

*Vitor Bortolazzo Fonseca*



**AValiação DO POTENCIAL TOXICOGENÉTICO E  
QUIMIOPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DE  
*CITRUS AURANTIUM L. IN VIVO.***

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu da Universidade  
Estadual Paulista – UNESP para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Farmacologia)

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clélia Akiko Hiruma-Lima**  
**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daisy Maria Fávero Salvadori**

Botucatu  
2008

A dor e o sofrimento é “o professor”.  
É o despertador da consciência.

Helena P. Blavaski

### **Agradecimentos**

**A minha família** por fazer parte da minha vida, por ter confiado em mim, ter me dado todo o suporte que precisei, por ter me apoiado integralmente em todos os sentidos, desde sempre.

**A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Clélia** por todos esses anos de ensinamentos, paciência com minhas limitações, pela amizade, pelo exemplo de determinação profissional, de competência, de ética na pesquisa.

**A minha co-orientadora Profª. Daisy** por ter me recebido de braços abertos no início desse mestrado, por ter me mostrado novos caminhos, pelos ensinamentos, pela convivência, pelo companheirismo.

**A Profª. Lúcia Rocha** por ter participado de forma ativa na minha formação profissional principalmente na época da minha iniciação científica.

**A Profª. Cláudia Helena** por ter disponibilizado o biotério do Depto. de Morfologia e por ter sempre me atendido com atenção nos momentos que precisei.

**A minha namorada Thaís** pelo afeto, amor, carinho, amizade, por ter me agüentado nos momentos em que as coisas não deram certo.

**Aos meus amigos de laboratório** que foram peças fundamentais não só em meu crescimento profissional, mas também pessoal, e que com certeza sem eles eu não teria chegado até aqui.

**Aos meus irmãos da República Leite Quente** que conviveram e convivem comigo desde 2001 até os dias de hoje, por me ajudar, pelo intenso lazer (rsrsrs...), pela grande amizade.

**Aos meus amigos de Piracicaba** por todos esses anos de amizade, de confiança, de muita diversão, de incentivo a realização profissional e pessoal.

**Aos funcionários: Sr. Junior (Junião), Janete (Chefa) e Luciana (Lú)** pela convivência e por terem contribuído muito para um bom ambiente de trabalho.

**Ao CNPq e a FAPESP** pelo apoio financeiro.

**MUITO OBRIGADO !!!**

**ÍNDICE**

I. RESUMO 5

a. Abstract 6

II. INTRODUÇÃO 8

a. Testes toxicogenéticos 10

b. Teste do micronúcleo em reticulócitos 10

c. Teste do cometa 11

III. OBJETIVOS	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS	16
a. Animais	16
b. Agente químico	16
c. Óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i>	16
d. Teste do micronúcleo em reticulócitos	17
e. Viabilidade celular e teste do cometa	19
V. ARTIGO	22
VI. CONCLUSÃO	36
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

## **I- Resumo**

*Citrus aurantium* L., pertencente à família Rutaceae, é uma espécie medicinal amplamente utilizada para fins terapêuticos, sendo muito indicada para o tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal. Há relatos populares de seu efeito no combate ao reumatismo, taquicardia e por sua ação diurética e antiespasmódica. Já existem comprovações da ação antibiótica do óleo essencial de *Citrus aurantium* (OECa) contra a bactéria *Helicobacter pylori*, uma das maiores indutoras de úlceras gástricas no homem. Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar o potencial mutagênico, antimutagênico e genotóxico do OECa, utilizando o teste do cometa em células da mucosa gástrica e o teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos Wistar. Os resultados mostraram que os tratamentos com três níveis de doses do OECa (125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) não aumentaram a frequência de reticulócitos micronucleados, o que indica ausência de efeito mutagênico deste óleo. No entanto, foi

observado efeito genotóxico (teste do cometa) na maior dose avaliada (2500 mg/kg). Por outro lado, os dados mostraram que o OECA não apresentou efeito antimutagênico sobre os danos genéticos (micronúcleo) induzidos pela metilnitrosuréia (MNU). A partir dos nossos resultados podemos concluir que o OECA não apresentou efeito mutagênico e antimutagênico, mas que em altas doses pode exercer efeito genotóxico em células da mucosa gástrica. Portanto, este trabalho representa uma relevante contribuição para uma avaliação correta do potencial de risco à saúde associada à exposição de produtos de origem natural.

## a- Abstract

*Citrus aurantium* L., belonging to the family Rutaceae, is a medicinal species amply utilized for therapeutic ends, being often indicated for treatment of gastrointestinal tract disturbances. There are popular reports on its effect in combating rheumatism, tachycardia and on its diuretic and antispasmodic action. There is already proof of antibiotic action by the essential oil of *Citrus aurantium* (OECA) against *Helicobacter pylori* bacteria, one of the greatest inducers of gastric ulcers in humans. Thus, the present study aimed to evaluate the mutagenic, antimutagenic and genotoxic potential of OECA, utilizing the comet assay in gastric mucosa cells and the micronucleus test in peripheral blood cells of Wistar rats. The results show that treatments with three OECA dose levels (125, 250 and 500 mg/kg, v.o.) did not increase the frequency of micronucleated reticulocytes, which indicates the absence of mutagenic effect of this oil. Nevertheless, genotoxic effect (comet assay) at the highest dose evaluated (2500 mg/kg). On the other hand, the data show that OECA did not present antimutagenic effect on genetic damage (micronucleus) induced by methylnitrosourea (MNU). Based on our results we can conclude that OECA did not present mutagenic or antimutagenic effect, but at high doses it can exert genotoxic effect on gastric mucosa cells. Therefore, this work represents a relevant

contribution to a correct evaluation of potential health risk associated with exposure to products of natural origin.

# Introdução

---

## II- Introdução

O *Citrus aurantium* L., da família Rutaceae e popularmente conhecido como laranja-amarga ou laranja-azedada (Vieira, 1992; Sanguinetti, 1989; Santos *et al.* 1988) é uma espécie medicinal amplamente utilizada para fins terapêuticos (Corrêa, 1978), especialmente no que se refere às cascas dos frutos, flores e folhas. Existem relatos populares de seu efeito no combate a distúrbios do trato gastrointestinal, reumatismo, taquicardia e por sua ação diurética (Vieira, 1992; Sanguinetti, 1989; Santos *et al.* 1988) e antiespasmódica (Cordeiro *et al.* 1996). Já existem comprovações da ação antibiótica do óleo essencial de *Citrus aurantium* (OECa) contra a bactéria *Helicobacter pylori*, uma das maiores indutoras de úlceras gástricas no homem (Bergonzelli, 2003). Estudos preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram a presença de substâncias gastroprotetoras e cicatrizantes da mucosa gástrica no óleo essencial de *Citrus aurantium*. Nos modelos de avaliação antiulcerogênica em roedores, o OECa exerceu efetiva ação gastroprotetora, com destaque para o modelo de indução de lesões gástricas por etanol absoluto, um dos modelos mais severos a mucosa gástrica. Já a ação cicatrizante em lesões ulcerosas implantadas por ácido acético, o OECa promoveu significativa cicatrização da mucosa gástrica lesada (72%) se comparado aos animais tratados com o veículo (comunicação pessoal).

A caracterização fitoquímica do OECa realizada pelo Instituto Agrônomo de Campinas apontou a presença de três constituintes principais: limoneno (97,8%), mircenolol (1,43%) e octanal (0,45%), demonstrando, assim, que sua constituição é majoritariamente de terpenos. Além das propriedades terapêuticas do OECa, o limoneno é amplamente utilizado como aditivo de sabor e aroma em perfumes, sabonetes, alimentos, gomas de mascar e bebidas. Nos Estados Unidos, devido à freqüente ocorrência em muitos alimentos, estima-se que o consumo diário de limoneno pode chegar a 16,2 mg/pessoa (Sun, 2007). Entretanto, até o momento, pouco se sabe sobre os

possíveis efeitos tóxicos do OECA, especialmente no que se refere ao seu efeito sobre o material genético.

É sabido que determinadas plantas podem conter substâncias que, além de tóxicas, podem causar danos no DNA, constituindo-se, assim, em risco potencial à saúde humana. Cardoso *et al.* (2006), avaliaram o efeito mutagênico da espécie *Byrsonima crassa*, planta utilizada na medicina popular e que possua atividade antiulcerogênica (Sannomiya *et al.*, 2005), e constataram que o extrato metanólico das folhas da planta apresentaram atividade mutagênica. Efeito semelhante foi observado com os extratos de *Strychnos pseudoquina* e *Brosimum gaudichaudii*. (Santos *et al.*, 2006; Varanda *et al.*, 2002).

As mutações, de um modo geral, são resultantes de alterações que afetam a estrutura e a integridade do DNA, como quebras de fita simples e dupla, *crosslinks* e pareamento errôneo das bases púricas e pirimidínicas, podendo ter origem “espontânea” ou serem induzidas por agentes químicos, físicos e biológicos. Essas alterações interferem em mecanismos de regulação do ciclo celular, apoptose, transcrição e duplicação do DNA, relacionando-se a gênese de doenças degenerativas como o câncer, efeitos teratogênicos e desordens herdáveis (Boer & Hoelijmakers, 2000). Portanto, diante do elevado consumo destes terpenos como aditivos alimentares e do potencial medicinal do óleo essencial de *Citrus aurantium*, a realização de estudos que avaliem seus possíveis efeitos sobre o material genético é de fundamental importância para a utilização da espécie para fins comerciais e terapêuticos.

Por outro lado, há na literatura dados que demonstram que extratos, compostos isolados e chás de diversas plantas podem reduzir os efeitos de agentes reconhecidamente mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano (Scolastici *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004).

Atualmente, especial atenção tem sido dada para a identificação do potencial quimioprotetor de compostos naturais sobre danos quimicamente induzidos no DNA. Knasmuller *et al.*, (2002) estimaram que nos últimos vinte anos aproximadamente 25.000 artigos foram publicados na área de antimutagênese e anticarcinogênese, e que mais de 80 % dos agentes estudados eram de origem vegetal e utilizados na dieta ou com propósitos medicinais. Marnewick *et al.*, (2000), utilizando o teste de Ames, relataram que chás de ervas provenientes da África do Sul apresentaram significativa atividade antimutagênica sobre a ação de diferentes mutágenos. O mesmo foi observado com o extrato etanólico de *Rhoeo discolor*, uma espécie medicinal utilizada para o tratamento de micoses (González-Avila *et al.*, 2003). Rosa *et al.*, (2007) avaliando o efeito do extrato metanólico de *Hibiscus tiliaceus* sobre danos induzidos no DNA pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observaram atividade protetora em linhagem de células V79 avaliada pelo teste do cometa.

Assim, compostos com atividade antimutagênica e/ou anticarcinogênica, presentes em produtos de origem natural e que sejam de fácil obtenção, são de grande relevância para a saúde pública e uma alternativa para a redução das taxas de neoplasia (Suaeyun *et al.*, 1997).



#### a- Testes de mutagenicidade

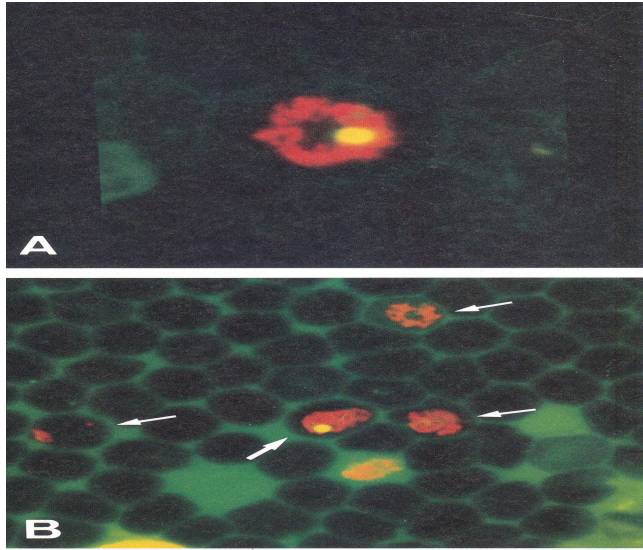
Desde as últimas décadas do século passado, inúmeros testes vêm sendo rotineiramente utilizados para a determinação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos. Os testes para avaliação dos efeitos tóxicos sobre o DNA têm sido extensivamente utilizados para identificar agentes mutagênicos e agentes potencialmente carcinogênicos. Historicamente, vários manuais de testes de toxicidade genética têm sido elaborados em muitos países, definindo a bateria de testes recomendados para a identificação do potencial mutagênico de agentes químicos. Esses manuais, especialmente o da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) contém procedimentos detalhados para a realização de cada um dos testes, fornecendo bases científicas, justificativas para a seleção do teste e orientações para a interpretação dos resultados (Choy, 2001).

Os ensaios *in vitro* são bastante utilizados para se fazer o rastreamento do potencial mutagênico de compostos químicos e para explorar os mecanismos pelos quais determinados agentes exercem suas atividades genotóxicas. No entanto, os ensaios *in vivo*, especialmente em roedores, são os mais recomendados para se avaliar a mutagenicidade de um composto, por melhor se aproximar as condições do organismo humano.

#### b- Teste do micronúcleo em reticulócitos

O teste do micronúcleo é um método citogenético simples, rápido e capaz de detectar quebras e perdas cromossômicas (aneuploidia) tanto *in vivo* como *in vitro*. O micronúcleo (MN) se constitui em pequena massa de cromatina separada do núcleo principal, formada durante a telófase da mitose ou meiose, e resultante de fragmentos de cromossomos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (Fenech *et al.*, 1997).

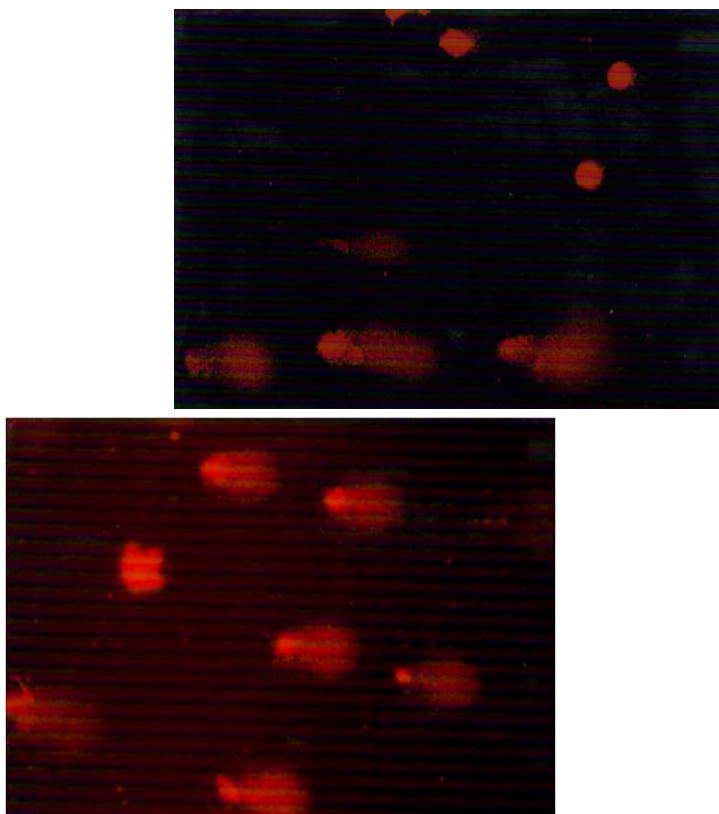
O teste do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico de roedores foi proposto como ensaio alternativo ao teste do micronúcleo em medula óssea para a detecção de agentes mutagênicos. Alguns estudos demonstraram que o uso de reticulócitos apresenta vantagens como: a) simplicidade na coleta e análise do material; b) menor subjetividade na análise; c) fácil identificação do micronúcleo (Figura 1); d) uso de pequena amostra de sangue; e) os animais não precisam ser sacrificados ao final do procedimento (Hayashi *et al.*, 1990).



**Figura 1.** Fotomicrografia de reticulócitos de camundongos. Em (A), reticulócito normal; em (B), reticulócito com micronúcleo (seta). Aumento de 1000x. (Hayashi *et al.*, 1990).

#### *c- Teste do cometa*

Utilizando de técnicas bioquímicas, Rydberg & Johanson (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente os danos no DNA de células individualizadas. Mais tarde, Ostling & Johanson (1984) introduziram modificações na metodologia, em que células individualizadas, embebidas em agarose, eram colocadas sobre uma lâmina de microscópio, lisadas por detergentes em altas concentrações de sais e expostas a microeletroforese. As células com frequência aumentada de quebras de cadeia dupla de DNA apresentavam maior migração da molécula para o ânodo, permitindo a visualização de uma “cauda” após coloração com pigmento fluorescente (Figura 2).



**Figura 2.** Fotomicrografias de “nucleóides” de células de cólon de ratos coradas com brometo de etídio. (A) nucleóide sem dano ou com dano mínimo no DNA; (B) nucleóides com dano no DNA. Aumento de 200x. (Lima, 2002).

Devido a essa aparência, a imagem foi chamada de “cometa”, o que levou, mais tarde, Olive (1989) a sugerir o nome *comet assay* (ensaio do cometa) para identificar o teste, também conhecido por *Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE)*. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste para a detecção de danos, Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (1991), introduziram modificações que permitiram detectar, além das quebras de fita dupla, quebras de fita simples, sítios alcali-lábeis, e lesões oxidativas no DNA.

Ao se realizar uma comparação entre outros testes de genotoxicidade, o teste do cometa apresenta vantagens como: sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA, uso de pequena amostra de células (que não necessita ser células em proliferação), avaliação de células individuais, simplicidade, baixo custo, rapidez para a obtenção dos resultados e flexibilidade, uma vez que pode ser utilizado para qualquer população de células. Portanto, para a realização do teste do cometa é necessário apenas a presença de células viáveis. Tais vantagens têm favorecido o uso do teste do cometa também para o biomonitoramento ambiental e de populações humanas, para avaliação da eficiência do sistema de reparo do DNA e para estudos de quimioprevenção de danos genéticos (Anderson *et al.*, 1998; Hambly *et al.*, 1997; Pool-Zobel *et al.*, 1996; Fairbain *et al.*, 1995).

# Objetivos

---

## III- Objetivos

- Avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico do óleo essencial de *Citrus aurantium* em células do sangue periférico de roedores.
- Avaliar o potencial genotóxico do óleo essencial de *Citrus aurantium* em células de mucosa gástrica de roedores.



# Materias e Métodos

---

## IV- Materiais e Métodos

### a- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-300g) provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas forradas com maravalha autoclavada e mantidos no biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $55 \pm 10\%$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante sua permanência no Biotério, os animais receberam ração peletizada (Purina) e água filtrada *ad libitum*.

### b- Agente químico

O agente químico utilizado como controle positivo foi a metilnitrosuréia (MNU-SIGMA) diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e administrada aos animais por via oral (*gavage*) na dose de 7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) para o teste do cometa e por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 70 mg/kg p.c. para o teste do micronúcleo.

### **c- Óleo essencial**

Frutos de *Citrus aurantium* L. colhidos ao lado do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, foram descascados e as cascas submetidas à extração do óleo essencial em aparelho do tipo Clevenger (Marconi S.A.). Para isso, as cascas dos frutos foram misturadas com água destilada dentro de um balão volumétrico (2L) que foi colocado sobre manta aquecedora até a ebulição. O óleo essencial (OECa) obtido foi armazenado em frasco âmbar a 5°C até a realização dos experimentos. Foram testadas as seguintes doses: 125, 250 e 500 mg/kg para o teste do micronúcleo e 25, 250 e 2500 mg/kg para o teste do cometa. As doses foram estabelecidas com base em resultados obtidos em modelos de atividade gastroprotetora com roedores, utilizando o cálculo de densidade  $D = M/V$ , considerando a densidade do OECa = 0.9333 .

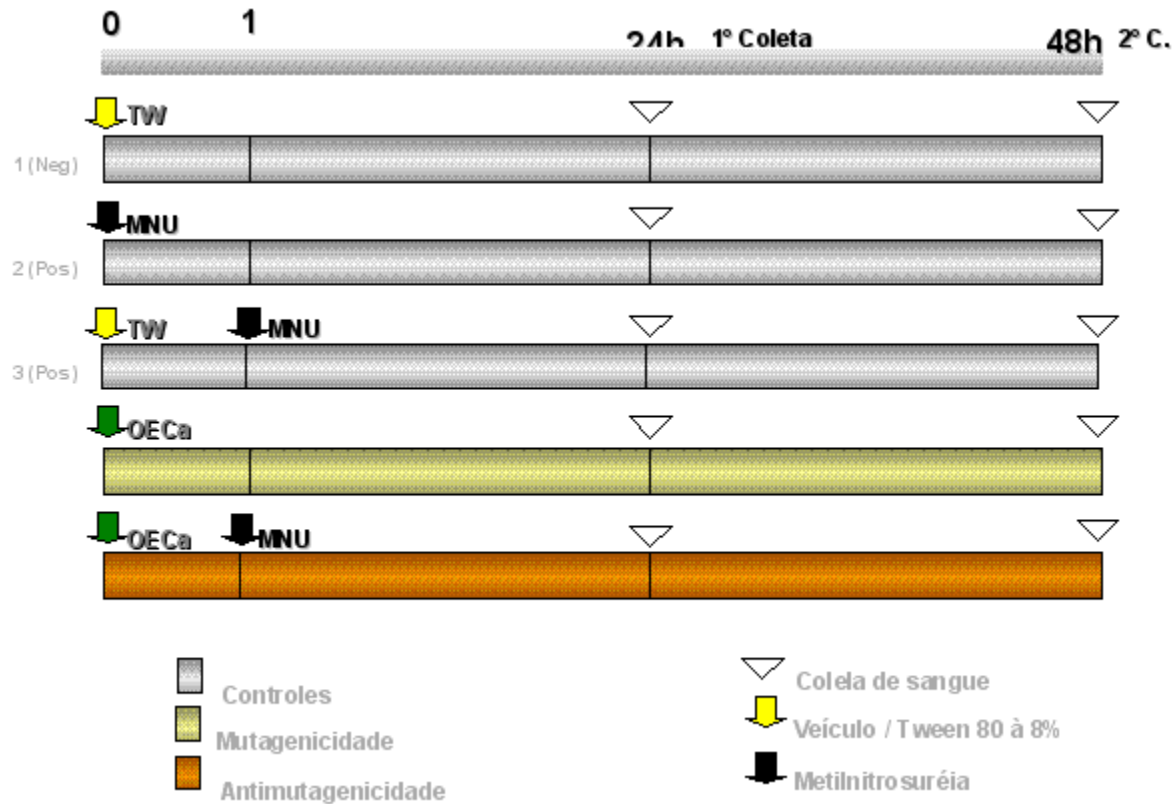
### **d- Teste do Micronúcleo**

Para a realização do teste do micronúcleo, os animais foram distribuídos em nove grupos de dez animais cada. Abaixo se encontra o delineamento experimental utilizado nesse teste.

#### **Delineamento experimental utilizado no teste do micronúcleo**

4,5,6 (Mut)

7,8,9 (Ant)



Tratamento com OECa



Grupo 1, controle negativo, no qual os animais foram tratados com o veículo de diluição do OECa (Tween 80 a 8%), por via oral; Grupos 2 e 3, controles positivos, nos quais os animais foram tratados somente com a MNU na dose única de 70 mg/kg p.c, por via i.p. (grupo 2), ou com veículo e após 1h com a MNU (grupo 3); Grupos 4, 5 e 6, os animais foram tratados com o OECa, por via oral, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg p.c, respectivamente; Grupos 7, 8 e 9, os animais receberam o OECa por v.o. nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg p.c, respectivamente e, após 1 hora, foram tratados com a MNU (70 mg/kg p.c) por via i.p. O OECa foi previamente administração 1 hora antes do agente indutor de dano (MNU) porque esse foi o tempo utilizado nos modelos de avaliação gastroprotetora, no qual o OECa mostrou-se protetor à mucosa gástrica quando administrado 1 hora antes do agente lesivo. Também foi relatado que o limoneno (97 % do OECa) é absorvido rapidamente no trato gastrointestinal (Sun, 2007).

O teste do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico foi realizado de acordo com a técnica descrita por Hayashi *et al* (1990), que utiliza lâminas pré-coradas com acridina orange, um corante com alta afinidade pelo DNA. As lâminas foram aquecidas aproximadamente a 70 °C em placa quente e 10 µl de solução aquosa de acridina orange (1mg/ml) foi colocada no centro



de cada lâmina aquecida. Em seguida, a solução foi espalhada uniformemente sobre a superfície da lâmina com ajuda da extremidade de outra lâmina. Uma vez secas, as lâminas foram mantidas no escuro a temperatura ambiente por pelo menos 24 h.

Amostras de 5 µl de sangue periférico foram coletadas da veia caudal 24 e 48 h após o pós-tratamento dos animais. Cada amostra foi colocada no centro de uma lâmina pré-corada, coberta com lamínula e mantida no escuro, a -20 ° C, por um período mínimo de 24 h antes da análise. Esta foi realizada em microscópio de luz fluorescente, com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de barreira amarelo (515 nm), em aumento de 1000 x (com óleo de imersão). Foram analisados 1000 reticulócitos por animal para a determinação da frequência de reticulócitos micronucleados. Os resultados foram expressos na forma de média ± desvio padrão e os valores submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância de  $p < 0.05$ .

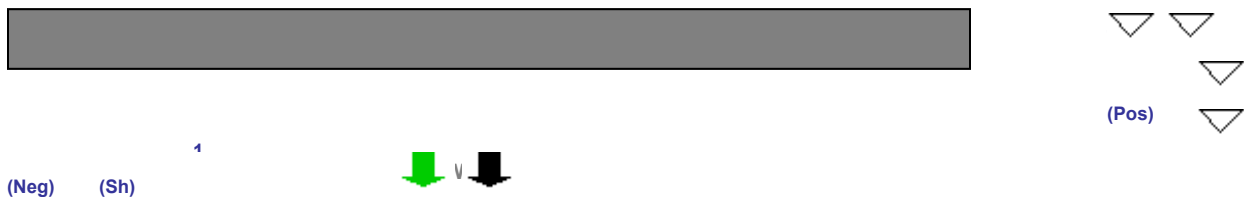
#### **e- Viabilidade celular e teste do cometa**

Para a realização do teste do cometa, os animais permaneceram 24 horas de jejum e após esse período, foram distribuídos em 6 grupos de dez animais cada. Abaixo se encontra o delineamento experimental utilizado nesse teste.

#### **Delineamento experimental utilizado no teste do cometa**

0

horas



Grupo 1 (sham) nos quais os animais receberam apenas ração e água *ad libitum*; Grupo 2, os animais foram tratados, por via oral, com o veículo de diluição do OECA (Tween 80 à 8 %); Grupo 3, controle positivo, os animais foram tratados com a MNU na dose única de 7 mg/kg p.c, por via oral; Grupos 4, 5 e 6, os animais receberam dose única do OECA, nas doses de 25, 250 e 2500 mg/kg p.c., respectivamente, por via oral. Após 5 horas dos tratamentos, os animais foram mortos e os estômagos retirados para a obtenção de células da mucosa gástrica. Para isso, após a gastrectomia, o interior do estômago foi lavado com solução salina (NaCl 0,9%) e a região da cárdia amarrada com fio de algodão. Uma solução enzimática contendo colagenase tipo I (0,3 mg/mL) e tripsina/EDTA (5 mg/mL) foi injetada no interior do estômago através da região do esfíncter pilórico que, posteriormente, foi também amarrada. Em seguida, o estômago contendo a solução enzimática foi colocado em solução salina e mantido em banho-maria (37°C) por 10

minutos. Após esse período, o estômago foi aberto e a suspensão de células coletada para análise da viabilidade celular e para a realização do teste do cometa.

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio conforme descrito por Strauss (1991). Uma alíquota de 20 µl da suspensão de células foi misturada a uma solução contendo 30 µl diacetato de fluoresceína em acetona (5 mg/kg), 200 µl de brometo de etídio em PBS (200 µl/ml) e 4,8 ml de PBS. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência e foram consideradas viáveis aquelas que metabolizaram o diacetato de fluoresceína e coraram-se em verde; células coradas em vermelho foram consideradas mortas. Foram contadas 200 células por alíquota.

O ensaio do cometa foi conduzido de acordo com as metodologias descritas por Singh *et al.* (1988) e Valverde *et al.* (1997) com modificações e todas as etapas realizadas sob luz indireta. Uma alíquota de 30 µl da suspensão de células foi misturada a 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %) e colocada sobre uma lâmina previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal. Em seguida, a lâmina foi coberta com lamínula e deixada a 4 °C por 5 minutos para solidificar a agarose. Após esse período, a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina transferida para uma solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, lauril sarcosinato de sódio 1 %, pH 10; Triton X-100 1% e DMSO 10%) por 24 h. As lâminas foram então lavadas em PBS e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese preenchida com tampão alcalino (EDTA 1mM e NaOH 300 mM, pH 13). Após período de 20 minutos, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por outros 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, desidratadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas até o momento da análise, quando foram coradas com 50 µl de brometo de etídio (20 µl /ml). Foram analisados 50 nucleóides em aumento de 200x, em microscópio de fluorescência (Olympus - BX60) acoplado a sistema de análise de imagem (Comet II - Perspective Instruments, Inglaterra). O parâmetro utilizado para mensurar os danos no DNA foi o *tail intensity*, que representa a porcentagem de DNA na cauda do cometa.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e os valores submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância  $p < 0.05$ .

# Artigo

---

## Ausência de efeito mutagênico e quimioprotetor do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L.

V.B. Fonseca<sup>a</sup>, C.A. Hiruma-Lima<sup>a</sup>, F. Bonamin<sup>a</sup>, W. Vilegas<sup>b</sup>, D.M.F. Salvadori<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

### Abstract

*Citrus aurantium* L., belonging to the family Rutaceae, is a medicinal species amply utilized for therapeutic ends, being often indicated for treatment of gastrointestinal tract disturbances. There are popular reports on its effect in combating rheumatism, tachycardia and on its diuretic and antispasmodic action. There is already proof of antibiotic action by the essential oil of *Citrus aurantium* (OECa) against *Helicobacter pylori* bacteria, one of the greatest inducers of gastric ulcers in humans. Thus, the present study aimed to evaluate the mutagenic, antimutagenic and genotoxic potential of OECa, utilizing the comet assay in gastric mucosa cells and the micronucleus test in peripheral blood cells of Wistar rats. The results show that treatments with three OECa dose levels (125, 250 and 500 mg/kg, v.o.) did not increase the frequency of micronucleated reticulocytes, which indicates the absence of mutagenic effect of this oil. Nevertheless, genotoxic effect (comet assay) at the highest dose evaluated (2500 mg/kg). On the other hand, the data show that OECa did not present antimutagenic effect on genetic damage (micronucleus) induced by methylnitrosourea (MNU). Based on our results we can conclude that OECa did not present mutagenic or antimutagenic effect, but at high doses it can exert genotoxic effect on gastric mucosa cells. Therefore, this work represents a relevant contribution to a correct evaluation of potential health risk associated with exposure to products of natural origin.

## Introdução

O *Citrus aurantium* L., da família Rutaceae e popularmente conhecido como laranja-amarga ou laranja-azedada (Vieira, 1992; Sanguinetti, 1989; Santos *et al.* 1988) é uma espécie medicinal amplamente utilizada para fins terapêuticos (Corrêa, 1978), especialmente no que se refere às cascas dos frutos, flores e folhas. Existem relatos populares de seu efeito no combate a distúrbios do trato gastrointestinal, reumatismo, taquicardia e por sua ação diurética (Vieira, 1992; Sanguinetti, 1989; Santos *et al.* 1988) e antiespasmódica (Cordeiro *et al.* 1996). Já existem comprovações da ação antibiótica do óleo essencial de *Citrus aurantium* (OECa) contra a bactéria *Helicobacter pylori*, uma das maiores indutoras de úlceras gástricas no homem (Bergonzelli, 2003).

Além das propriedades terapêuticas do OECa, o limoneno, principal constituinte do OECa, é amplamente utilizado como aditivo de sabor e aroma em perfumes, sabonetes, alimentos, gomas de mascar e bebidas. Nos Estados Unidos, devido à freqüente ocorrência em muitos alimentos, estima-se que o consumo diário de limoneno pode chegar a 16,2 mg/pessoa (Sun, 2007). Entretanto, até o momento, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos tóxicos do OECa, especialmente aqueles sobre o material genético. É do conhecimento que diversas plantas contêm substâncias que, além de tóxicas, podem causar danos no DNA, constituindo-se, assim, em risco potencial à saúde humana. Cardoso *et al.* (2006), avaliaram o efeito mutagênico da espécie *Byrsonima crassa*, planta utilizada na medicina popular e que possui atividade antiulcerogênica (Sannomiya *et al.*, 2005), e constataram que o extrato metanólico das folhas da planta apresentaram atividade mutagênica. Efeito semelhante foi observado com os extratos de *Strychnos pseudoquina* e *Brosimum gaudichaudii*. (Santos *et al.* , 2006; Varanda *et al.*, 2002).

Por outro lado, há na literatura dados que também demonstram que extratos, compostos isolados e chás de diversas plantas podem reduzir os efeitos de agentes reconhecidamente mutagênicos (Scolastici *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004). Knasmuller *et al.*, (2002) estimaram que nos últimos vinte anos aproximadamente 25.000 artigos foram publicados na área de antimutagênese e anticarcinogênese, e que mais de 80 % dos agentes estudados eram de origem vegetal e utilizados na dieta ou com propósitos medicinais. Rosa *et al.*, (2007) avaliando o efeito do extrato metanólico de *Hibiscus tiliaceus* sobre danos induzidos no DNA pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observaram atividade protetora em linhagem de células V79 avaliada pelo teste do cometa.

Com base no descrito, o presente estudo teve como objetivos iniciais avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do OECA. Posteriormente, foi também investigada sua atividade quimioprotetora contra danos quimicamente induzidos no DNA. Para tanto, foram utilizados o teste do cometa em células da mucosa gástrica e o teste do micronúcleo em células do sangue periférico de roedores.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-300g) provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas forradas com maravalha autoclavada e mantidos no biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $55 \pm 10\%$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante sua permanência no Biotério, os animais receberam ração peletizada (Purina) e água filtrada *ad libitum*.

### **Agente químico**

O agente químico utilizado como controle positivo foi a metilnitrosuréia (MNU-SIGMA) diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e administrada aos animais por via oral (*gavage*) na dose de 7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) para o teste do cometa e por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 70 mg/kg p.c. para o teste do micronúcleo.

### **Óleo essencial**

Frutos de *Citrus aurantium* L. colhidos ao lado do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, foram descascados e as cascas submetidas à extração do óleo essencial em aparelho do tipo Clevenger (Marconi S.A.). Para isso, as cascas dos frutos foram misturadas com água destilada dentro de um balão volumétrico (2L) que foi colocado sobre manta aquecedora até a ebulição. O óleo essencial (OECA) obtido foi armazenado em frasco âmbar a  $5^\circ\text{C}$  até a realização dos experimentos. Foram testadas as seguintes doses: 125, 250 e 500 mg/kg para o teste do micronúcleo e 25, 250 e 2500 mg/kg para o teste do cometa. As

doses foram estabelecidas com base em resultados obtidos em modelos de atividade gastroprotetora com roedores, utilizando o cálculo de densidade  $D = M/V$ , considerando a densidade do OECA = 0.9333 .

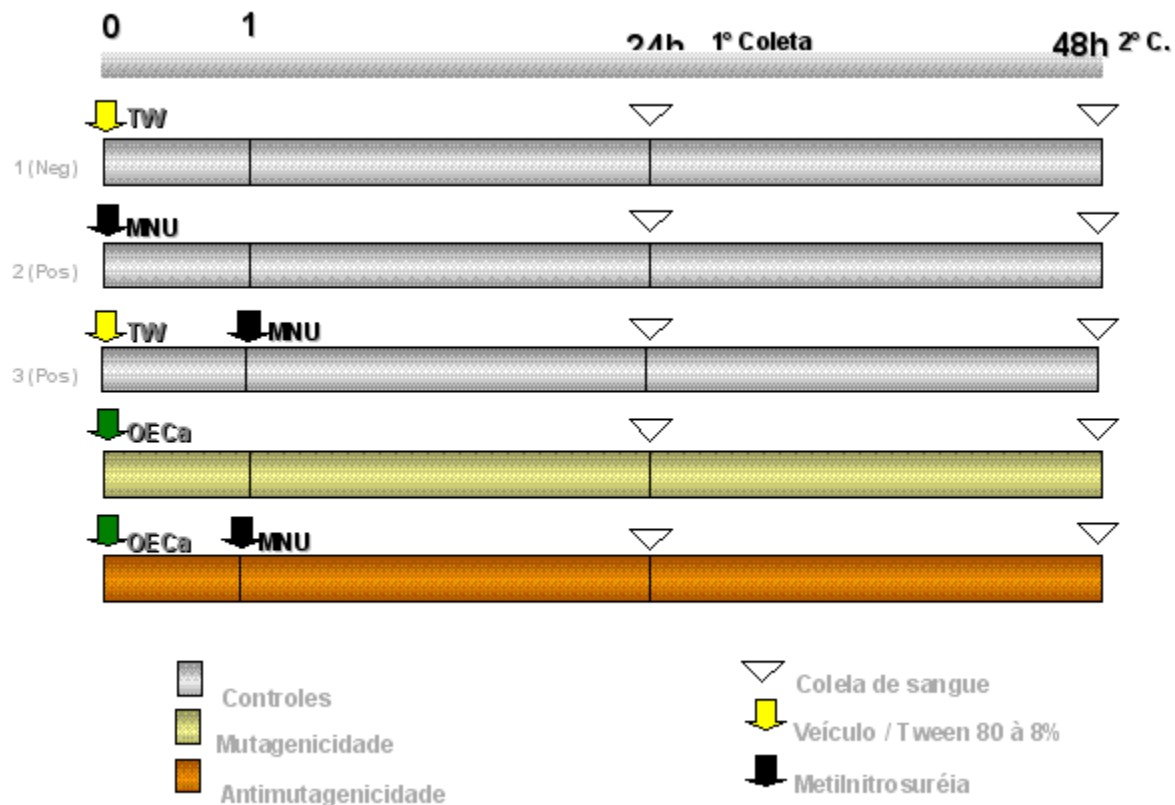
### Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo, os animais foram distribuídos em nove grupos de dez animais cada. Abaixo se encontra o delineamento experimental utilizado nesse teste.

### Delineamento experimental utilizado no teste do micronúcleo.

4,5,6 (Mut)

7,8,9 (Ant)



Tratamento com OECA



Grupo 1, controle negativo, no qual os animais foram tratados com o veículo de diluição do OECA (Tween 80 a 8%), por via oral; Grupos 2 e 3, controles positivos, nos quais os animais foram tratados somente com a MNU na dose única de 70 mg/kg p.c, por via i.p. (grupo 2), ou com veículo e após 1h com a MNU (grupo 3); Grupos 4, 5 e 6, os animais foram tratados com o OECA, por via oral, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg p.c, respectivamente; Grupos 7, 8 e 9, os animais receberam o OECA por v.o. nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg p.c, respectivamente e, após

1 hora, foram tratados com a MNU (70 mg/kg p.c) por via i.p. O OECA foi previamente administração 1 hora antes do agente indutor de dano (MNU) porque esse foi o tempo utilizado nos modelos de avaliação gastroprotetora, no qual o OECA mostrou-se protetor à mucosa gástrica quando administrado 1 hora antes do agente lesivo. Também foi relatado que o limoneno (97 % do OECA) é absorvido rapidamente no trato gastrointestinal (Sun, 2007).

O teste do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico foi realizado de acordo com a técnica descrita por Hayashi *et al* (1990), que utiliza lâminas pré-coradas com acridina orange.

Amostras de 5 µl de sangue periférico foram coletadas da veia caudal 24 e 48 h após o tratamento dos animais. Cada amostra foi colocada no centro de uma lâmina pré-corada, coberta com lamínula e mantida no escuro, a -20 ° C, por um período mínimo de 24 h antes da análise. Esta foi realizada em microscópio de luz fluorescente, com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de barreira amarelo (515 nm), em aumento de 1000 x (com óleo de imersão). Foram analisados 1000 reticulócitos por animal para a determinação da frequência de reticulócitos micronucleados. Os resultados foram expressos na forma de média ± desvio padrão e os valores submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância de  $p < 0.05$ .

### **Viabilidade celular e teste do cometa**

Para a realização do teste do cometa, os animais foram distribuídos em 6 grupos de dez, sendo: Grupo 1 (sham) nos quais os animais receberam apenas ração e água *ad libitum*; Grupo 2, os animais foram tratados, por via oral, com o veículo de diluição do OECA (Tween 80 à 8 %); Grupo 3, controle positivo, os animais foram tratados com a MNU na dose única de 7 mg/kg p.c, por via oral; Grupos 4, 5 e 6, os animais receberam dose única do OECA, nas concentrações de 25, 250 e 2500 mg/kg p.c., respectivamente, por via oral. Após 5 horas dos tratamentos, os animais foram sacrificados e os estômagos retirados para a obtenção de células da mucosa gástrica. Para isso, após a gastrectomia, o interior do estômago foi lavado com solução salina (NaCl 0,9%) e a região da cárdia amarrada com fio de algodão. Solução enzimática contendo colagenase tipo I (0,3 mg/mL) e tripsina/EDTA (5 mg/mL) foi injetada no interior do estômago através da região do esfíncter pilórico que, posteriormente, foi também amarrada. Em seguida, o estômago contendo a solução enzimática foi colocado em solução salina e mantido em banho-maria (37°C) por 10 minutos. Após esse período, o estômago foi aberto e a suspensão de células coletada para análise da viabilidade celular e para a realização do teste do cometa.

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio conforme descrito por Strauss (1991). Uma alíquota de 20 µl da suspensão de células foi misturada a uma solução contendo 30 µl diacetato de fluoresceína em acetona (5 mg/kg), 200 µl de brometo de etídio em PBS (200 µl/ml) e 4,8 ml de PBS. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência e consideradas viáveis aquelas que metabolizaram o



diacetato de fluoresceína e coraram-se em verde; células coradas em vermelho foram consideradas mortas. Foram contadas 200 células por alíquota.

O ensaio do cometa foi conduzido de acordo com as metodologias descritas por Singh *et al.* (1988) e Valverde *et al.* (1997) com modificações e todas as etapas realizadas sob luz indireta. Uma alíquota de 30 µl da suspensão de células foi misturada a 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %) e colocada sobre uma lâmina previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal. Em seguida, a lâmina foi coberta com lamínula e deixada a 4 °C por 5 minutos para solidificar a agarose. Após esse período, a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina transferida para uma solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, lauril sarcosinato de sódio 1 %, pH 10; Triton X-100 1% e DMSO 10%) por 24 h. As lâminas foram então lavadas em PBS e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese preenchida com tampão alcalino (EDTA 1mM e NaOH 300 mM, pH 13). Após período de 20 minutos, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por outros 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, desidratadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas até o momento da análise, quando foram coradas com 50 µl de brometo de etídio (20 µl /ml). Foram analisados 50 nucleóides em aumento de 200x, em microscópio de fluorescência (Olympus - BX60) acoplado a sistema de análise de imagem (Comet II - Perspective Instruments, Inglaterra). O parâmetro utilizado para mensurar os danos no DNA foi o *tail intensity*, que representa a porcentagem de DNA na cauda do cometa.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e os valores submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância  $p < 0.05$ .

## Resultados

A Tabela 1 apresenta a frequência de reticulócitos micronucleados em sangue periférico de ratos tratados com o OECA. Os dados mostram que os tratamentos com OECA, nos três níveis de dose, não induziram aumento significativo na frequência de micronúcleo, quando comparados ao grupo tratado com o veículo Tween 80 à 8 % (controle negativo). Resultado semelhante foi observado quando se testou o potencial antimutagênico do OECA, i.e, não foi detectada redução significativa na frequência de células micronucleadas nos grupos de animais que receberam o óleo antes do tratamento com o mutágeno MNU, quando comparados àqueles tratados com Veículo + MNU. Não houve diferença entre o grupo tratado apenas com MNU e o tratado com Veículo + MNU (dado não apresentado).

**Tabela 1.** Frequência de reticulócitos micronucleados em sangue periférico de ratos tratados com óleo essencial de *Citrus aurantiun* (OECA).

Tratamentos (mg/kg)	n	Frequência de Micronúcleo
---------------------	---	---------------------------

24h <sup>1</sup>	48h <sup>1</sup>			
	Veículo	10	1,20 ± 1,31	2,00 ± 1,33
	Veículo + MNU	10	2,80 ± 2,09	9,30 ± 6,05*
OECa	125	10	2,11 ± 1,53	1,44 ± 1,66
	250	10	1,11 ± 1,05	2,44 ± 1,5
	500	10	2,22 ± 1,39	1,44 ± 0,88
OECa	15 + MNU	10	2,00 ± 1,70	11,10 ± 4,22
	30 + MNU	10	4,11 ± 4,62	14,66 ± 6,51
	60 + MNU	10	4,90 ± 3,07	13,11 ± 5,44

Veículo: controle negativo; Veículo + MNU (metilnitrosouréia – 70 mg/kg p.c) controle positivo; <sup>1</sup>resultados de 24 e 48h após o tratamento dos animais; \* p < 0,05 quando comparado ao Tween 80 (ANOVA seguida pelo teste de Tukey)

A Tabela 2 apresenta os dados da avaliação do potencial genotóxico (teste do cometa) do OECa em células de mucosa gástrica de ratos. Os resultados mostram que apenas o tratamento com a maior dose (2500 mg/kg) do OECa induziu aumento estatisticamente significativo (p < 0,01), quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo. Em todos os grupos avaliados a viabilidade das células da mucosa gástrica foi superior a 70%, o que é recomendado para a realização do teste do cometa.

**Tabela 2. Danos no DNA (*tail intensity*) e porcentagem de células de viáveis em mucosa gástrica de ratos tratados com óleo essencial de *Citrus aurantiun* (OECa).**

Tratamentos	n	<i>Tail intensity</i>	Viabilidade celular (%)
-------------	---	-----------------------	-------------------------

Sham	10	12,95 ± 5,34	90,5
Veículo	10	13,39 ± 5,07	91,0
MNU - 7 mg/kg	10	31,18 ± 15,04**	96,5
OECa - 25 mg/kg	10	15,79 ± 6,53	85,5
OECa - 250 mg/kg	10	18,31 ± 3,76	88,0
OECa - 2500 mg/kg	10	29,53 ± 6,07**	90,0

MNU: metilnitrosouréia (controle positivo)

\*\*p<0,01, quando comparado ao veículo (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis)

## Discussão

Considerando a escassez de dados na literatura, este estudo foi conduzido para avaliar o potencial mutagênico do OECa, utilizando-se o teste do micronúcleo em reticulócitos de roedores. O teste do micronúcleo é um método citogenético simples, rápido e capaz de detectar quebras e perdas cromossômicas (aneuploidia) tanto *in vivo* como *in vitro* (Fenech *et al.*, 1997). Os resultados demonstraram ausência de efeito nos três níveis de doses avaliadas, inclusive naquela que corresponde à dose terapêuticamente eficaz nos modelos de avaliação de atividade gastroprotetora. Uma possível hipótese para explicar a ausência de mutagenicidade, é o fato de que o OECa é composto majoritariamente de terpenos (97,8 % de limoneno) e não há dados na literatura que comprovem uma possível atividade mutagênica desse composto. A caracterização fitoquímica do OECa previamente realizada em nosso laboratório aponta para três constituintes principais: limoneno (97,8%), mirceno (1,43%) e octanal (0,45%), demonstrando, assim, que sua

constituição é majoritariamente de terpenos (dados não publicados). Haworth *et al.*, (1983) relataram que o limoneno não foi mutagênico em quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 e TA1537). O mesmo foi detectado por Jameson, (1990) utilizando cultura de células de ovário de hamster chinês, e por Turner *et al.*, (2001) em células do fígado e rins de ratos, indicando que o resultado obtido nesse modelo corrobora os dados encontrados na literatura.

No que se refere ao efeito protetor do OECA sobre danos quimicamente induzidos no DNA, nossos resultados não confirmaram tal atividade. Diferentemente, Kauderer *et al.*, (1991) avaliando a ação do mirceno, outro monoterpene presente no OECA, observou uma redução do efeito mutagênico da ciclofosfamida em linhagem de células V79. Mais tarde, Crowell, (1997) analisando a atividade quimioprotetora de monoterpene presente na dieta de roedores, também observou que o limoneno mostrou-se efetivo contra o câncer de mama durante a fase de iniciação, promoção e progressão. Essa diferença de resultados pode ter ocorrido porque foram utilizados modelos experimentais distintos e/ou porque os outros constituintes presentes no OECA, como o mirceno e o octanal, podem estar influenciando nos possíveis mecanismos responsáveis pela ação quimioprotetora do limoneno.

Estudos preliminares realizados em nosso laboratório indicaram a presença de substâncias gastroprotetoras e cicatrizantes no óleo essencial de *Citrus aurantium*. Nos modelos de avaliação antiulcerogênica com roedores, o OECA exerceu efetiva ação gastroprotetora, com destaque para o modelo de indução de lesões gástricas por etanol absoluto, um dos modelos mais severos a mucosa gástrica. Já a ação cicatrizante em lesões ulcerosas implantadas por ácido acético, o OECA promoveu significativa cicatrização da mucosa gástrica lesada (72%) se comparado aos animais tratados com o veículo (comunicação pessoal).

Diante dos resultados obtidos nos modelos de avaliação antiulcerogênica e cicatrizante do OECA e da ampla utilização comercial de seu constituinte majoritário como aditivo alimentar, no presente estudo foi também avaliado o efeito do OECA sobre o DNA de células da mucosa gástrica de roedores utilizando-se o teste do cometa. O teste do cometa é um teste rápido, de baixo custo e altamente sensível para detectar o potencial genotóxico dos compostos *in vivo* e *in vitro*, podendo ser aplicado para detectar baixos níveis de toxicidade em células individualizadas de diferentes tecidos, utilizando poucas células utilizando poucas cas, e de vectar baixos na análise (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2003; Tice *et al.*, 2000). Nesse experimento, a adequação e padronização na utilização de células da mucosa gástrica foi extremamente relevante devido à importância de se avaliar especificamente o DNA da célula-alvo. Os resultados desse ensaio demonstraram a presença de efeito genotóxico apenas na maior

dose avaliada. As doses inferiores não apresentaram genotoxicidade. De forma semelhante, Sekihashi *et al.* (2002) avaliando, pelo teste do cometa, o efeito do limoneno em múltiplos órgãos de ratos e camundongos constatou ausência de efeito genotóxico em células do estômago de ratos. Suspeita-se que a genotoxicidade observada na maior dose pode ter ocorrido por se tratar de nível de dose extremamente alto e que foge a realidade de seu uso em humanos. Entretanto, mesmo assim, resolvemos testá-la para avaliarmos até que ponto o OECA pode oferecer riscos ao material genético.

Concluindo, os resultados obtidos em ambos experimentos demonstraram que o OECA não apresentou efeito mutagênico e nem antimutagênico frente ao mutágeno MNU, e que na avaliação da genotoxicidade, o OECA demonstrou baixo potencial genotóxico. Assim, diante dos nossos resultados, acreditamos que esse estudo representa uma relevante contribuição para uma avaliação correta do potencial de risco a saúde associada à exposição de produtos naturais, e sugere que, futuramente, após outros testes de toxicidade e carcinogenicidade, este composto poderia ser utilizado para fins terapêuticos.

## Referências Bibliográficas

- Bergonzelli G.E., Donnicola D., Porta N., Chortésy-Theulaz I., 2003. Essential oils as components of diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial agents and Chemoterapy*. 47, 3240-3246.
- Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhler S., Speit G., 2005. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 20, 245-254.
- Cardoso C.R.P., Cólus I.M.S., Bernardi C.C., Sannomiya M., Vilegas W., Varanda E.A., 2006. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*. 225, 55-63.
- Crowell P.R., 1997. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res. Treat.* 46, 191-197.
- Corrêa M.P., Azeredo-Penna L., 1978 *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Cordeiro R., Nunes V.A., Almeida C.R. 1996. *Plantas que Curam*. 1ºed.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.* 392, 11-18.
- Ferreira A.L.A., Savadori D.M.F., Nascimento M.C.M.O., Rocha N.S., Correa C.R., Pereira E.J., Matsubara L.S., Matsubara B.B., Ladeira M.S.P., 2007. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat. Res.* 631, 26-35.
- Hartmann A., Plappert U., Poetter F., Suter W., 2003. Comparative study with the Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.* 536, 27-38.

Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W., Zeiger E., 1983 Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Env. Mut.* 5, 3-142.

Hayashi, M., Morita, I., Komada, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr, M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245-249.

Kauderer B., Zamith H., Paumgatten F.J., Speit G., 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*. *Env. Mol. Mutagen.* 18, 28-34.

Knasmuller S., Steinkellner H., Majer B.J., Nobis E.C., Scharf G., Kassie F., 2002. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. 40, 1051-1062.

National Toxicology Program: Toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies), NTP TR 347. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Institutes of Health, 1990.

Reid K.A., Maes J., Maes A., Van Staden J., De Kimpe N., Mulholland D.A., Verschaeve L. 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *J. of Ethnopharmac.* 106, 44-50.

Rosa R.M., Moura D.J., Melecchi M.I.S., Santos R.S., Richter M.F., Camarão E.B., Henriques J.A.P., Ramos A.L.L.P., Saffi J. 2007. Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol. in Vitro* 21, 1442-1452.

Sanguinetti E.E. 1989. *Plantas que curam*. Porto Alegre. 2<sup>o</sup>ed.

Sannomiya M., Fonseca V.B, Silva M.A., Rocha L.R.M., Santos L.C., Hiruma-Lima C.A., Brito A.R.M., Vilegas W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J Ethnopharmacol.* 97, 1-6.

Santos C.A.M., Torres K.R., Leonart R. 1988. *Plantas medicinais* (herbarium, flora et. Scientia). São Paulo. 2<sup>o</sup>ed.

Santos F.V., Colus I.M.S., Silva M.A., Vilegas W., Varanda E.A., 2006. Assessment of the mutagenic potential of extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food Chem Toxicol.* 44, 1585-9.

Scolastici C., Lima R.O.A., Barbizan L.F., Ferreira A.L.A., Ribeiro D.A., Salvadori D.M.F. 2008. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol. in Vitro.* 22, 510-514.

Sekihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmuller S., Tsuda S., Sasaki Y. F., 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. 517, 53-74.

Silva C.R., Monteiro M.R., Caldeira-de-Araújo A., Bezerra R.J.A.C., 2004. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of Senna (*Cássia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. *Rev. Bras. Farmacog.* 14 (Supl. 1), 1-3.

Singh N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., 1988. Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual clls. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

Strauss G.H., 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.* 252, 1-15.

Sun J. 2007. D-Limonene: Safety and Clinical Applications. *Alt. Med. Review.* 12, 259-264.

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann, A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Env. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

Turner S.D., Tinwell H., Piegorsch W., Schmezer P., Ashby J., 2001. The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male big blue rats. 16, 329-332.

Valverde M., del Carmem Lopez M., Lopez I., Sanchez I., Fortoul T.I., Ostrosky-Wegman P., Rojas E., 1997. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 147-152.

Varanda E.A., Pozetti G.L., Lourenço M.V., Raddi M.S.G., 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *J Ethnopharmacol.* 81, 257-64.

Vieira, L.S. 1992. *Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais.* São Paulo. 2°ed.

# Conclusão

---

## VI- Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- 1) O óleo essencial de *Citrus aurantium* não apresentou efeito mutagênico em reticulócitos do sangue periférico de ratos.
- 2) O óleo essencial de *Citrus aurantium* não apresentou efeito antimutagênico frente ao agente MNU em reticulócitos do sangue periférico de ratos.
- 3) O óleo essencial de *Citrus aurantium* em altas doses pode apresentar efeito genotóxico em células da mucosa gástrica de ratos.



4) A padronização da metodologia de obtenção de células da mucosa gástrica de ratos para a realização do teste do cometa é funcional visto que a viabilidade das células foi superior a 70 %.

## **Referências**

---

### **VII- Referências Bibliográficas**

- Albuquerque U.P., Hanazaki N., 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidade e perspectivas. *Rev. Brás. Farmacog.* 16, 678-689.
- Anderson, D., Yu, T-W., McGregor, D.B., 1998. Comet assay response as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13, 539-555.
- Bergonzelli G.E., Donnicola D., Porta N., Chortésy-Theulaz I., 2003. Essential oils as components of diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial agents and Chemoterapy.* 47, 3240-3246.
- Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhrer S., Speit G., 2005. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* 20, 245-254.
- Boer, J., Hoejmakers, H.J.J., 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinog.* 21, 453-460.
- Cardoso C.R.P., Cólus I.M.S., Bernardi C.C., Sannomiya M., Vilegas W., Varanda E.A., 2006. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology.* 225, 55-63.
- Choy, W.N., 2001. Regulatory Genetic toxicology test. In: *Genetic Toxicology and Câncer Risk Assessment* (chooy, W.N. ed.), Marcel Dekker, Inc, New York.
- Crowell P.R., 1997. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res. Treat.* 46, 191-197.
- Corrêa M.P., Azeredo-Penna L., 1978 *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Cordeiro R., Nunes V.A., Almeida C.R. 1996. *Plantas que Curam.* 1ºed.
- Fairbain, D. W., Olive, P.L., O'Neil, K.L., 1995. The Comet Assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.* 392, 11-18.
- Ferreira A.L.A., Savadori D.M.F., Nascimento M.C.M.O., Rocha N.S., Correa C.R., Pereira E.J., Matsubara L.S., Matsubara B.B., Ladeira M.S.P., 2007. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat. Res.* 631, 26-35.
- González-Avila M., Arriaga-Alba M., de la Garza M., del Carmen Hernández Petrelin M., Domínguez-Ortíz M.A., Fattel-Fazenda S., Villa-Treviño S., 2003. Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicol. in Vitro.* 17, 77-83.
- Hambly, R.J., Rumney, C.J., Cunninghame, M., Fletcher, J.M.F., Rijken, P.L., Rowland, I.R. 1997. Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. *Cacinogenesis*, 18, 1535-9.
- Hartmann A., Plappert U., Poetter F., Suter W., 2003. Comparative study with the Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.* 536, 27-38.

Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W., Zeiger E., 1983 Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Env. Mut.* 5, 3-142.

Hayashi, M., Morita, I., Komada, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr, M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245-249.

Hostettmann K., Queiroz E.F., Vieira P.C., 2003. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EdUFSCar, p.09, 60-61.

Kauderer B., Zamith H., Paumgarten F.J., Speit G., 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*. *Env. Mol. Mutagen.* 18, 28-34.

Knasmuller S., Steinkellner H., Majer B.J., Nobis E.C., Scharf G., Kassie F., 2002. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. 40, 1051-1062.

Lima, R.O.A., 2002. Efeito do extrato aquoso de própolis na carcinogênese de cólon de ratos Wistar. Dissertação (mestrado) apresentada ao programa de pós-graduação em patologia da Faculdade de Medicina de Boutcatu/SP. Exemplar nº T6481, p.7.

Marnewick J.L., Gelderblom W.C., Joubert E., 2000. An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. 471, 157-66.

National Toxicology Program: Toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies), NTP TR 347. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Institutes of Health, 1990.

Olive, P.L., 1989. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat. Res.*, 117, 79-92.

Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microeletroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 291-298.

Pool-Zobel, B.L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scasselati-Sforzolini, R., Rowland, I. 1996. Lactobacillus and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer*, 26, 365-380.

Reid K.A., Maes J., Maes A., Van Staden J., De Kimpe N., Mulholland D.A., Verschaeve L. 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *J. of Ethnopharmac.* 106, 44-50.

Rydberg, B., Johanson, K.J. Estimulation of DNA strand breaks in single mammalian cells. 1978. In: HANAWALT, P.C., FRIEDBERG, E.C., FOX, C.F. (Eds.) DNA repair mechanisms. Academic Press: New York, 465-8.

Rosa R.M., Moura D.J., Melecchi M.I.S., Santos R.S., Richter M.F., Camarão E.B., Henriques J.A.P., Ramos A.L.L.P., Saffi J. 2007. Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol. in Vitro* 21, 1442-1452.

Sanguinetti E.E. 1989. Plantas que curam. Porto Alegre. 2ºed.

Sannomiya M., Fonseca V.B, Silva M.A., Rocha L.R.M., Santos L.C., Hiruma-Lima C.A., Brito A.R.M., Vilegas W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. J Ethnopharmacol. 97, 1-6.

Santos C.A.M., Torres K.R., Leonart R. 1988. Plantas medicinais (herbarium, flora et. Scientia). São Paulo. 2<sup>o</sup>ed.

Santos F.V., Colus I.M.S., Silva M.A., Vilegas W., Varanda E.A., 2006. Assessment of the mutagenic potential of extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. Food Chem Toxicol. 44, 1585-9.

Scolastici C., Lima R.O.A., Barbizan L.F., Ferreira A.L.A., Ribeiro D.A., Salvadori D.M.F. 2008. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. Toxicol. in Vitro. 22, 510-514.

Sekihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmuller S., Tsuda S., Sasaki Y. F., 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. 517, 53-74.

Silva C.R., Monteiro M.R., Caldeira-de-Araújo A., Bezerra R.J.A.C., 2004. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of Senna (*Cássia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. Rev. Bras. Farmacog. 14 (Supl. 1), 1-3.

Singh N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., 1988. Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual clls. Exp. Cell Res. 175, 184-191.

Strauss G.H., 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. Mutat. Res. 252, 1-15.

Suaeyun R., Kinouchi T., Arimochi H., Vinitketkummuen U., Ohnishi Y., 1997. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. Carcinog. 8, 949-55.

Sun J. 2007. D-Limonene: Safety and Clinical Applications. Alt. Med. Review. 12, 259-264.

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann, A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Env. Mol. Mutagen. 35, 206-221.

Tice, R.R., Andrews, P.W., Hirai, O., and Singh, N.P. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. 1991. Adv. Exp. Med. Biol. 283, 157-164.

Turner S.D., Tinwell H., Piegorsch W., Schmezer P., Ashby J., 2001. The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male big blue rats. 16, 329-332.

Valverde M., del Carmem Lopez M., Lopez I., Sanchez I., Fortoul T.I., Ostroshy-Wegman P., Rojas E., 1997. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. Environ. Mol. Mutagen. 30, 147-152.

Varanda E.A., Pozetti G.L., Lourenço M.V., Raddi M.S.G., 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. J Ethnopharmacol. 81, 257-64.

Vieira, L.S. 1992. Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais. São Paulo. 2ªed.

Zaroni M., Pontarolo R., Abrahão W.S.M., Fávero M.L.D., Correa Juniro C., Stremel D.P., 2004. Qualidade microbiológica de plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. Ver. Brás. Farmacog. 14, 29-39.