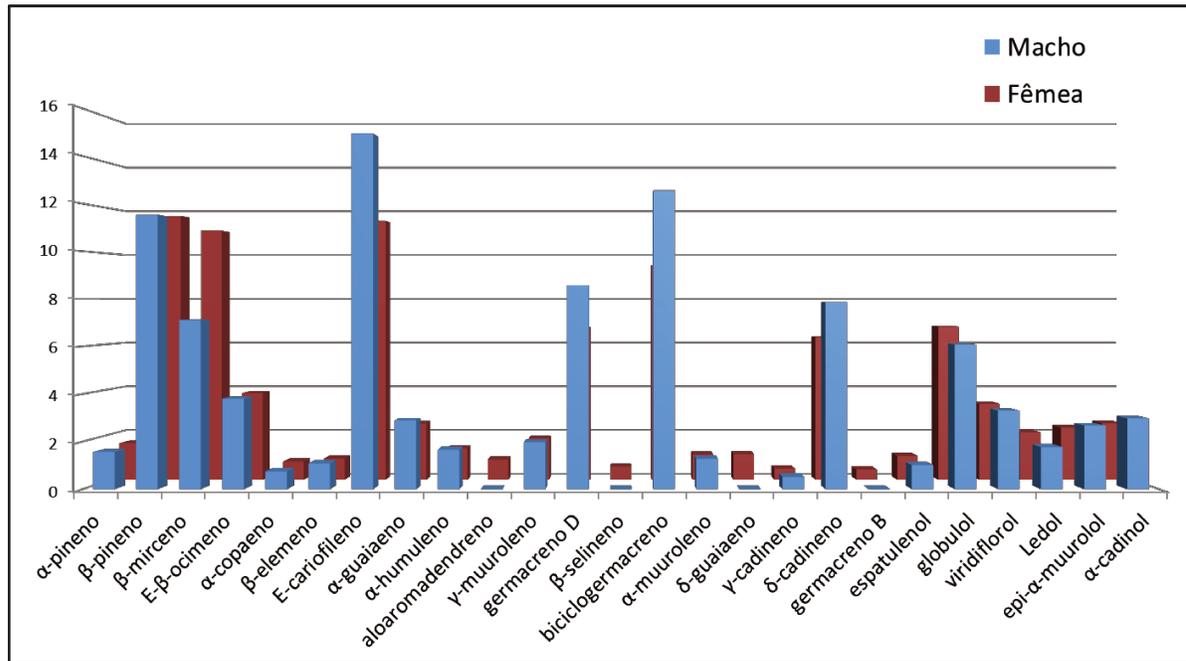
Amostras	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)
<b>Meio</b>	1,87 ± 0,032	100	1,08 ± 0,10
<b>DMSO 0,25%</b>	1,89 ± 0,000	102,80	1,37 ± 0,09
<b>MMS 25 µg/mL</b>	1,88 ± 0,001	101,34	6,56 ± 0,42***
<b>OE Machos 25 µg/mL</b>	1,88 ± 0,017	101,49	2,52 ± 0,37**
<b>OE Machos 12,5 µg/mL</b>	1,92 ± 0,006*	106,21	2,31 ± 0,23**
<b>OE Machos 6,25 µg/mL</b>	1,90 ± 0,009	104,01	2,21 ± 0,34**
<b>OE Fêmeas 25 µg/mL</b>	1,91 ± 0,051*	104,51	1,55 ± 0,08
<b>OE Fêmeas 12,5 µg/mL</b>	1,92 ± 0,012**	105,78	1,21 ± 0,31
<b>OE Fêmeas 6,25 µg/mL</b>	1,88 ± 0,009	101,69	1,08 ± 0,13

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan) em relação ao controle de células sem tratamento.

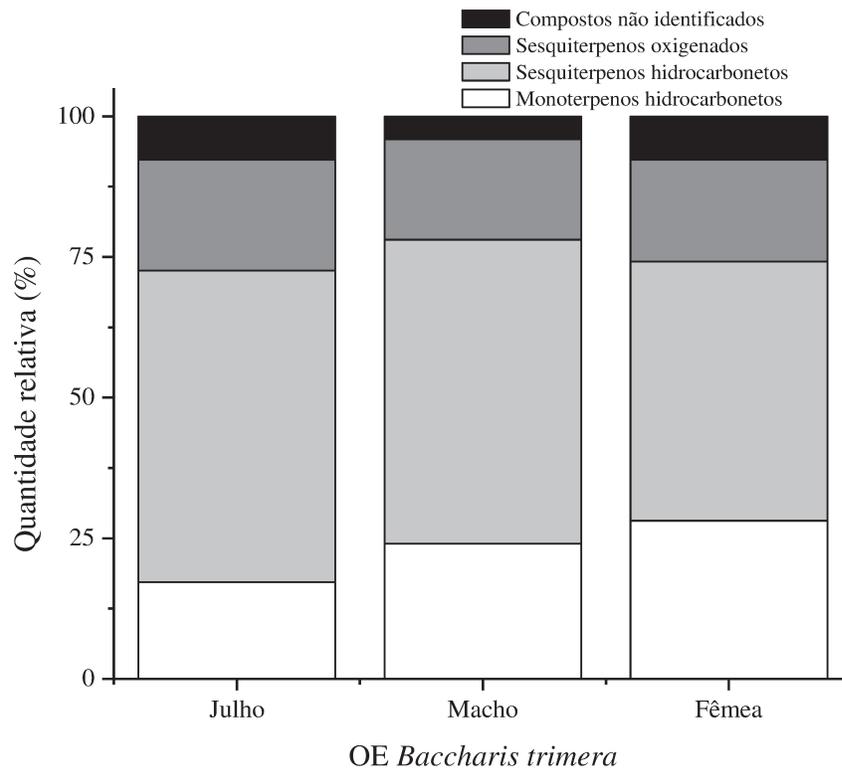
Verificou-se uma diferença significativa do potencial mutagênico entre as amostras, uma vez que o OE proveniente dos indivíduos machos apresentou elevada frequência de MN, nas três concentrações testadas, ao passo que o OE das plantas fêmeas não apresentou variação significativa na frequência de MN, inclusive na maior concentração. Assim, em relação ao meio de cultura, houve um aumento na indução de micronúcleos em cerca de 133% para o OE dos indivíduos machos e cerca de 44% para o OE das plantas fêmeas na concentração de 25 µg/mL. A análise por CG/EM (Tabela 3) dessas duas amostras apontou algumas variações na proporção dos compostos majoritários (Figura 19), as quais poderiam estar envolvidas na variação do potencial mutagênico.

Além disso, estes óleos essenciais apresentaram variações significativas na composição qualitativa quando se avalia a composição por grupo de terpenos identificados por CG/EM (Figura 20). Desta forma, pode-se sugerir que os sesquiterpenos hidrocarbonetos, que predominam nos óleos essenciais das partes aéreas das plantas machos estejam envolvidos ao efeito mutagênico observado para o óleo essencial das partes aéreas de *B. trimera*.

**Figura 19:** Compostos identificados nos óleos essenciais de plantas fêmeas e machos.



**Figura 20:** Composição relativa (%) dos óleos essenciais obtidos a partir de plantas fêmeas e machos e da coleta mista realizada em Julho de 2012.



O  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpeno comumente utilizado como agente aromatizante devido ao seu odor amadeirado e picante (Sköld *et al.*, 2006) e, além disso, mostrou-se como promissor agente anticarcinogênico (Zheng *et al.*, 1992). Di Sotto *et al.* (2008) avaliaram as atividades antimutagênica e mutagênica de alguns terpenos por meio do teste de mutação reversa em bactérias. De acordo com os autores, o  $\beta$ -cariofileno não apresentou mutagenicidade no experimento realizado e na concentração de 6,4 mg/mL, o mesmo reduziu em quase 84% o número de colônias revertentes induzidas por 2-nitrofluoreno, o que caracteriza forte atividade antimutagênica. A ausência de mutagenicidade para o composto  $\beta$ -cariofileno também foi observada em um estudo realizado por Molina-Jasso *et al.* (2009), por meio do teste de indução de MNs *in vivo*. Além disso, Di Sotto *et al.* (2010) verificaram inibição da clastogenicidade induzida por etilmetanossulfonato em culturas de linfócitos humanos pré-tratadas e co-tratadas com  $\beta$ -cariofileno nas concentrações de 0,1 a 100  $\mu$ g/mL, sendo este efeito não observado nas culturas pós-tratadas.

No teste microssomal em *Salmonella* realizado por Gomes-Carneiro *et al.* (2005), os monoterpenos  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpineno e  $\alpha$ -pineno não apresentaram mutagenicidade, tanto nos sistemas com ou sem ativação metabólica S9. Sousa *et al.* (2007) avaliaram os efeitos clastogênicos e anticlastogênicos do OE de *Casearia sylvestris* Swart. por meio do teste de aberração cromossômica em células de hepatoma. De acordo com o trabalho, os constituintes majoritários do OE foram  $\beta$ -cariofileno (27,5%) e biciclogermacreno (24,2%) e as três concentrações analisadas do OE (15, 30 e 45  $\mu$ g/mL) apresentaram efeitos clastogênicos. Porém, no experimento de anticlastogenicidade, as três concentrações do OE também apresentaram atividade protetora quando associadas ao agente mutagênico etilmetanossulfonato.

Finalmente, avaliando o potencial genotóxico e a composição química do óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth, Péres *et al.* (2009) descreveram que esse óleo essencial apresentava 4,7% de monoterpenos e fenilpropanoides, 58,1% de sesquiterpenos hidrocarbonetos, 29,5% de sesquiterpenos oxigenados e 7,7% de compostos voláteis não identificados. Esse óleo essencial induziu significativamente um aumento na frequência de micronúcleos em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês), de modo dependente da concentração, após 2 horas de exposição e em concentrações entre 4 e 10  $\mu$ g/mL.

Os resultados obtidos neste projeto em conjunto com aqueles descritos na literatura parecem sugerir que os sesquiterpenos hidrocarbonetos podem estar envolvidos na ação mutagênica de óleos essenciais.

### **B. Experimento com ativação metabólica S9**

As células do teste também foram expostas às amostras na presença de um adequado sistema de metabolização, a fração microssomal S9. A fração S9 revela se o material em teste é mutagênico em sua forma original ou necessita ser metabolizado ou ativado para se tornar mutagênico. Trata-se de uma fração pós-mitocondrial comumente utilizada, geralmente obtida a partir do fígado de roedores tratados com agentes de indução enzimática (OECD 487, 2010).

No teste proposto, optou-se pela utilização da fração S9 proveniente de fígado humano (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, S2442) a fim de reproduzir ao máximo as condições de biotransformação em humanos. Hakura *et al.* (1999) e Hakura *et al.* (2005) compararam a mutagenicidade de carcinógenos usando os sistemas S9 provenientes de fígado humano e de ratos. Os dados mostraram vantagens na utilização da fração S9 obtida a partir de fígado humano no teste de Ames e, de acordo com os autores, trata-se de uma ferramenta útil para avaliação e compreensão dos efeitos mutagênicos dessas substâncias em humanos.

De acordo com Plant (2004), um sistema de ativação metabólica que possui um maior grau de semelhança com o que ocorre na metabolização de moléculas (xenobióticos) do organismo humano beneficia e favorece a extrapolação para o valor preditivo sobre as análises de risco em mutagenicidade. Além disso, a fração hepática S9 oferece uma representação mais completa do perfil metabólico quando comparada a microssomos preparados a partir de hepatócitos. Isto porque na fração S9 encontram-se enzimas tanto da fase 1 (reações de oxidação) quanto da fase 2 (reações de conjugação) do metabolismo (Hariparsad *et al.*, 2006).

A ciclofosfamida foi o reagente escolhido como controle positivo de indução de MNs, uma vez que este reagente necessita de ativação mediada pelo citocromo P450 para observação dos seus efeitos genotóxicos (Kulka *et al.*, 1993). Trata-se de um agente alquilante inativo da classe química das mostardas nitrogenadas e um potente imunodepressor, atuando em células com alta atividade mitótica após ativação metabólica, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto celular (Sanderson *et al.*, 2001).

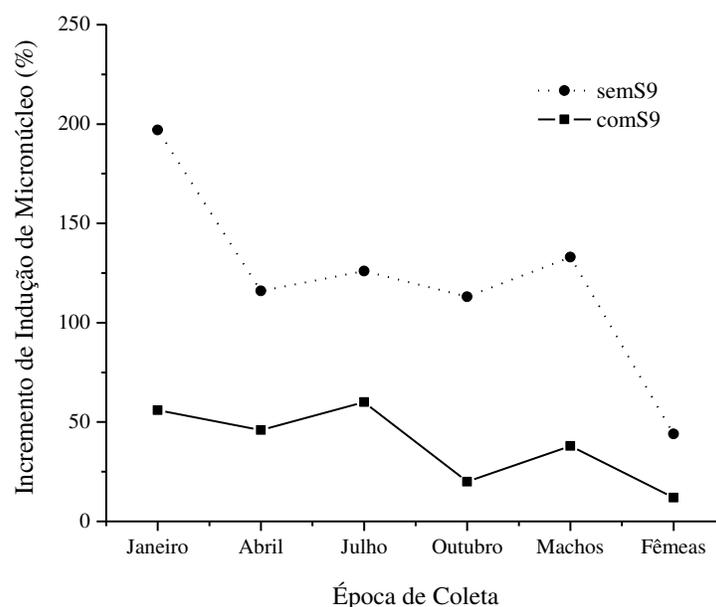
Frente às amostras com S9 (Tabela 11), o valor do RI esteve acima de 95% e CBPI acima de 1,8, fato que evidencia a credibilidade do teste no que diz respeito à ausência de citotoxicidade. A ciclofosfamida elevou a frequência de MNs para  $4,59 \pm 0,25\%$ , representando um aumento de quase 4 vezes em relação ao controle negativo ( $1,17 \pm 0,14$ ). Os OEs referentes às amostras de Jan/12, Abr/12, Jul/12 e o OE obtido a partir dos indivíduos machos apresentaram um aumento estatisticamente significativo da frequência de MNs na concentração de  $25 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 11:** CBPI, RI e Frequência de micronúcleos dos óleos essenciais de *B. trimera* no experimento com ativação metabólica.

Amostras	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)
Meio	$1,85 \pm 0,023$	100	$1,17 \pm 0,14$
DMSO 0,25%	$1,88 \pm 0,004$	103,85	$1,22 \pm 0,10$
CPA 10 $\mu\text{g/mL}$	$1,86 \pm 0,004$	101,71	$4,59 \pm 0,25^{***}$
OE Janeiro 25 $\mu\text{g/mL}$	$1,87 \pm 0,020$	102,36	$1,83 \pm 0,17^{**}$
OE Abril 25 $\mu\text{g/mL}$	$1,87 \pm 0,009$	101,88	$1,71 \pm 0,10^*$
OE Julho 25 $\mu\text{g/mL}$	$1,85 \pm 0,016$	99,65	$1,88 \pm 0,21^{**}$
OE Outubro 25 $\mu\text{g/mL}$	$1,85 \pm 0,006$	99,97	$1,41 \pm 0,15$
OE Machos 25 $\mu\text{g/mL}$	$1,88 \pm 0,019$	103,61	$1,62 \pm 0,17^*$
OE Fêmeas 25 $\mu\text{g/mL}$	$1,82 \pm 0,006$	96,82	$1,32 \pm 0,18$

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan) em relação ao controle de células sem tratamento.

**Figura 21:** Incremento de indução de micronúcleos (%) em função da época de coleta dos OEs na concentração de  $25 \mu\text{g/mL}$ , nos experimentos com e sem S9.



Embora tenha sido observado um aumento acima de 60% da frequência de MNs para os OEs de Jan/12 e Jul/12; cerca de 46% para o OE de Abr/12, 20% para o OE coletado em Out/12, 38% e 13% para os OEs dos indivíduos machos e fêmeas, respectivamente, tais percentuais foram inferiores àqueles observados no teste sem ativação metabólica (Figura 21, Tabela 12), fato que evidencia uma possível redução do potencial mutagênico dos óleos essenciais quando submetidos a um sistema de metabolização.

**Tabela 12:** Comparação entre os valores representativos da frequência de MNs nos experimentos com (S9+) e sem (S9-) ativação metabólica S9.

Amostras	Frequência de MN (%) S9+	Incremento <sup>a</sup> (%) S9+	Frequência de MN (%) S9-	Incremento (%) <sup>a</sup> S9-
<b>Meio</b>	1,17 ± 0,14		0,73 ± 0,26	
<b>DMSO 0,25%</b>	1,22 ± 0,10	4,3	0,89 ± 0,09	21,9
<b>CPA 10 µg/mL</b>	4,59 ± 0,25***	292,3	Não se aplica	
<b>MMS 25 µg/mL</b>	Não se aplica		3,35 ± 0,18***	358,9
<b>OE Janeiro 25 µg/mL</b>	1,83 ± 0,17**	56,4	2,17 ± 0,24**	197,3
<b>Meio</b>	1,17 ± 0,14		0,67 ± 0,24	
<b>DMSO 0,25%</b>	1,22 ± 0,10	4,3	0,99 ± 0,11	47,8
<b>CPA 10 µg/mL</b>	4,59 ± 0,25***	292,3	Não se aplica	
<b>MMS 25 µg/mL</b>	Não se aplica		5,70 ± 0,55***	750,7
<b>OE Abril 25 µg/mL</b>	1,71 ± 0,10*	46,2	1,45 ± 0,28*	116,4
<b>Meio</b>	1,17 ± 0,14		1,08 ± 0,10	
<b>DMSO 0,25%</b>	1,22 ± 0,10	4,3	1,37 ± 0,09	26,9
<b>CPA 10 µg/mL</b>	4,59 ± 0,25***	292,3	Não se aplica	
<b>MMS 25 µg/mL</b>	Não se aplica		6,56 ± 0,42***	507,4
<b>OE Julho 25 µg/mL</b>	1,88 ± 0,21**	60,7	2,44 ± 0,44**	125,9
<b>Meio</b>	1,17 ± 0,14		1,49 ± 0,37	
<b>DMSO 0,25%</b>	1,22 ± 0,10	4,3	1,58 ± 0,26	6,0
<b>CPA 10 µg/mL</b>	4,59 ± 0,25***	292,3	Não se aplica	
<b>MMS 25 µg/mL</b>	Não se aplica		6,79 ± 0,93***	355,7
<b>OE Outubro 25 µg/mL</b>	1,41 ± 0,15	20,5	3,37 ± 0,31*	126,2
<b>Meio</b>	1,17 ± 0,14		1,08 ± 0,10	
<b>DMSO 0,25%</b>	1,22 ± 0,10	4,3	1,37 ± 0,09	26,9
<b>CPA 10 µg/mL</b>	4,59 ± 0,25***	292,3	Não se aplica	
<b>MMS 25 µg/mL</b>	Não se aplica		6,56 ± 0,42	507,4
<b>OE Machos 25 µg/mL</b>	1,62 ± 0,17*	38,5	2,52 ± 0,37***	133,3
<b>OE Fêmeas 25 µg/mL</b>	1,32 ± 0,18	12,8	1,55 ± 0,08	43,5

<sup>a</sup> Incremento percentual em relação à frequência de micronúcleos verificada para as células sem tratamento (meio) do respectivo experimento; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan) em relação ao controle de células sem tratamento.

Esses resultados parecem sugerir que os metabólitos mais oxigenados resultantes da metabolização pelas enzimas da fração S9 das substâncias voláteis presentes no óleo essencial (e que são predominantemente hidrocarbonetos) têm um menor potencial mutagênico, já que todas as amostras de óleo essencial (Janeiro, Abril, Julho e Outubro/2012; machos e fêmeas coletados em Julho/2012) apresentaram redução significativa na indução de micronúcleos (Tabela 12, Figura 21).

Desta forma, pode-se sugerir que quando administrado a um organismo vivo, este óleo essencial pode ser metabolizado no intestino e/ou no fígado resultando em uma mistura de substâncias menos mutagênicas e, conseqüentemente, mais seguras.

#### 4.4.3. Teste de antimutagenicidade

Os valores de CBPI, RI e a frequência de MN para as amostras estão descritos nas Tabelas 13 e 14. Todas as amostras apresentaram RI superior a 90% (citotoxicidade abaixo de 10%) e CBPI acima de 1,7, dados que confirmam ausência de citotoxicidade para as concentrações e tempos de exposição testados (Tabelas 13 e 14).

**Tabela 13:** Teste de atividade antimutagênica com tratamento simultâneo (4 h).

Amostras	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)	Redução (%)
<b>Meio</b>	1,86 ± 0,030	100,00	1,17 ± 0,12	
<b>DMSO 0,25%</b>	1,86 ± 0,034	100,49	1,04 ± 0,30	
<b>MMS 25 µg/mL</b>	1,79 ± 0,023	91,83	5,77 ± 0,14***	
<b>OE <i>B.trimera</i> Julho 25 µg/mL</b>	1,84 ± 0,038	97,77	2,03 ± 0,17**	
<b>Quercetina 2,5 µg/mL</b>	1,81 ± 0,006	94,12	1,75 ± 0,11*	
<b>Quercetina + OE</b>	1,82 ± 0,006	96,15	1,29 ± 0,05	86,0 <sup>a</sup>
<b>Quercetina + MMS</b>	1,82 ± 0,017	95,38	5,79 ± 0,35***	-0,4 <sup>b</sup>
<b>OE + MMS</b>	1,86 ± 0,014	100,27	2,74 ± 0,16***	65,8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Em relação à frequência de MN apenas tratada com OE *B. trimera*; <sup>b</sup> Em relação à frequência de MN apenas tratada com MMS; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan) em relação ao controle de células sem tratamento.

**Tabela 14:** Teste de atividade antimutagênica com pré e pós-tratamento (2 h + 2 h).

Amostras	CBPI	RI (%)	Frequência de MN (%)	Redução (%) <sup>a</sup>
Meio	1,88 ± 0,011	100,00	1,07 ± 0,30	-
DMSO 0,25 %	1,86 ± 0,034	98,18	1,04 ± 0,30	-
MMS 25 µg/mL	1,90 ± 0,001	103,06	5,11 ± 0,13***	-
OE <i>B.trimera</i> Julho 25 µg/mL	1,92 ± 0,009	105,09	2,00 ± 0,17**	-
Quercetina 2,5 µg/mL	1,89 ± 0,007	101,31	1,84 ± 0,17*	-
MMS → OE	1,91 ± 0,006	103,93	2,91 ± 0,33***	54,5
MMS → Quercetina	1,90 ± 0,015	102,71	3,47 ± 0,06***	40,6
Quercetina → MMS	1,89 ± 0,027	101,69	3,89 ± 0,32***	30,2
OE → MMS	1,89 ± 0,059	101,37	3,69 ± 0,34***	35,1

<sup>a</sup> Em relação à frequência de MN apenas tratada com MMS; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA, Teste de Duncan) em relação ao controle de células sem tratamento.

Para avaliação inicial da ação antimutagênica, optou-se por estudar a maior concentração de OE de *B. trimera* que não interferia na proliferação celular, ou seja, a concentração de 25 µg/mL. Esta mesma estratégia foi empregada por Sousa *et al.* (2007) para estudo de atividade antimutagênica do OE de *Casearia sylvestris* Swart. Além disso, empregaram-se três esquemas diferentes de tratamento, incluindo o tratamento simultâneo (mistura amostra + agente indutor, exposição de 4 h), tratamento prévio (amostra 2 h seguida de agente indutor por 2 h) e posterior (agente indutor por 2 h seguida por amostra 2 h) ao agente indutor de MN (Poersch *et al.*, 2007).

Neste experimento, o MMS elevou a frequência de MNs para  $5,77 \pm 0,14\%$  no tratamento simultâneo (4 h de exposição) e para  $5,11 \pm 0,13\%$  no pré e pós-tratamentos (2 h de exposição), representando um aumento de quase 5 vezes em relação aos respectivos controles negativos (meio e DMSO). No tratamento simultâneo (Tabela 13), o óleo essencial de Julho na concentração de 25 µg/mL, quando combinado com o indutor de MNs, reduziu em 65,8% a frequência de MNs em relação ao controle de células, fato que sugere um possível efeito protetor do óleo essencial. Por outro lado, quando o óleo essencial foi adicionado sobre as células após duas horas de exposição ao MMS, observou-se uma redução de 54,5% na incidência de MNs enquanto o tratamento prévio por duas horas com o OE Jul/12 seguido pelo tratamento das células com MMS, a redução observada foi de apenas 35,1% (Tabela 14).

Esses resultados sugerem que o óleo essencial não apresenta um efeito preventivo, mas pode ser mais eficiente na reversão de danos causados por agentes genotóxicos ou mutagênicos.

Segundo Bhattacharya (2011), os principais mecanismos de ação antimutagênica envolvem inibição ou indução enzimática (tanto fase 1 quanto fase 2), inativação química, adsorção e atividade antioxidante. Por isso, para verificar se seria possível bloquear a indução de micronúcleos por MMS através de um agente antioxidante, avaliou-se o flavonoide quercetina, na concentração 2,5 µg/mL. Nas condições em que o experimento foi realizado, não foi possível evidenciar essa atividade protetora do flavonoide na presença do MMS de maneira conclusiva, uma vez que no tratamento simultâneo não houve alteração significativa na frequência de micronúcleos (Tabela 13), enquanto tanto o tratamento prévio (redução de 30,2%) quanto o pós-tratamento (40,6% de redução) levaram a uma pequena diminuição na frequência de micronúcleos induzida pelo MMS (Tabela 14).

Por outro lado, o tratamento simultâneo das células com quercetina (2,5 µg/mL) e óleo essencial Jul/12 (25 µg/mL) resultou em uma redução de 86,0% na frequência de MN induzida pelo OE, sugerindo um potencial efeito protetor (Tabela 13).

## 5. CONCLUSÃO

---

A análise por CG/EM indicou que as amostras apresentaram como compostos majoritários biciclogermacreno (12,64% a 22,18%), *E*-cariofileno (12,14% a 16,72%), germacreno D (7,03% a 14,15%),  $\beta$ -pineno (4,98% a 10,66%), globulol (3,68% a 7,62%),  $\beta$ -mirceno (2,39% a 7,40%) e  $\delta$ -cadineno (5,11% a 6,56%), com uma variação na proporção relativa dos compostos presentes nos óleos obtidos das plantas fêmeas em relação aos machos.

No teste de atividade antiproliferativa em linhagens tumorais e não-tumorais, observou-se um perfil de atividade citostática semelhante para todas as amostras, independente da variação química observada, o que sugere pouca eficiência do óleo essencial na reversão de eventos que perfazem a etapa de progressão do processo de proliferação celular, sendo mais eficaz na diminuição ou possível reversão de danos genéticos na etapa de iniciação, como foi observado no teste preliminar de antimutagenicidade.

Na avaliação do potencial mutagênico através da indução de MNs, os OEs coletados no verão (Jan/2012), outono (Abr/2012), inverno (Jul/2012) e primavera (Out/2012) induziram um aumento na frequência de micronúcleos, em relação ao controle de células sem tratamento, para a maior concentração (25  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo que os OEs obtidos no inverno (Jul/2012) e primavera (Out/2012) também apresentaram indução de MNs, estatisticamente significativa, na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Além disso, verificou-se que as plantas fêmeas não apresentaram potencial mutagênico nas três concentrações testadas (6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ), ao passo que o OE obtido a partir dos indivíduos machos induziu aumento na frequência de MN nas mesmas concentrações avaliadas. Esses resultados, em conjunto com dados descritos na literatura, parecem sugerir que os sesquiterpenos hidrocarbonetos que predominam nos óleos essenciais das partes aéreas das plantas machos podem estar envolvidos na ação mutagênica dos óleos essenciais.

Assim, estes resultados sugerem uma possível atividade mutagênica do OE das partes aéreas de *B. trimera*, em concentrações acima de 25  $\mu\text{g/mL}$ , com diferença significativa no potencial indutor de MN entre indivíduos machos e fêmeas. Por outro lado, no experimento com ativação metabólica, verificou-se uma indução inferior na frequência de micronúcleos em relação aos dados obtidos no teste sem ativação, fato que demonstra possível redução da mutagenicidade dos OEs após metabolização pelo sistema de ativação S9.

Nesta triagem inicial *in vitro* de eficácia e segurança, o óleo essencial de *B. trimera* apresentou um efeito indutor de micronúcleos inferior quando comparado ao controle MMS, efeito este reduzido significativamente quando há um sistema de metabolização. Embora não tenha sido observado efeito significativo na etapa de progressão do crescimento das células tumorais, evidenciou-se no pós-tratamento e no tratamento simultâneo com o óleo essencial e o MMS uma possível reversão ou redução da clastogenicidade causada pelo indutor de MNs.

Uma vez que o óleo essencial da carqueja apresenta um promissor uso medicinal no tratamento da infecção por *Schistosoma mansoni*, estes resultados sugerem a necessidade de testes complementares para avaliação do potencial mutagênico do OE e seus mecanismos de ação, bem como, uma investigação detalhada do perfil químico para estabelecer a relação entre a composição química e a segurança de uso, como também, indicações sobre um potencial uso quimiopreventivo.

## 6. REFERÊNCIAS

---

- Aardema MJ, Snyder RD, Spicer C, Divi K, Morita T, Mauthe RJ, Gibson DP, Soelter S, Curry PT, Thybaud V, Lorenzon G, Marzin D, Lorge E (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research* **607**: 61-87.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 807 p.
- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**: 114-140.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **18**: 472-508.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A (2000). IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Research* **463**: 111-172.
- Albertini S, Miller B, Chetelat AA, Locher F (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research* **392**: 187-208.
- Alonso J. Fitomedicina: curso para profissionais da área da saúde. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2008. p. 28-33.
- Avancini CAM, Wiest JM, Mundstock E (2000). Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) DC., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **52**: 230-234.
- Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo AM, Padovani CR, Ribeiro LR, Salvadori DM (2003). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 1671-1676.
- Bara MTF, Vanetti MCD (1998). Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **7-8**: 22-34.
- Bast A, Chandler RF, Choy PC, Delmulle LM, Gruenwald J, Halkes SBA, Keller K, Koeman JH, Peters P, Przyrembel H, de Ree EM, Renwick AG, Vermeer ITM (2002). Botanical health

- products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **12**: 195–211.
- Beranek DT (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research* **231**: 11–30.
- Bhattacharya S (2011). Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant* **5**: 116-126.
- Biavatti M, Marensi V, Leite SN, Reis A (2007). Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**: 640-653.
- Biondo TM, Tanae MM, Coletta ED, Lima-Landman MT, Lapa AJ, Souccar C (2011). Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology* **136**: 368–373.
- Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, Heikkilä P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen IL, Knudsen LE, Norppa H (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Research* **60**:1619-1625.
- Botham PA (2004). Acute systemic toxicity – prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in vitro* **18**: 227-230.
- Búfalo MC, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforcin JM (2010). *In vitro* cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Natural Product Research* **24**: 1710–1718.
- Calixto JB (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**: 179-189.
- Cancelli RR, Evadt ACP, Bauermann SG (2007). Contribuição a Morfologia Polínica da Família Asteraceae Martinov no Rio Grande do SUL- RS. *Pesquisas, Botânica* **58**: 347-374.
- Cariddi L, Escobar F, Sabini C, Torres C, Reinoso E, Cristofolini A, Comini L, Núñez Montoya S, Sabini L (2012). Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 155-161.

- Carneiro MAA, Fernandes GW, Souza Og FF de, Souza WVM (2006). Sex-mediated herbivory by galling insects on *Baccharis concinna* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **50**: 394-398.
- Chen C, Kong A-NT (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **36**: 1505-1516.
- Cipollini ML, Whigham DF (1994). Sexual dimorphism and cost of reproduction in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *American Journal of Botany* **81**: 65–75.
- Clare G, Lorenzon G, Akhurst LC, Marzin D, van Delft J, Montero R, Botta A, Bertens A, Cinelli S, Thybaud V, Lorge E (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research* **607**: 37-60.
- Corrêa MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, v. 2, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. 707 p.
- Corvi R, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D, Pfuhrer S, van Benthem J, Vanparys P (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis* **23**: 271-283.
- Costa RJ, Diniz A, Mantovani MS, Jordão BQ (2008). *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *Journal of Ethnopharmacology* **118**: 86–93.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews* **109**: 3012-3043.
- Cragg GM, Newman DJ (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **75**: 311-335.
- Dearfield KL, Cimino MC, Mccarroll NE, Mauer I, Valcovic LR (2002). Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research* **521**:121-135.
- Della Torre A, Albuquerque LBL, Farrapo NM, Oshima-Franco Y, Santos MG, Tavares RVS, Rodas ACD, Dal Belo CA, Cardoso CRP, Varanda EA, Groppo FC, Lopes PS (2011). Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **17**: 190–198.
- Denny C, Zacharias ME, Kohn LK, Foglio MA, Carvalho JE (2007). Antiproliferative activity of extracts and fractions from *Virola sebifera* Aubl. leaves (Myristicaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **17**: 598-603.

- Denny C, Zacharias ME, Ruiz ALTG, Amaral MCE, Bittrich V, Kohn LK, Sousa IMO, Rodrigues RAF, Carvalho JE, Foglio MA (2008). Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. *Phytotherapy Research* **22**: 127–130.
- Denny WA. The contribution of synthetic organic chemistry to anticancer drug development. In: Baguley BC, Kerr D. *Anticancer drug development*. San Diego: Academic Press, 2002. p. 187-202.
- Di Sotto A, Evandri MG, Mazzanti G (2008). Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutation Research* **653**: 130-133.
- Di Sotto A, Mazzanti G, Carbone F, Hrelia P, Maffei F (2010). Inhibition by  $\beta$ -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research* **699**: 23-28.
- Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz M Jr, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS (2002). Medicinal plants popularly used in Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**: 69-91.
- Diaz D, Scott A, Carmichael P, Shi W, Costales C (2007). Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutation Research* **630**: 1-13.
- Diaz LA Jr (2005). The current clinical value of genomic instability. *Seminars in Cancer Biology* **15**: 67-71.
- Dickel ML, Rates SMK, Ritter MR (2007). Plants popularly uses for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **109**: 60-71.
- dos Santos VC, Longo TB, Garcia AL, Richter MF, Guecheva TN, Henriques JA, Ferraz Ade B, Picada JN (2013). Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneaceae), an Amazon plant with medicinal properties. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **76**: 381-390.
- Doyle A, Griffiths JB. *Cell and tissue culture: laboratory procedure in biotechnology*. New York: Jonh Wiley & Sons Ltd., 1998 .352p.
- ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. Disponível em: <<http://ecvam.jrc.it/index.htm>>. Acesso em: 02 outubro 2012.

- Elhajouji A, Lorge E (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research* **607**: 1-152.
- Erdtmann B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Ed. Alcance, 2003. p. 21-48.
- ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review. Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test: Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponível em: <<http://ecvam.jrc.it/index.htm>>. Acesso em 02 outubro 2012.
- Esteves-Pedro NM, Borim T, Nazato VS, Silva MG, Lopes PS, dos Santos MG, Dal Belo CA, Primila Cardoso CR, Varanda EA, Groppo FC, Gerenutti M, Oshima-Franco Y (2012). *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**: 1-9.
- Esteves-Pedro NM, Rodas AC, Dal Belo CA, Oshima-Franco Y, dos Santos MG, Lopes PS (2011). Implementation of the three Rs in the human hazard assessment of Brazilian medicinal plants: an evaluation of the cytotoxic and genotoxic potentials of *Dipteryx alata* Vogel. *Alternatives to Laboratory Animals* **39**: 189-196.
- Fachinetto JM, Tedesco SB (2009). Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **11**: 360-367.
- Falck G, Catalán J, Norppa H (1997). Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutation Research* **392**: 71-79.
- Fenech M (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research* **391**: 11-18.
- Fenech M (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* **455**: 81-95.
- Fenech M (2005). *In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine* **111**: 3-32.
- Fenech M (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* **600**: 58-66.

- Fenech M (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* **2**: 1084-1104.
- Fenech M, Crott JW (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research* **504**: 131–136.
- Fonseca CC, Pereira DG (2004). Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma* **16**: 51-54.
- Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, Senabe J (2008). *In vitro* anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* **119**: 455-461.
- Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ (1991). Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **86**: 137-139.
- Garriott ML, Phelps JB, Hoffman WP (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research* **517**: 123-134.
- Gebhart E (1992). Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research* **267**: 211-220.
- Gené RM, Cartarana C, Adzet T (1992). Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Medica* **58**: 565-566.
- Gené RM, Cartarana C, Adzet T, Marin E, Parella T, Canigual S (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Medica* **62**: 232-235.
- Gomes-Carneiro MR, Viana ME, Felzenszwalb I, Paumgarten FJ (2005). Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alpha-pinene in the *Salmonella*/microsome assay. *Food and Chemical Toxicology* **43**: 247-52.
- Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **27**: 1–93.
- Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the

- European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Research* **58**: 4117-4121.
- Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, Satoh T (2005). *Salmonella*/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* **20**: 217–228.
- Hakura A, Suzuki S, Satoh T (1999). Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutation Research* **438**: 29–36.
- Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB (2006). *In vitro* methods in human drug biotransformation research: Implications for cancer chemotherapy. *Toxicology in Vitro* **20**: 135-153.
- Hashimoto K, Nakajima Y, Matsamura S, Chatani F (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **59**: 28-36.
- Heddle JA, Benz RD, Countryman PI. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: Evans HJ, Lloyd DC. (Eds). *Mutagen-Induced Chromosome damage in Man*. Edinburgh: University Press, 1978. p. 191-200.
- Heddle JA, Carrano AV (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research* **44**: 63-69.
- Honma M, Hayashi M (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **52**: 373-384.
- Horn RC, Vargas VMF (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. *Toxicology in Vitro* **22**: 1043–1049.
- Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* **42**: 377-387.
- Jenkins GJ, Doak SH, Johnson GE, Quick E, Waters EM, Parry JM (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* **20**: 389–398.
- Kalweit S, Utesch U, von der Hude W, Madle S (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research* **439**: 183-190.

- Kanai Y (2008). Alterations of DNA methylation and clinical pathological diversity of human cancers. *Pathology International* **58**: 544-558.
- Kashino G, Prise KM, Schettino G, Folkard M, Vojnovic B, Michael BD, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M (2004). Evidence for induction of DNA double strand breaks in the bystander response to targeted soft X-rays in CHO cells. *Mutation Research* **556**: 209–215.
- Keepers YP, Pizao EP, Peters G J, Van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM (1991). Comparison of the sulphorhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer* **27**: 897-900.
- Kersten B, Zhang J, Brendler Schwaab SY, Kasper P, Müller L (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity *Mutation Research* **445**: 55-71.
- Khan IA (2006). Issues related to botanicals. *Life Sciences* **78**: 2033-2038.
- Kirkland D (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): summary of results in the collaborative trial. *Mutation Research* **702**: 139-147.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Lorge E, Norppa H, Surralles J, von der Hude W, Wakata A (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**: 167-172.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr., Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research* **540**: 153-163.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Decordier L (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research* **504**:137-148.
- Kohn LK, Pavam CH, Veronese D, Coelho F, Carvalho JE, Almeida WP (2006). Antiproliferative effect of Baylis-Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**: 738-744
- Korbes CV. Manual de plantas medicinais. 48. ed. Francisco Beltrão: Grafitec, 1995. p.15-23.

- Kricher JC. The neotropical pharmacy. In: A neotropical companion. An introduction to animals, plants and ecosystems of the New World tropics. 2. ed. New Jersey: Princeton University Press, 1997. p.144-168.
- Kulka U, Doehmer J, Glatt HR, Bauchinger M (1993). Cytogenetic effects of promutagens in genetically engineered V79 Chinese hamster cells expressing cytochromes P-450. *European Journal of Pharmacology* **228**: 299–304.
- Kuroda Y, Jain AK, Tezuka H, Kada T (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research* **267**: 201-209.
- Ladeira AM. Plantas medicinais com óleos essenciais. São Paulo: Instituto de Botânica, 2002. 39 p.
- Lago JHG, Romoff P, Fávero AO, Souza FO, Soares MG, Baraldi PT, Corrêa AG (2008). Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**: 737–740.
- Lee RF, Steinert S (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/Comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* **544**: 43–64.
- Lewinska A, Wnuk M, Slota E, Bartosz G (2007). Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **34**: 781-786.
- Longato GB, Rizzo LY, Sousa IM, Tinti SV, Possenti A, Figueira GM, Ruiz AL, Foglio MA, de Carvalho JE (2011). *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoide-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. *Planta Medica* **77**: 1482-1488.
- Lorenzi HE, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- Lorge E, Thybaud V, Aardema MJ, Oliver J, Wakata A, Lorenzon G, Marzin D (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research* **607**: 13-36.
- Losqui YR, Rozete FSS, Almeida MB, Bittencourt AHC, Pereira SPF (2009). Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**: 931-936.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga JRVF (2002). Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* **25**: 429-438.

- Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F (2001). Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research* **489**: 147-172.
- Manteiga R, Park DL, Ali SS (1997). Risks associated with consumption of herbal teas. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* **150**:1-30.
- Martindale JL, Holbrook NJ (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* **192**:1-15.
- Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas Mediciniais. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995. 220 p.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* **88**: 1515-1531.
- Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M Jr, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* **14**: 569-580.
- Mendes FR, Tabach R, Carlini EA (2007). Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytotherapy Research* **21**: 517-522.
- Menoli RCRN, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordão BQ (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Research* **496**: 5-13.
- Miller B, Albertini S, Locher F, Thybaud V, Lorge E (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research* **392**: 45-59.
- Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research* **410**: 81-116.
- Molina-Jasso D, Alvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E (2009). Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **32**: 520-2.

- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**: 757-766.
- Moore MM, Parker L, Huston J, Harrington-Brock K, Dearfield KL (1991). Comparison of mutagenicity results for nine compounds evaluated by HGPRT locus in standard and suspension CHO assays. *Mutagenesis* **6**: 77-85.
- Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. Medicinal plants of Brazil. Michigan: Reference Publications, 2000. 501 p.
- Nakasugi T, Komai K (1998). Antimutagens in the Brazilian folk medicinal carqueja (*Baccharis trimera* Less). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 2560-3564.
- OECD (2010). Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264091016-en.
- Ojopi EPB, Neto ED. Genômica e Oncologia. In: Mir, L. (Org.). Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 364-385.
- Oliveira AC, Endringer DC, Amorim LA, Das Graças LBM, Coelho MM (2005). Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology* **102**: 465-469.
- Oliveira RN, Oliveira ASS, Rehder VLG, Montanari I Jr, Jeraldo VLS, Linhares AX, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Allegretti SM (2012). *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less.) DC. *Experimental Parasitology* **132**:135-143.
- Oliver J, Meunier J-R, Awogi T, Elhajouji A, Ouldelhkim M-C, Bichet N, Thybaud V, Lorenzon G, Marzin D, Lorge E (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research* **607**: 125-152.
- Pádua BC, Silva LD, Rossoni Júnior JV, Humberto JL, Chaves MM, Silva ME, Pedrosa ML, Costa DC (2010). Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology* **129**: 381-386.
- Pavan AG (1952). *Baccharis trimera* Less. (carqueja-amarga) uma planta da medicina popular brasileira. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo* **108**: 223-228.

- Pedrazzi AHP, Rodriguez ER, Zanardo-Filho A (1997). Hematological evaluation of carqueja (*Baccharis trimera*) infusion. *Fitoterapia* **68**: 26-26.
- Péres VF, Moura DJ, Sperotto ARM, Damasceno FC, Caramão EB, Zini CA, Saffi J (2009). Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology* **47**: 2389–2395.
- Pezzuto J (1997). Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* **53**: 121-133.
- Pinho DS, Sturbelle RT, Martino-Roth MG, Garcias GL (2010). Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **20**: 165-170.
- Plant N (2004). Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism. *Drug Discovery Today* **9**: 328-336.
- Poersch A, dos Santos FV, Maciel MAM, da Câmara JKP, Dantas TNC, Cólus IMS (2007). Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents *in vitro*. *Mutation Research* **629**: 14-23.
- Preston RJ, Deon BJ, Galloway S, Holden H, McFee AF, Shelby M (1987). Analysis of chromosomes aberration in bone marrow cells. *Mutation Research* **189**: 157-165.
- Preston RJ. Short/medium term carcinogenicity tests and genetic and related effects. IARC Meeting – Lyon, 1997.
- Rabello-Gay MN, Rodrigues MAR, Monteleone-Neto R. Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 246 p.
- Rates SMK (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon* **39**: 603-613.
- Raymundo TM, Favilla M, Niero R, Andrade SF, Maistro EL (2012). Genotoxicity of the medicinal plant *Maytenus robusta* in mammalian cells *in vivo*. *Genetics and Molecular Research* **11**: 2847-2854.
- Rebouças Sde O, da Silva J, Bertoni RS, Decker N, Santos MS, Rossatto RR, Corrêa DS, Ferraz AB (2013). Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* **147**: 474-480.

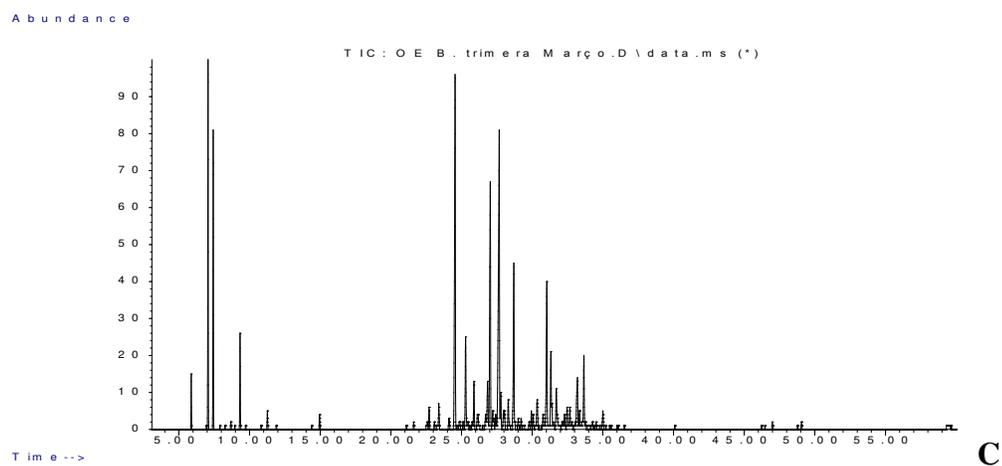
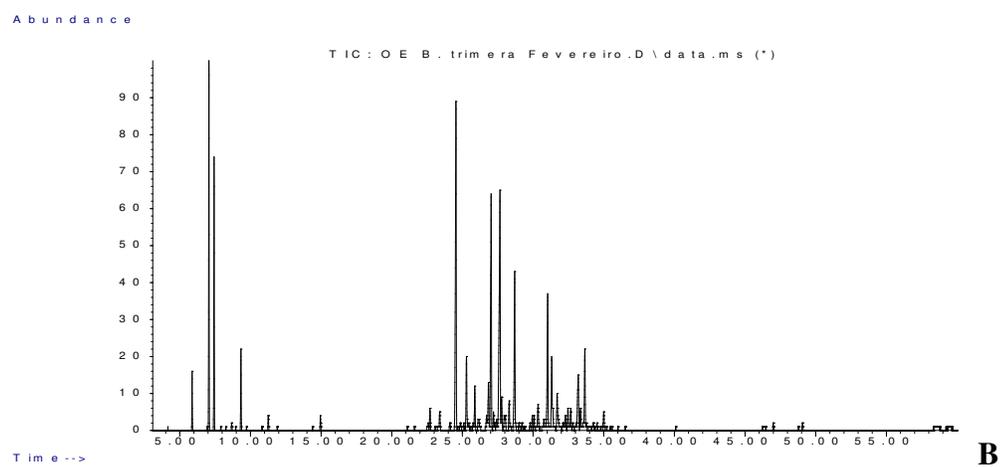
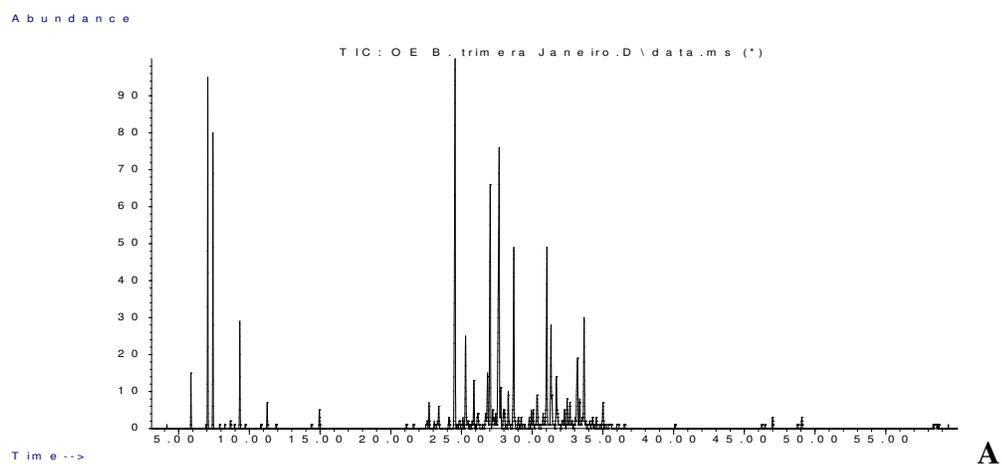
- Resende FA, Munari CC, Neto MABM, Tavares DC, Bastos JK, Filho AAS, Varanda EA (2012). Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules* **17**: 2335-2350.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese Ambiental. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003. 355p.
- Robotin MC (2011). Botanical products in the 21st century: from whence to whither. *Cancer Forum* **35**: 6-9.
- Rodrigues CR, Dias JH, de Mello RN, Richter MF, Picada JN, Ferraz AB (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **125**: 97-101.
- Rodrigues RAF, Carvalho JE, Sousa IMO, Antônio MA, Pizão PE, Kohn LK, Amaral MCE, Bittrich V, Foglio MA (2011). Antiproliferative activity, isolation and identification of active compound from *Gaylussacia brasiliensis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **21**: 622-626.
- Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR (1990). Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **82**: 1113-1118.
- Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE (2008). Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **41**: 411-415.
- Samanta S, Dey P (2010). Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology* **40**: 84-90.
- Sanderson BJS, Kara JJ, Henner WD (2001). Induction of mutant lymphocytes in cyclophosphamide- and chlorambucil-treated patients. *Mutagenesis* **16**: 197-202.
- Santos FJ, Moura DJ, Péres VF, Sperotto AR, Caramão EB, Cavalcante AA, Saffi J (2012). Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platypetala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology* **144**: 474-482.
- Santos GS (2011). Avaliação do efeito radiomodificador da própolis em células de ovário de *hamster* chinês (CHO-K1) e em células tumorais de próstata (PC3), irradiadas com Co-60.

- Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CNEM/SP.
- Santos RA, Cabral TR, Cabral IR, Antunes LMG, Andrade CP, Santos PCC, Bahia MO, Pessoa C, Nascimento JLM, Burbano RR, Takarashi CS (2008). Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. *Biocell* **32**: 195-200.
- Schimmer O, Kühne I (1990). Mutagenic compounds in an extract from *Rutea Herba* (*Ruta graveolens* L.) II. UV-A mediated mutagenicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by furoquinoline alkaloids and furocoumarins present in a commercial tincture from *Rutea Herba*. *Mutation Research* **243**: 57-62.
- Schmid W (1975). The micronucleus test. *Mutation Research* **31**: 9-15.
- Serpeloni JM, Barcelos GRM, Mori MP, Yanagui K, Vilegas W, Varanda EA, Cólus IMS (2011). Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an *in vitro* analysis. *Experimental and Toxicologic Pathology* **63**: 499-504.
- Shoemaker RH (2006). The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* **6**: 813-823.
- Silva FG, Oliveira CBA, Pinto JEBP, Nascimento, VE, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH (2007). Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18**: 990-997.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* **82**: 1107-1118.
- Sköld M, Karlberg AT, Matura M, Börje A (2006). The fragrance chemical betacaryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology* **44**: 538-545.
- Snustad DP, Simmons MJ. Fundamentos de Genética. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 778 p.
- Soicke H, Leng-Peschlow E (1987). Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica* **53**: 37-9.

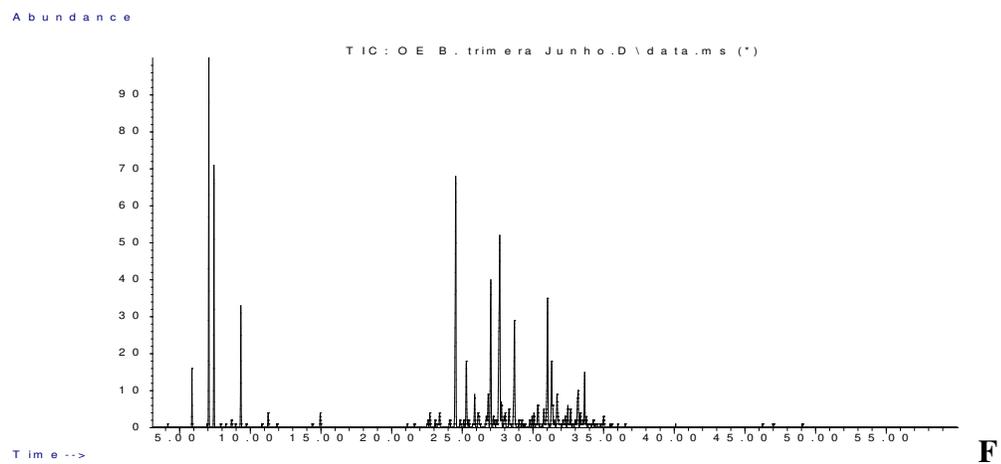
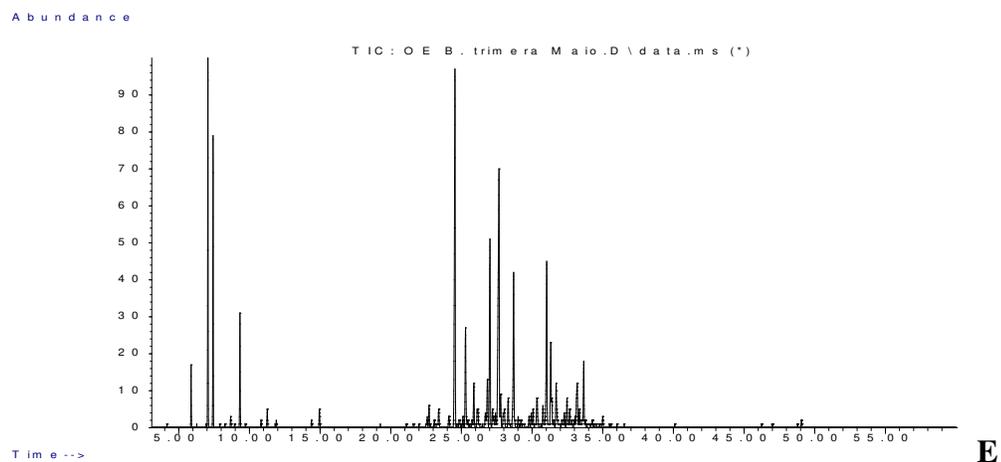
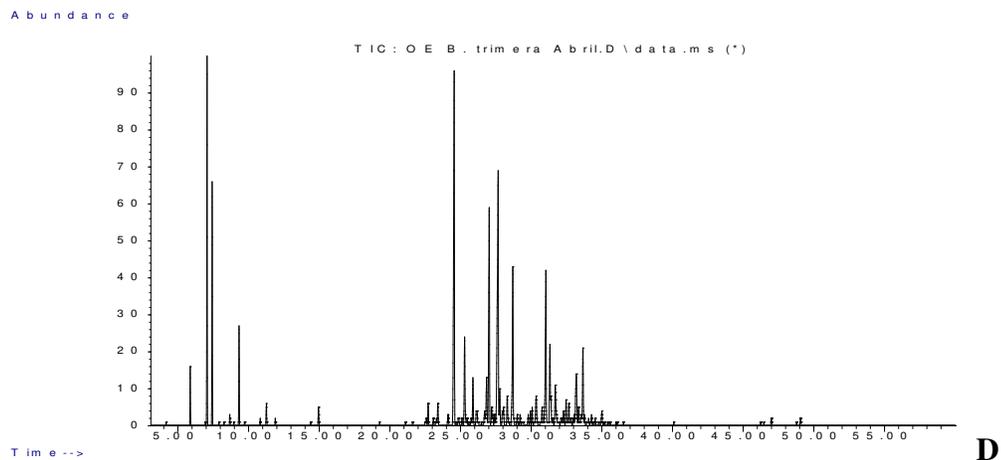
- Sousa FG, Schneider NFZ, Mendes CE, Moura NF, Denardin RBN, Matuo R, Mantovani MS (2007). Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. *Journal of Essential Oil Research* **19**: 376-378.
- Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Rodrigues RAF, Denny C, Sousa IMO, Tamashiro JY, Foglio MA (2009). Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with Selective *in vitro* Anticancer Activity for Prostate Cell Line. *Journal of Brazilian Chemical Society* **20**: 569-575.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Marcos RR (1995). The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutation Research* **342**: 43-59.
- Tao KS, Urlando C, Heddle JA (1993). Mutagenicity of methylmethane-sulfonate *in vivo* at the dlb-1 locus and a lac I transgene. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **22**: 293-296.
- Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini VEP (2003). Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. *Genetics and Molecular Biology* **26**: 551-555.
- Torres LMB, Gamberini MT, Roque NF, Landman MTL, Souccar C, Lapa AI (2000). Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* **55**: 617-619.
- Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, Fujita K-I, Matsuda E, Iigo M, Takasuka N, Moore MA (2004). Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **19**: 245-263.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: 44-84.
- Van den Dool H, Kratz DJ (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* **11**: 463-467.
- Veiga Jr. VF, Pinto AC, Maciel MAM (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* **28**: 519-528.

- Vendramini-Costa DB, Castro IBD, Ruiz ALTG, Marquissolo C, Pilli RA, Carvalho JE (2010). Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**: 6742–6747.
- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quimica Nova* **28**: 85-94.
- Viaggi S, Bonatti S, Abbondandolo A (1987). New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells. *Mutagenesis* **2**: 367–370.
- Vichai V, Kirtikara K (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* **1**: 1112-1116.
- Vieira PM, Veronezi E, Silva CR, Chen-Chen L (2012). Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in mice. *Journal of Medicinal Food* **15**: 563-567.
- Vogel EW (1987). Discussion Forum: Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis* **2**: 161-171.
- von der Hude W, Kalweit S, Engelhardt G, McKiernan S, Kasper P, Slacik-Erben R, Miltenburger HG, Honarvar N, Fahrig R, Gorlitz B, Albertini S, Kirchner S, Utesch D, Potter-Locher F, Stopper H, Madle S (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research* **468**: 137-163.
- Wakata A, Matsuoka A, Yamakage K, Yoshida J, Kubo K, Kobayashi K, Senjyu N, Itoh S, Miyajima H, Hamada S, Nishida S, Araki H, Yamamura E, Matsui A, Thybaud V, Lorenzon G, Marzin D, Lorge E (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research* **607**: 88-124.
- Wenzel F, Röthlisberger B (2008). Impact of tumorcytogenetics in tumor diagnostics. *Therapeutische Umschau* **65**: 473-480.
- Zhang LS, Honma M, Hayashi M, Suzuki T, Matsuoka A, Sofuni T (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research* **347**: 105-115.
- Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products* **55**: 999–1003.

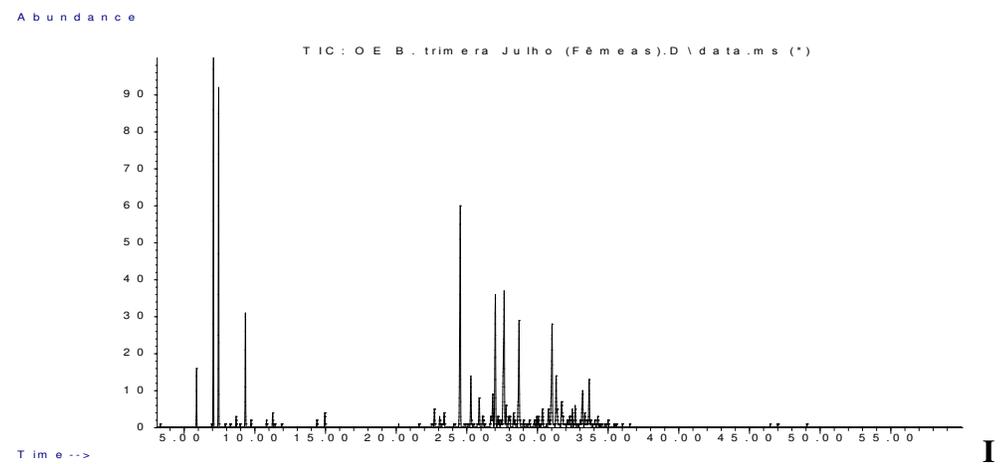
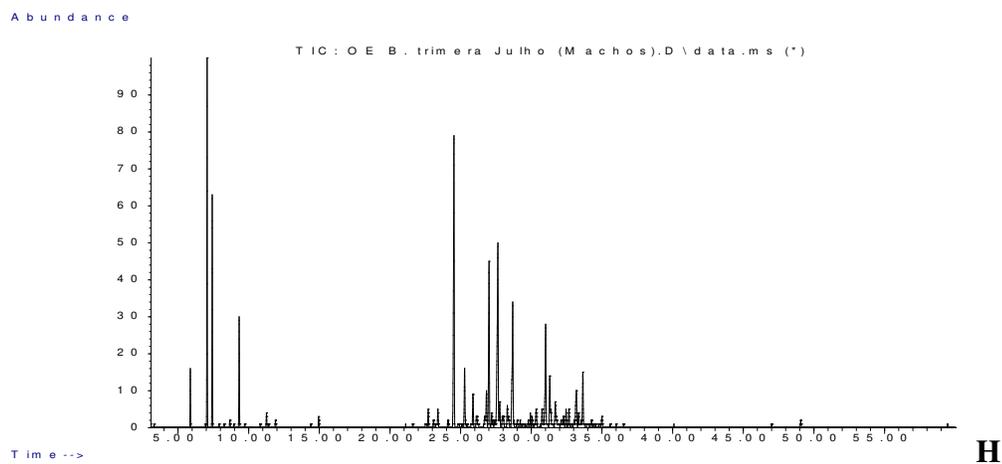
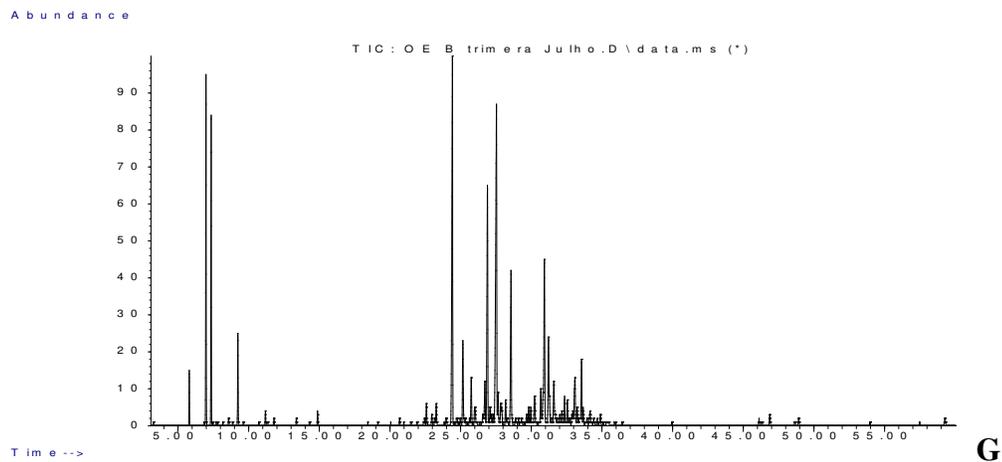
## ANEXO 1 - Cromatogramas dos óleos essenciais de *Baccharis trimera*, obtidos por CG/EM.



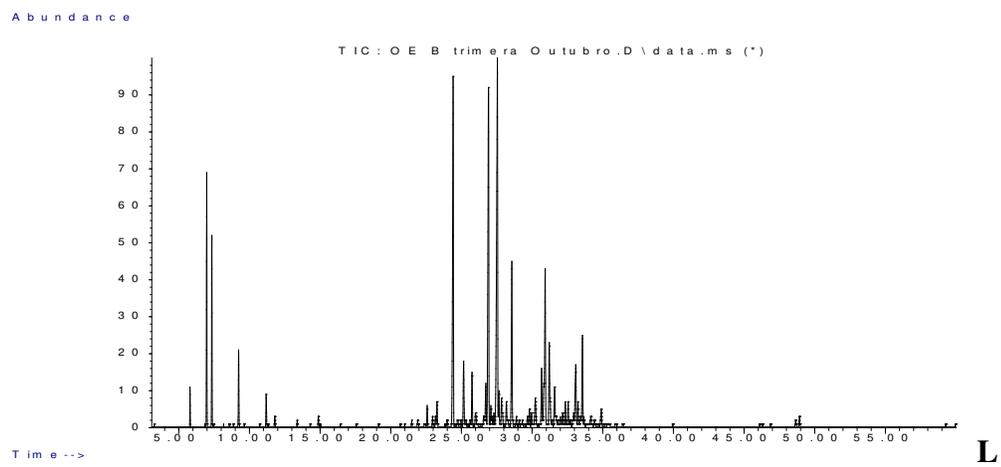
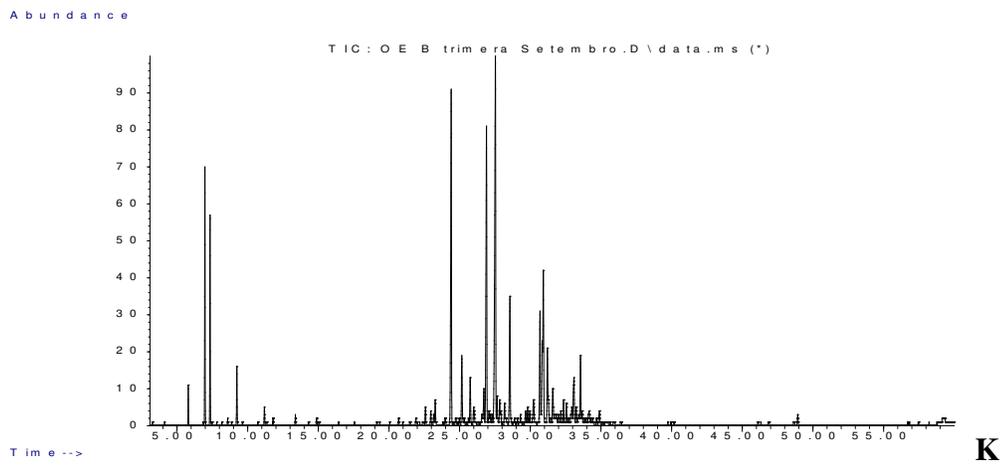
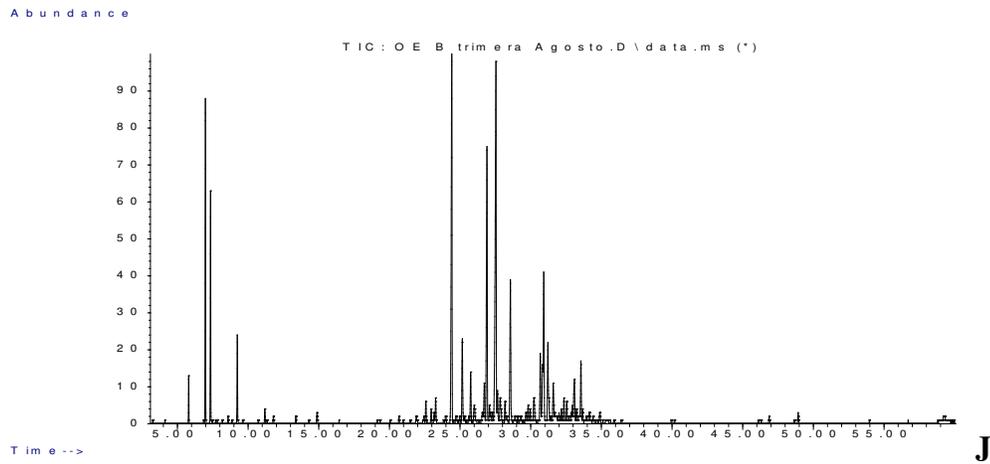
Cromatogramas referentes aos óleos essenciais extraídos em (A) Jan/12, (B) Fev/12 e (C) Mar/12.



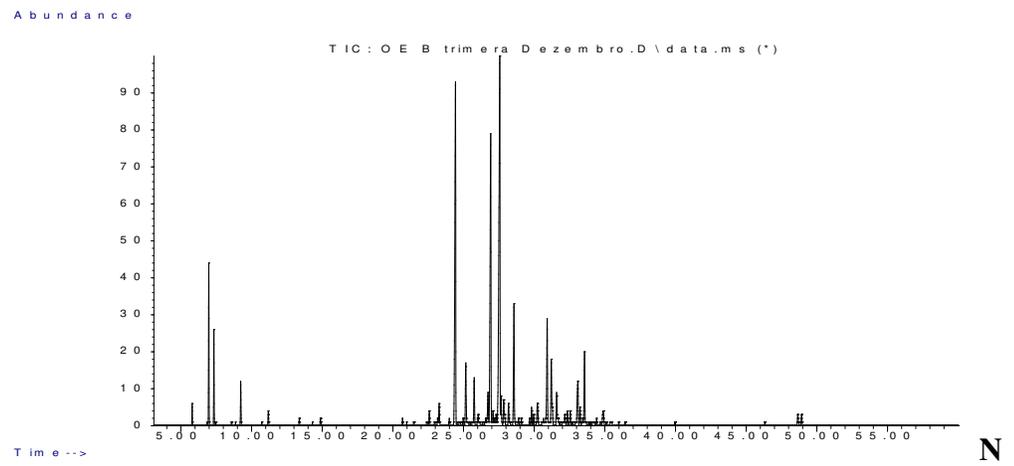
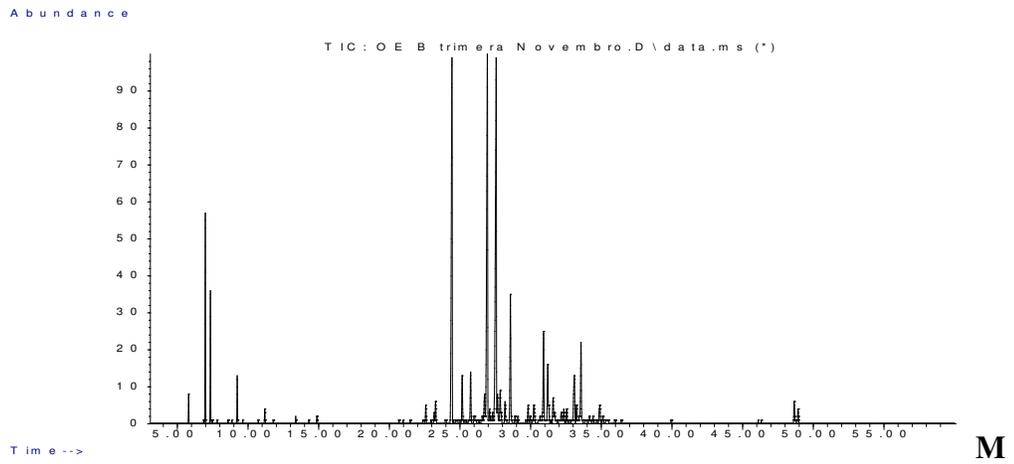
Cromatogramas referentes aos óleos essenciais extraídos em **(D)** Abr/12, **(E)** Mai/12 e **(F)** Jun/12.



Cromatogramas referentes aos óleos essenciais extraídos em **(G)** Jul/12, **(H)** OE Jul/12 (♂) e **(I)** OE Jul/12 (♀).



Cromatogramas referentes aos óleos essenciais extraídos em (J) Ago/12, (K) Set/12 e (L) Out/12.



Cromatogramas referentes aos óleos essenciais extraídos em (M) Nov/12, (N) Dez/12.

## ANEXO 2 - Certificado de Registro no Cadastro Nacional de Biodiversidade.



2451275838575202

### AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010021/2012-4

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

**Instituição:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

**CNPJ:** 460.684.250/0001-33

**Representante Legal:** RONALDO ALOISE PILLI

**Cargo/Função:** Pró-Reitor de Pesquisa

**CPF:** 850.557.788-49 **RG:** 54628908

**Projeto:** Estudo fitoquímico e atividade antimutagênica/mutagênica do óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

**Coordenador do Projeto:** Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

**CPF:** 250.432.438-30 **RG:** 213398151 - SSP / SP

**Finalidade do projeto:** Segundo dados atuais da OMS, as neoplasias representam a segunda maior causa de morte mundial. Viver em ambiente aeróbico faz com que todos os organismos vivos estejam contínua e inevitavelmente expostos a espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Estas reagem com DNA, proteínas intracelulares e lipídeos das membranas danificando essas estruturas e, por isso, estão relacionadas com a gênese de uma série de doenças crônico-degenerativas, como câncer. Além de fonte de novos fármacos, as plantas são grandes aliadas na prevenção do aparecimento de várias doenças mediante diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, imunomodulação e capacidade antioxidante. Assim, produtos naturais com capacidade antioxidante são promissores quimiopreventivos do câncer, pois podem inibir a ocorrência de lesões pré-neoplásicas no DNA. A *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), é uma espécie vegetal característica de regiões tropicais, muito utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e em tratamento de problemas estomacais e digestivos. Tendo em vista o potencial uso medicinal da espécie *B. trimera*, este projeto tem por objetivo a avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial e suas frações, em ensaios de DPPH e Folin-Ciocalteu, e do potencial antimutagênico/mutagênico *in vitro* através do modelo de indução de micronúcleo, além do estudo fitoquímico do óleo essencial buscando correlacionar a composição química com as atividades observadas, contribuindo assim para o conhecimento da atividade farmacológica e de segurança para uso medicinal de *B. trimera*.

**Amostras a serem acessadas:**

Espécie(s): *Baccharis trimera*

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletadas aproximadamente 3,0 kg de partes aéreas de *Baccharis trimera*, cultivada no campo experimental, CPMA/CPQBA/Unicamp

**Local de depósito de subamostra:** DEPARTAMENTO DE BOTANICA

**Equipe do projeto:** ANA LUCIA TASCA GOIS RUIZ / CPF 250.432.438-30

ADRIANA DELLA TORRE / CPF 354.031.738-46

ADRIANA DA SILVA SANTOS / CPF 273.963.758-60

VERA LUCIA GARCIA REHDER / CPF 015.677.898-03

ILIO MONTANARI JUNIOR / CPF 094.617.628-01

**Validade da Autorização:** 27/03/2012 a 01/02/2013

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Página 1 de 2

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010021/2012-4. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 27 de Março de 2012

Paulo Sergio Lacerda Beirao  
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

*Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 2451275838575202 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.*

 <p><b>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</b></p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 27 de Março de 2012</p> <p>Paulo Sergio Lacerda Beirao Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010021/2012-4 Validade: 01/02/2012 a 01/02/2013 Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CNPJ: 460.684.250/0001-33 Pesquisador: Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz CPF: 250.432.438-30 RG: 213398151 - SSP / SP</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <a href="http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/">http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/</a> e informar o número do protocolo 6117533098090154 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ANEXO 3 – Aprovação do relatório referente à autorização de acesso ao patrimônio genético



Ministério da  
Ciência, Tecnologia  
e Inovação



Ofício COAPG nº 54/2013

Brasília, 22 de abril de 2013.

Ilma. Sra.

**Dra. Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz**

Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas

Divisão de Farmacologia e Toxicologia

Rua Alexandre Cazellato, 999

Vila Betel

13083-970 - Campinas, SP - Brasil - Caixa-postal: 6171

Ref.: Processo nº 010021/2012-4 – Relatório final referente à autorização de acesso ao patrimônio genético – vinculado ao projeto intitulado “Estudo fitoquímico e atividade antimutagênica/mutagênica do óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC”.

Prezada Senhora,

Levamos ao seu conhecimento que o relatório final referente à autorização em epígrafe foi analisado e que em decorrência do cumprimento das exigências do Anexo I da Resolução CGEN nº 31/2008, foi aprovado por esta Coordenação.

Atenciosamente,



**CARLOS ALBERTO PITTALUGA NIEDERAUER**

Coordenador do Sistema de Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético  
PO – 128/2013

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico  
Coordenação do Sistema de Autorização de Acesso  
ao Patrimônio Genético – COAPG  
SHIS Quadra 01 Conjunto B - Bloco A – 2º andar  
Edifício Santos Dumont  
Lago Sul, Brasília - DF  
CEP: 71605-160

Telefone +55 61 3211 4024  
Fax +55 61 3211 4035  
e-mail: coapg@cnpq.br