

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

GABRIELA DE ALMEIDA GRIPPA

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Schinus terebinthifolius* E ESTUDO DE SUA AÇÃO
ANTIFÚNGICA CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* E
in vivo.

VITÓRIA
2009

GABRIELA DE ALMEIDA GRIPPA

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* E ESTUDO DE
SUA AÇÃO ANTIFÚNGICA CONTRA *Colletotrichum
gloeosporioides in vitro* E *in vivo*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração em Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Tamie Matsumoto.

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Rogerio Faustini Cuzzuol.

VITÓRIA

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

G865a Grippa, Gabriela de Almeida, 1984-
Avaliação genotóxica e mutagênica do óleo essencial de
Schinus terebinthifolius e estudo de sua ação antifúngica contra
Colletotrichum gloeosporioides in vitro e in vivo / Gabriela de
Almeida Grippa. – 2009.
102 f. : i.

Orientador: Silvia Tamie Matsumoto.
Co-Orientador: Geraldo Rogerio Faustini Cuzzuol.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. *Schinus terebinthifolius*. 2. *Colletotrichum gloeosporioides*.
3. Aroeira. 4. Cebola. 5. Mamão. 6. Testes de mutagenicidade. 7.
Toxicologia genética. 8. Antimicóticos. I. Matsumoto, Silvia Tamie.
II. Cuzzuol, Geraldo Rogerio Faustini. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV.
Título.

CDU: 57


GABRIELA DE ALMEIDA GRIPPA

“AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* E ESTUDO DE SUA AÇÃO ANTIFÚNGICA CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides* in vivo e in vitro”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 16 de Fevereiro de 2009.

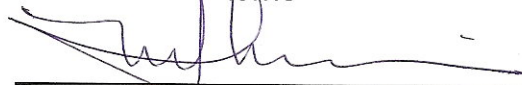
COMISSÃO EXAMINADORA



Profª Drª Silvia Tamie Matsumoto
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Orientadora



Profº Drº Fabrício de Oliveira Reis
Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Examinador Interno



Profª Drª Maria Aparecida Marin-Morales
Unesp
Examinador Externo

Dedico este trabalho aos meus pais Vicente e
Angela e ao meu irmão Tiago.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e meu irmão.

À Prof^a Silvia pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação durante todo o período de estudos, pela dedicação, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Geraldo pela co-orientação e solicitude.

Aos colegas do Grupo de Estudos em Mutagênese (GEMUT): Camila, Iara, Lívia, Luciana, Maressa, Natália, Tatiana, Tatiane, Tiago e Vinícius.

À turma do Mestrado em Biologia Vegetal 2007/1: Ana Paula, Bruna, Elias, Kamila, Mariela, Poliana, Sabrina, Sigrid e Tarsila.

Aos professores Luiz Fernando e Fabrício e aos alunos Wilka e Victor que participaram da avaliação do período pós-colheita do mamão.

Ao professor Fabrício e ao aluno Levi pela ajuda na realização do experimento sobre o efeito antifúngico do óleo essencial.

À Prof^a Silvia e às alunas Maressa e Natália pela ajuda e ensinamentos no experimento de cultura de células de CHO-K1.

Ao Prof. Reginaldo Bezerra dos Santos pelo óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* cedido.

À empresa Caliman pelos frutos de mamão cedidos para o experimento de pós-colheita.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) pelo fornecimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À banca examinadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin-Morales (titular), Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis (titular), Prof^a. Dr^a. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti (suplente), Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (suplente).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pelos ensinamentos.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Na vida, o que aprendemos mesmo é a sempre fazer maiores perguntas”.

Guimarães Rosa.

RESUMO

A espécie *Schinus terebinthifolius* é uma planta de restinga, popularmente conhecida como aroeira, utilizada tanto na medicina popular como na culinária nacional e internacional. Neste trabalho foi analisado o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial extraído do fruto desta planta por meio do teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* e do teste do micronúcleo em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas e o controle negativo, o que demonstra uma ausência de efeito genotóxico e mutagênico em ambos os sistemas teste. Pelos resultados obtidos, a utilização deste óleo é segura, quanto à genotoxicidade, nas concentrações estudadas (0,05, 0,10, 0,50, 1,00 e 2,39%). Neste trabalho também foi avaliado o potencial genotóxico do surfactante Tween 80, utilizado nas diluições do óleo essencial, por meio do teste de aberrações cromossômicas em *A. cepa*. Foram avaliadas as concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8%, não sendo encontradas diferenças significativas entre essas e o controle negativo, o que demonstrou uma ausência de efeito genotóxico para o Tween 80. Assim, sugere-se que o Tween 80 possa ser utilizado como surfactante, em testes temporários de genotoxicidade, para diluição de substâncias hidrofóbicas em água, pois este não induz aberrações cromossômicas. Outra abordagem deste trabalho foi quanto à avaliação do óleo de *S. terebinthifolius* para controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e *in vivo*. As diferentes concentrações de óleo foram diluídas em Tween 80 a 8%. O óleo foi testado *in vitro* nas concentrações de 0,05, 0,10, 0,25 e 0,50%, quanto ao índice de velocidade de crescimento micelial em meio de cultura BDA. A inibição do crescimento do fungo foi diretamente proporcional às concentrações, sendo que a concentração de 0,50% inibiu 79,07% do seu crescimento. No teste *in vivo* foi avaliado o período pós-colheita de frutos de mamoeiro tratados com o óleo a 0,50%. Tais frutos não foram indicados para comercialização, em virtude de características de alta perda de massa fresca, alta firmeza e sintomas de fitotoxicidade. Portanto, em virtude da capacidade inibitória do óleo, sugerem-se estudos com o mesmo óleo em frutos menos sensíveis à fitotoxicidade.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, genotoxicidade, mutagenicidade, *Allium cepa*, CHO-K1, *Carica papaya*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius is a plant popularly known as Brazilian peppertree and occurs in the vegetation of restinga. It is used in the popular medicine and the national and international cookery. In this work have been analyzed the genotoxic and mutagenic potential of the essential oil extracted from the fruit by means of the chromosomic aberration test in *Allium cepa* and the micronucleus test in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). The results had shown that the different tested concentrations of the oil did not have significant differences from the negative control, which demonstrates a genotoxic and mutagenic effect absence in both test systems. Therefore, the use of this oil is secure, with regard to the genotoxicity, in the studied concentrations (0.05, 0.10, 0.50, 1.00 and 2.39%). The genotoxic potential of the surfactant Tween 80, used to dilute the essential oil, was also investigated by chromosomic aberration test in *A. cepa*. The concentrations 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8% have been evaluated and there was no significant differences between these and the negative control, which demonstrates genotoxic effect absence. Thus, Tween 80 does not induce chromosomic aberrations and it suggests that could be used, in temporary genotoxicity tests as surfactant to hydrophobic substance dilution in water. Another part of the work was the evaluation of the essential oil of *S. terebinthifolius* to control the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* and *in vivo*. The different oil concentrations were diluted in Tween 80, 8%. The oil was tested *in vitro*, in the concentrations of 0.05, 0.10, 0.25 and 0.50%, with regard to the mycelial growth velocity index in BDA culture media. The fungus growth inhibition was directly proportional to the concentrations and the 0.50% concentration inhibited 79.07% of the growth. In the *in vivo* test the post harvest period of papaya fruits treated with 0.50% of the oil was evaluated. These fruits had not been indicated for commercialization because the characteristics of high values of mass loss and firmness and also phytotoxicity symptoms. Therefore, because of the oil inhibitory capacity, it is suggested studies with the same oil in less phytotoxicity sensitive fruits.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, genotoxicity, mutagenicity, *Allium cepa*, CHO-K1, *Carica papaya*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* E *in vivo*.

Figura 1 – Aspecto visual externo de um fruto de mamão, utilizado no experimento, colhido no estágio um de maturação.....	75
Figura 2 – Inoculação do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em três pontos do fruto, indicados por seta.....	75
Figura 3 – A - Aplicação dos biofilmes nos frutos. B- Secagem do biofilme.....	76
Figura 4 – Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações do óleo de <i>Schinus terebinthifolius</i> em <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em BDA, no 8º dia após a incubação.....	78
Figura 5 – Valores de perda de massa fresca (PMF) (%) dos diferentes tratamentos de mamão.....	80
Figura 6 – Valores de firmeza (kg.cm^{-2}) dos diferentes tratamentos de mamão.....	81
Figura 7 – Valores de acidez titulável (AT) (% ácido cítrico) dos diferentes tratamentos de mamão.....	82
Figura 8 – Valores de teor de sólidos solúveis (SS) (°Brix) dos diferentes tratamentos de mamão.....	83
Figura 9 – Valores de pH dos diferentes tratamentos de mamão.....	84
Figura 10 – Frutos de mamão no 8º dia após a colheita.....	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – ESTUDO GENOTÓXICO DO SURFACTANTE TWEEN 80, POR MEIO DO TESTE DE *Allium cepa*.

Tabela 1 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas e índice de mutagenicidade obtidos dos tratamentos temporários agudo (24h) e crônico (72h), das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações de Tween 80.....45

Tabela 2 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice de mutagenicidade (IM) obtido dos tratamentos temporários agudo (24h) e crônico (72h), das células F1 de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações de Tween 80.....46

CAPÍTULO 2 – ESTUDO GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO ÓLEO DE *Schinus terebinthifolius*, POR MEIO DE CÉLULAS DE *Allium cepa* E DE CHO-K1 COM BLOQUEIO DA CITOCINESE.

Tabela 1 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas e índice de mutagenicidade obtidos dos tratamentos temporários agudo (24h) e crônico (72h), das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius*.....60

Tabela 2 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice de mutagenicidade (IM) obtido dos tratamentos temporários agudo (24h) e crônico (72h), das células da região F1 de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius*.....61

Tabela 3 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice de mutagenicidade (IM) das células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com bloqueio da citocinese, submetidas a diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius*..... 63

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* E *in vivo*.

Tabela 1 - Valores médios e erro padrão do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (cm.dia^{-1}) e valores médios da capacidade de inibição do IVCM (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* em BDA nas diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius* e nos controles77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

< - Menor que

µL – Microlitro

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

AT – Acidez titulável

BDA – Batata-dextrose-ágar

BRAPEX – Associação Brasileira de Exportadores de Papaya

CHO – Ovário de hamster chinês

cm - Centímetro

CN– Controle negativo

CS – Controle solvente

CP – Controle positivo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

g – Gramas

h - Horas

HCl – Ácido clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas

IM – Índice de mutagenicidade

IVCM - Índice de velocidade de crescimento micelial

kg – Quilogramas

L - Litro

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm - Milímetro

MMS – Metil metano sulfonato

N – Normal

n° - Número

NaOH – Hidróxido de sódio

PBS – Tampão fosfato (Phosphate Buffer Solution)

pH – Potencial hidrogeniônico

PMF – Perda de massa fresca

rpm – Rotações por minuto

SS – Sólidos solúveis

t – Tonelada

TT – Tratamento temporário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 <i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI.....	20
2.2 ENSAIOS CITOGENÉTICOS DE GENOTOXIDADE.....	24
2.2.1 Ensaio de <i>Allium cepa</i>	25
2.2.2 Teste <i>in vitro</i> do micronúcleo em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com bloqueio da citocinese.....	28
2.3 TWEEN 80.....	30
2.4 PÓS-COLHEITA DE MAMÃO E USO DE EMBALAGENS PROTETORAS.....	32
3 OBJETIVOS GERAIS	37
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5 CAPÍTULO 1 - ESTUDO GENOTÓXICO DO SURFACTANTE TWEEN 80, POR MEIO DO TESTE DE <i>Allium cepa</i>	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
5.1 INTRODUÇÃO.....	40
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
5.3 RESULTADOS.....	44
5.4 DISCUSSÃO.....	47
5.5 CONCLUSÕES.....	48

5.6 REFERÊNCIAS.....	49
----------------------	----

6 CAPÍTULO 2 - ESTUDO GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO ÓLEO DE *Schinus terebinthifolius*, POR MEIO DE CÉLULAS DE *Allium cepa* E DE CHO-K1 COM BLOQUEIO DA CITOCINESE.....52

RESUMO.....	52
-------------	----

ABSTRACT.....	53
---------------	----

6.1 INTRODUÇÃO.....	53
---------------------	----

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
------------------------------	----

6.2.1 Caracterização do óleo essencial de <i>Schinus terebinthifolius</i>.....	55
---	-----------

6.2.2 Avaliação genotóxica por meio de <i>Allium cepa</i>.....	56
---	-----------

6.2.3 Avaliação mutagênica por meio de células de CHO-K1 com bloqueio da citocinese.....	58
---	-----------

6.3 RESULTADOS.....	59
---------------------	----

6.3.1 Avaliação genotóxica por meio de <i>Allium cepa</i>.....	59
---	-----------

6.3.2 Avaliação mutagênica por meio de células de CHO-K1 com bloqueio da citocinese.....	62
---	-----------

6.4 DISCUSSÃO.....	63
--------------------	----

6.5 CONCLUSÕES.....	66
---------------------	----

6.6 REFERÊNCIAS.....	67
----------------------	----

7 CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* E *in vivo*.....70

RESUMO.....	70
-------------	----

ABSTRACT.....	71
---------------	----

7.1 INTRODUÇÃO.....	71
---------------------	----

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
------------------------------	----

7.2.1 Controle do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides in vitro</i>	73
7.2.2 Controle do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides in vivo</i>	74
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
7.3.1 Controle do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides in vitro</i>	77
7.3.2 Controle do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides in vivo</i>	79
7.4 CONCLUSÕES	85
7.5 REFERÊNCIAS	86
8 CONCLUSÃO GERAL	90
9 REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Schinus terebinthifolius Raddi, popularmente conhecida como aroeira, é uma espécie de planta pertencente à família Anacardiaceae e utilizada na medicina popular (MELO JÚNIOR et al., 2002). Seu óleo essencial é utilizado no tratamento de problemas respiratórios, micoses e infecções por cândida (LIMA et al., 2006). Os frutos da aroeira também são utilizados como condimento alimentar tanto no mercado nacional quanto internacional (LENZI; ORTH, 2004).

O óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*, segundo Cole (2008), apresenta atividades larvicida, inseticida e repelente contra o *Aedes aegypti*, vetor do agente etiológico causador da dengue. Para alertar sobre riscos potenciais como o câncer e desordens genéticas existem diversos testes que avaliam a genotoxicidade de medicamentos, assim como de plantas utilizadas na medicina popular (RUIZ et al., 1996).

Testes citogenéticos são úteis na identificação dos efeitos danosos de uma dada substância em diferentes níveis de concentração e tempos de exposição. O uso de plantas como organismo teste tem sido indicado e validado por diversas agências ambientais. Dentre as plantas, o *Allium cepa* se mostra eficiente para ensaios de aberrações cromossômicas e testes citogenéticos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). O potencial genotóxico de substâncias também pode ser avaliado por meio de testes de curta duração, como o teste *in vitro* do micronúcleo, utilizando células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), já que tais células são eficientes para detectar a genotoxicidade de compostos por meio do teste do micronúcleo (AARDEMA et al., 2006).

Para se avaliar os efeitos de diferentes concentrações do óleo de *S. terebinthifolius*, é necessário que primeiramente se promova sua diluição em água. O surfactante Tween 80 é capaz de promover a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água (FENG et al., 2006), inclusive a do óleo de *S. terebinthifolius*. Desta forma, para se avaliar os efeitos de diferentes concentrações do óleo de *S. terebinthifolius*, há também a necessidade de avaliar o surfactante (Tween 80) onde ele é diluído.

Segundo Feng e Zheng (2007) o uso de óleos essenciais é promissor para o desenvolvimento de agentes antifúngicos, por serem relativamente seguros e

largamente aceitos pelos consumidores e terem a possibilidade de apresentar ações antimicrobianas e antifúngicas.

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é o mais importante agente causal de doenças pós-colheitas em frutos e causa a antracnose no mamão (TAVARES; SOUZA, 2005). A cultura do mamão é bem desenvolvida no Espírito Santo, sendo em 2007, o estado que mais exportou mamão, correspondendo a 49% da produção nacional (BRAPEX, 2008).

Desta forma, é interessante observar se o óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresenta propriedades fungitóxicas contra a ação do fungo patogênico *C. gloeosporioides in vitro*, bem como se também controlaria o fungo inoculado no fruto do mamoeiro (*in vivo*), durante o período de pós-colheita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Schinus terebinthifolius* RADDI.

Schinus terebinthifolius Raddi pertence à família Anacardiaceae e é uma árvore perene nativa do Brasil, Paraguai e Argentina (MEDAL et al. 1999). Tem de 5 a 10 metros de altura, folhas compostas imparipinadas com 3 a 10 pares de folíolos aromáticos, flores masculinas e femininas muito pequenas, tronco com casca espessa, copa larga, é perenifólia e dióica (LORENZI; MATOS, 2002). Cresce em condições tropicais, em ecossistemas costeiros e pouco interiores. Ocorre no Brasil na vegetação de caatinga do Nordeste e na restinga do litoral desde o estado do Ceará ao Rio Grande do Sul e é largamente distribuída no Espírito Santo (KUKI et al., 2008; SANTOS et al., 2004).

É conhecida no Brasil por diferentes nomes populares, tais como, aroeira, aroeira da praia, aroeira-vermelha e aroeira-pimenteira. Já seus frutos são conhecidos como pimenta brasileira ou pimenta rosa. Internacionalmente, a árvore é conhecida como Brazilian peppertree e os frutos como pink-pepper ou poivre rose (LENZI; ORTH, 2004).

Seus frutos são do tipo drupa, globóides, aromáticos e apresentam coloração vermelha quando maduros. A casca do fruto, quando seca, se transforma em uma espécie de concha de papel que envolve a semente, a qual apresenta coloração marrom escura e com diâmetro de aproximadamente 0,3 milímetros (LORENZI; MATOS, 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004).

Atualmente, a demanda para o consumo de seus frutos tem aumentado muito, já que estes são utilizados como condimento alimentar na culinária nacional e internacional. As áreas de produção de frutos se encontram principalmente em áreas de restinga do litoral brasileiro e é realizada por populações naturais por coleta manual (LENZI; ORTH, 2004).

S. terebinthifolius foi introduzida na Flórida, Estados Unidos, entre 1898 e 1900, como planta ornamental, e se espalhou pela Flórida, Califórnia, Texas e Havaí, tornando-se uma planta invasora. Suas características, como alta taxa de

crescimento, alta produção de sementes, rápida recuperação após dano, tolerância a várias condições ambientais, polinização por insetos e dispersão por animais, permitem sucesso como invasora (DONNELLY; GREEN; WALTERS, 2008; MANRIQUE et al., 2008).

Essa espécie também é conhecida por suas propriedades medicinais, sendo seu uso amplamente difundido no Nordeste do Brasil para tratamento de diversas infecções (AMORIM; SANTOS, 2003). A literatura etnobotânica cita o uso popular das cascas do tronco em banhos de acento após o parto (como antiinflamatório e cicatrizante) e em casos de hemorragia uterina, bem como para tratamento de doenças dos sistemas urinário e respiratório, de ferimentos na pele ou mucosas em geral, de hemorróidas inflamadas (LORENZI; MATOS, 2002), de cervicites e de corrimento genital (SANTOS; AMORIM, 2002).

Uma preparação feita a partir do cozimento da entrecasca ou dos frutos é utilizada na forma de gargarejos, bochechos e compressas para tratar inflamações da gengiva e garganta, e também pode ser bebida para combater azia e gastrite. Já as folhas e frutos são adicionados à água de lavagem para tratar feridas e úlceras (LORENZI; MATOS, 2002). O uso das preparações de *S. terebinthifolius* deve ser realizado com cautela já que há possibilidade de aparecimentos de fenômenos alérgicos na pele e nas mucosas (LORENZI; MATOS, 2002). *S. terebinthifolius* também está contido em um produto farmacêutico lançado no Brasil em 1999, o qual contém gel de aroeira, sendo este produto eficaz e seguro para o tratamento da vaginose bacteriana (AMORIM; SANTOS, 2003).

Segundo Lima et al. (2006) óleo essencial de *S. terebinthifolius* é utilizado topicamente para tratar problemas respiratórios, micoses e infecções por cândida.

Devido à ampla utilização de *S. terebinthifolius* na medicina popular é interessante realizar estudos farmacológicos e clínicos, visando à validação como medicamento eficaz e seguro (LORENZI; MATOS, 2002).

O extrato hidroalcoólico da entrecasca de *S. terebinthifolius* foi avaliado em relação ao processo de cicatrização em ratos e apresentou um efeito favorável no processo de cicatrização em citostomias (LUCENA et al., 2006), entretanto não alterou o processo de cicatrização do estômago, quanto à avaliação macroscópica, tensiométrica e microhistológica (SANTOS et al., 2006). O extrato etanólico da casca

do tronco teve uma boa ação cicatrizante de alveolites em ratos pela análise histológica (MELO JÚNIOR et al., 2002).

A fração etil acetato de folhas de *S. terebinthifolius* apresentou propriedade antialérgica em ratos com edemas induzidos nas patas, inibindo a formação do edema (CAVALHER-MACHADO et al., 2008).

A indústria internacional de cosméticos também faz uso desta planta, utilizando um composto obtido do extrato da semente em um produto para cuidados pessoais. Este produto é recomendado para tratamento facial e corporal e massagens, uma vez que, segundo os fabricantes, aumenta o bem-estar da pele (STIMULATE, 2007).

O extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antifúngica moderada contra *Candida albicans* e forte contra *Cryptococcus neoformans*, além de atividade antileishmanica contra *Leishmania amazonensis* (BRAGA et al., 2007). Extratos aquosos obtidos por decocção de flores, folhas e caule de *S. terebinthifolius* também apresentaram ação contra *C. albicans* sendo que as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica são fortemente apolares (SCHMOURLO et al., 2005). Extratos de folhas de *S. terebinthifolius* avaliadas pelo método de bioautografia foram eficientes contra *Candida krusei* e *Candida glabrata* (extração por etil acetato) e *Sporothrix schenckii* (extração por diclorometano e etanol). Já o extrato do tronco, por etil acetato, teve atividade contra *Cryptococcus neoformans* (JOHANN et al., 2007).

Extrato da casca do tronco de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias *Enterococcus* do grupo-D, *Bacillus corineforme*, *Streptococcus* β -hemoliticus e *Streptococcus viridians*, sendo tal atividade antibacteriana melhor do que as apresentadas pelos antibióticos utilizados, usualmente, no tratamento de alveolites (MELO JÚNIOR et al., 2002).

Alguns autores descrevem que esta espécie apresenta atividade antioxidante. Velázquez et al. (2003), estudando a atividade antioxidante de extratos metanólicos de plantas utilizadas na medicina popular do Paraguai, relataram que o extrato das partes aéreas de *S. terebinthifolius* protege contra a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em membranas de microssomos do fígado de ratos. Tal extrato apresentou a maior atividade inibitória, dentre os extratos testados, em relação à atividade anti-peroxidativa, quando testado no sistema dependente Fe^{+2} /ascorbato.

Também apresentou alta capacidade de seqüestrar radicais livres para o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e os ânions superóxidos.

Degáspari, Waszczynskyj e Santos (2004) estudaram a ação antioxidante dos frutos de *S. terebinthifolius*, por meio do sistema β -caroteno/ácido linoléico. O extrato alcoólico apresentou um poder antioxidante 4 vezes menor que os antioxidantes artificiais (BHA e BHT) e o extrato aquoso um poder 6 vezes menor. Os autores consideraram como sendo um bom poder antioxidante, já que em extratos vegetais o poder antioxidante é, em geral, mais fraco que os antioxidantes artificiais.

Há relatos de propriedades alelopáticas para esta espécie, como descrito por Morgan e Overholt (2005) que observaram que extratos aquosos de *S. terebinthifolius* diminuíram tanto a germinação de sementes como a biomassa das plântulas de *Bidens alba* e *Rivina humilis*. Donnelly, Green e Walters (2008), estudando as plantas de mangue *Rhizophora mangle* e *Avicennia germinans*, observaram que os frutos triturados de *S. terebinthifolius* afetaram o crescimento, a produção de folha e a biomassa de plântulas de ambas as espécies. Nesello, Serafini e Pauletti (2007) observaram efeito alelopático do óleo de *S. terebinthifolius* sob a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação e comprimento radicular das plantas de *Lactuca sativa* (alface) e *Bidens pilosa* (picão-preto). Embora diversos estudos tenham relatado as propriedades alelopáticas desta espécie em laboratório, o efeito no ambiente natural ainda é desconhecido (DONNELLY; GREEN; WALTERS, 2008).

Os frutos de *S. terebinthifolius* são ricos em óleo essencial, variando de 5,50 a 8,41% do peso seco. Esse óleo essencial apresentou atividades larvicida, inseticida e repelente contra o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor do vírus da dengue (COLE, 2008).

A dengue é uma doença presente nos cinco continentes que pode gerar quadros clínicos graves e letais. O principal meio de controle desta doença é o combate do mosquito vetor (FURTADO et al., 2005). Desta forma, tem sido cada vez mais importante estudos que possibilitem a descoberta de meios de controlá-la.

Cole (2008) estudando a composição química do óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius*, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, revelou predominância de terpenos. Os mais abundantes foram os

monoterpenos (85,81%), sendo os principais constituintes o δ -3-careno (30,37%), o limoneno (17,44%), o α -felandreno (12,60%), o α -pineno (12,59%), o mirceno (5,82%), e o o-cimeno (3,46%). Os sesquiterpenos *trans*-cariofileno, γ -muuruleno, *E,E*- α -farneseno, δ -cadineno e epi- α -cadinol corresponderam a 5,34%.

2.2 ENSAIOS CITOGENÉTICOS DE GENOTOXIDADE

Para que uma substância, como o óleo essencial extraído de frutos de *S. terebinthifolius*, seja utilizado topicamente, é importante que se investigue o seu potencial genotóxico.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 60 a 80% da população mundial depende, essencialmente, de plantas para cuidar da saúde, devido à pobreza e falta de acesso à medicina tradicional. Todavia, apenas poucas espécies, 15 a 17%, foram cientificamente estudadas em relação à qualidade, segurança e eficácia (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Apesar dos cientistas da América Latina estarem se esforçando no estudo das plantas medicinais locais, os dados ainda são insuficientes para garantir a qualidade, eficácia e segurança da utilização dessas plantas (CALIXTO, 2005).

Para alertar sobre riscos potenciais como o câncer e desordens genéticas existem diversos testes que avaliam a genotoxicidade de remédios, assim como de plantas utilizadas na medicina tradicional. Entretanto, as informações, se disponíveis, são dispersas e escassas (RUIZ et al., 1996).

Os agentes mutagênicos têm a propriedade de alterar a seqüência de bases do DNA, podendo aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão e culminar no aparecimento das neoplasias (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

2.2.1 Ensaio de *Allium cepa*.

Aproximadamente 200 bioensaios que utilizam plantas como organismos teste são conhecidos. Estes testes são em geral mais sensíveis para detectar efeitos genotóxicos de poluentes ambientais (MA, 1999). Desde a década de 70 os bioensaios com plantas superiores têm sido recomendados pelo Comitê da Sociedade de Mutagênese Ambiental, pela Organização Mundial da Saúde e pelo Conselho Nacional Sueco de Proteção Ambiental para detectar substâncias genotóxicas (GRANT, 1999).

De acordo com Constantin e Owens (1982) os bioensaios que utilizam plantas apresentam muitas vantagens, tais como: equipamentos e materiais mais baratos, a similaridade na morfologia dos cromossomos das plantas com os de mamíferos, a resposta aos agentes mutagênicos semelhantes aos animais, bem como a adaptação única a estudos *in situ*.

Várias plantas, como *Vicia faba*, *Tradescantia paludosa* e *Allium cepa*, são amplamente utilizadas para determinar o efeito biológico de químicos (ATEEQ et al., 2002). Os bioensaios com essas plantas já são usados desde antes de 1940, para estudar a mutagenicidade de químicos e, mais recentemente, de poluentes ambientais (GROVER; SATWINDERJEET, 1999).

O ensaio com *Allium* foi introduzido por Levan em 1938 e foi proposto como um método padrão para testar químicos e monitorar a toxicidade de águas de rios (RANK; NIELSEN, 1993). Esse teste foi valorizado, após a sua utilização na avaliação dos poluentes do solo e da água, como clorofenóis, alumínio, metais pesados, químicos de efluentes industriais e pesticidas (KRISTEN, 1997).

Para a espécie *A. cepa* é utilizada a região meristemática das raízes em estudos clastogênicos desde o início da década de 30. As freqüências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos começaram a ser utilizadas um pouco antes da década de 80 (MA et al., 1995).

O teste genotóxico que utiliza o *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Segundo Bagatini, Silva e Tedesco (2007) o *A. cepa* é bastante utilizado para a avaliação da citotoxicidade de plantas medicinais, pois as raízes ficam em contato direto com a substância testada, permitindo também a avaliação das diferentes concentrações.

O *A. cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo teste de citotoxicidade e genotoxicidade devido à cinética de proliferação, ao crescimento rápido das raízes, ao grande número de células em divisão, à alta tolerância a diferentes condições de cultivo, à disponibilidade durante todo o ano, ao fácil manuseio e ao fato de possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (HOSHINA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006).

Segundo Matsumoto et al. (2006), as alterações cromossômicas mais freqüentes no ensaio de *A. cepa* são discutidas por diversos autores que relatam que as mais significativas são as células com C-metáfase, aderência, quebras, pontes e atrasos cromossômicos, células binucleadas e com micronúcleos.

Kovalchuk et al. (1998) relatam que fragmentos cromossômicos são resultantes de quebras no cromossomo e na cromátide, que a C-mitose é resultante de distúrbio no fuso, compreendendo C-mitose completa (sem fuso) e anáfase multipolar (fuso parcialmente interrompido) e que a aderência cromossômica consiste em cromossomos com superfície com aderência.

A indução da formação de micronúcleos é comumente utilizada para detectar danos genéticos derivados da exposição a um agente mutagênico (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Sua formação é resultado de fragmentos acêntricos ou atrasos cromossômicos, sendo excluídos do núcleo durante a mitose e é revelado na geração subsequente nas células em interfase ou prófase (MA et al., 1995; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

Ma et al. (1995) defendem que, como os micronúcleos apenas são revelados na geração subsequente de células, em prófase ou interfase (células F1), a contagem dos micronúcleos deveria ser feita na região F1 da raiz e não apenas na região meristemática, como é realizado comumente. Os autores compararam a contagem da região meristemática com a contagem da região F1 de raízes de *A. cepa* tratadas com formaldeído, mitomicina C e hidrazido maleico. Foi encontrada uma maior

freqüência de micronúcleos na região F1, o que indicou uma maior sensibilidade aos danos mutagênicos nesta região.

Diversos estudos utilizando *A. cepa* como sistema-teste relataram a investigação do potencial mutagênico de agentes químicos ambientais, como os pesticidas. Ateeq et al. (2002) estudaram os herbicidas pentaclorofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e butaclor e observaram que os três químicos induziram aberrações cromossômicas em *A. cepa*, sendo que o pentaclorofenol apresentou maior freqüência. As raízes tratadas com concentrações maiores de 2,4-D se apresentaram quebradas e com tumorização. As tratadas com butaclor apresentaram maior número de anáfase multipolar, revelando ser este agente um inibidor do fuso mitótico. Já as tratadas com pentaclorofenol apresentaram maior número de quebras, pontes, aderência e atrasos cromossômicos, evidenciando ser um agente clastogênico.

Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007) estudaram o efeito genotóxico do herbicida trifluralina em células meristemáticas de *A. cepa*. Constatou-se que tal herbicida, que atua impedindo a polimerização dos microtúbulos, impedia que ocorresse a perfeita divisão nuclear das células, o que levava à formação de células poliplóides. Foi evidenciado também que o material excedente era expulso do núcleo na forma de micronúcleos e, posteriormente, microcitos.

O inseticida fipronil também foi estudado por meio do *A. cepa* por Pedro (2008) e foi constatado que o mesmo induz aberrações cromossômicas e micronúcleos. E que estes são potencializados na presença de luz, provavelmente, em virtude de metabólitos decorrentes da fotólise do inseticida.

O ensaio de *A. cepa* também tem sido bastante utilizado em estudos de monitoramento ambiental. Grover e Satwinderjeet (1999) observaram a indução de aberrações na anáfase e micronúcleos nas células de raízes de *A. cepa* tratadas com efluentes industriais na Índia. Matsumoto et al. (2006) utilizaram o teste de *A. cepa* para estudar a genotoxicidade do efluente de uma indústria de curtume despejado no rio e observaram maior freqüência de aberrações cromossômicas e micronúcleos nas amostras da água do rio coletadas próximas ao efluente, as quais continham maior quantidade de cromo.

Grippa (2007) avaliou o rio Santa Maria da Vitória/ES, por meio do *A. cepa*, e observou maior frequência de células com aberrações cromossômicas e micronúcleo no período chuvoso e relacionou ao uso indiscriminado de agrotóxicos que ocorre na bacia e, com a chuva, são carregados para o rio. Christofolletti (2008) estudou um lago urbano artificial e observou genotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa* em todas as quatro coletas realizadas, tanto na estação de estiagem quanto na chuvosa.

Têm-se também estudos que investigaram plantas medicinais por meio do ensaio com *A. cepa*. Teixeira et al. (2003) estudaram as infusões das plantas medicinais *Psidium guajava* e *Achillea millefolium* e observaram uma inibição do índice mitótico de *A. cepa* tratado com a maior concentração (26 mg/mL) de *P. guajava* e não encontraram inibição para *Achillea millefolium*. Também não encontraram alterações nas frequências de aberrações e micronúcleos. Os autores também evidenciaram a importância de se avaliar as plantas medicinais em virtude de seu consumo pela população.

Camparoto et al. (2002), estudando as atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas de infusões de duas plantas medicinais pelo teste de *A. cepa* não encontraram tais atividades para *Maytenus ilicifolia* e constataram somente a atividade citotóxica (inibição do índice mitótico) para *Bauhinia candicans* na maior dose (4,65 mg/mL). Os autores ressaltaram a importância da observância das doses utilizadas e da duração do tratamento para as pessoas que fazem uso dessas plantas, com a finalidade de evitar uma possível toxicidade.

2.2.2 Teste *in vitro* do micronúcleo em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com bloqueio da citocinese.

O ensaio do micronúcleo é largamente utilizado como teste citogenético para avaliar o dano cromossômico *in vivo* ou *in vitro* (SOUZA; FONTANETTI, 2006). A formação do micronúcleo ocorre durante a divisão mitótica ou meiótica e pode ocorrer em virtude da fragmentação cromossômica derivada da quebra cromossômica ou da

perda cromossômica, na qual os cromossomos inteiros não conseguem se deslocar ao pólo do fuso (FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

O teste do micronúcleo *in vitro* é bastante atrativo para avaliar os danos genotóxicos, em virtude da simplicidade de contagem, da facilidade de ser realizado e da grande aplicabilidade em diversos tipos celulares (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; MARZIN, 1997).

As linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO) apresentam as vantagens de possuir um número cromossômico relativamente pequeno (20-22 cromossomos) e não precisar de estimulação mitótica para o crescimento já que a maioria das células já está em divisão (AARDEMA et al., 2006). Estas células, segundo Rabello-Gay et al. (1991, apud LIMA, 2007), também apresentam as vantagens de: facilidade de padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura e densidade populacional); uniformidade metabólica e comportamental, o que possibilita os tratamentos serem desenvolvidos em várias fases do ciclo celular; rapidez; economia; boa reprodutividade e a organização cromossômica ser igual das células *in vivo*.

A cultura de células de CHO é bastante utilizada atualmente. Phelps et al. (2004) estudaram, por meio da avaliação de citotoxicidade em células CHO-WBL, 12 produtos químicos que são conhecidamente agentes genotóxicos (sulfato de vinblastina, griseofulvina, mitomicina C, metil metano sulfonato, ciclofosfamida, 7,12-dimetilbenzantraceno, sulfato de bleomicina, peróxido de hidrogênio, etoposido, actinomicina D, fenol e hidroxiurea). Os autores encontraram citotoxicidade em todos os tratamentos, o que demonstrou a sensibilidade das células de linhagem CHO em relação a agentes genotóxicos.

Aardema et al. (2006) observaram freqüências elevadas de micronúcleos em células de CHO-WBL tratadas com compostos genotóxicos (bleomicina, citosina arabinoside e dietilstilbestrol), o que revelou a compatibilidade de células CHO para detectar substâncias genotóxicas por meio do teste *in vitro* do micronúcleo.

Em um estudo de DeMarini et al. (2008), células de CHO-K1 foram tratadas com 10 condensados de fumaça de cigarro, separadamente. Foram encontradas induções de aberrações cromossômicas em 9 tratamentos, o que confirmou o risco do fumo

para a saúde humana e a sensibilidade das células de CHO-K1 para utilização em ensaios de avaliação de danos genotóxicos.

Outro estudo, realizado por Koyama et al. (2003), utilizou a formação de micronúcleos em células de CHO-K1 para avaliar a mutagenicidade de campos eletromagnéticos de alta frequência. Os autores concluíram que exposições à taxa de absorção específica menor que 50 W/kg, como a taxa de telefones celulares, não induz micronúcleos em células de CHO-K1.

Diaz et al. (2007) avaliaram 8 compostos aneugênicos, 25 clastogênicos e 13 não genotóxicos por meio de um teste do micronúcleo em células de CHO-K1 realizado de maneira automatizada. Segundo os autores, o teste automatizado é uma alternativa válida, já que a maior parte dos compostos genotóxicos apresentou maior quantidade de células micronucleadas com o aumento da concentração e tais resultados foram bem próximos aos realizados por contagem manual. Desta forma, verifica-se que o teste de CHO-K1 é eficiente na avaliação de substâncias genotóxicas.

A cultura de células CHO-K1 também pode ser utilizada para avaliação da ação antimutagênica de substâncias, como no estudo de Lima (2007). O autor estudou o extrato aquoso da casca de *Rhizophora mangle*, o qual é utilizado na fabricação da panela de barro, e observou atividade desmutagênica, tendo o extrato, segundo o autor, a propriedade de inativar, química ou enzimaticamente, os agentes mutagênicos antes deles interagirem com o material genético.

2.3 TWEEN 80

Para realizar a diluição de substâncias hidrofóbicas em água, como óleos, é necessária a utilização de solventes. O Tween 80 ou polisorbato 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) é um surfactante não-iônico utilizado para emulsificar óleo em água (FENG et al., 2006), bastante conhecido e disponível comercialmente (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992). É utilizado largamente em preparações farmacológicas, como

aditivo alimentar e como emulsificante, estabilizador ou dispersante (DAHER; BAROODY; HOWLAND, 2003).

Em relação à toxicidade de diferentes tipos de surfactantes, os não-iônicos são os menos tóxicos, os surfactantes aniônicos são intermediários e os catiônicos são mais tóxicos (JIN et al., 2007).

O Tween 80 é utilizado como solvente e emulsificante, pela indústria farmacêutica, na fabricação de medicamentos. A sua quantidade em suspensões farmacêuticas pode ser analisada por meio da cromatografia líquida de alto desempenho (HU et al., 2003).

O Tween 80 é comumente usado como aditivo alimentar nos Estados Unidos. Quando ingerido, é quebrado em gorduras e absorvido no jejuno (WOOD, KATZBERG, 1978). Também é utilizado no preparo de rações para animais, sendo reconhecidamente seguro. É indicada a sua utilização a ruminantes, já que ele aumenta potencialmente a atividade da protease e a degradação da celulose, aumentando a utilização do alimento, o que aumenta o desempenho do animal (KAMANDE et al., 2000).

Daher, Baroody e Howland (2003), estudando o número e tamanho de quilomícrons secretados durante a absorção de lipídios em ratos, observaram que ratos tratados com soluções de Tween 80 de 1 e 10% tinham a capacidade de absorver as gorduras da dieta aumentada, já que os quilomícrons ficavam menores e em maior quantidade. Entretanto a concentração de 10% teve aparente efeito tóxico e irritante no sistema gastrointestinal.

De acordo com Santos et al. (2004) o surfactante Tween 80 a 1% apresenta efeito de inibição do crescimento de radículas de plântulas de alface, com redução de comprimento da raiz e do hipocótilo. Entretanto não alterou o índice de velocidade de germinação e a percentagem de germinação.

Segundo Jin et al. (2006) os surfactantes, como o Tween 80, são utilizados em sedimentos contaminados para liberar os contaminantes para a água e esta, então, passar por tratamentos físico e biológico.

Moreno (2000) estudou o índice de irritação de surfactantes, por meio dos testes de liberação de ácido aracdônico (mediador antiinflamatório) e do vermelho neutro, na cultura de fibroblastos 3T6 *in vitro*. O autor observou que Tween 80 foi o menos

irritante e citotóxico dos quatro surfactantes testados. Os surfactantes cloreto de benzalconio e dodecilsulfato de sódio foram os mais irritantes e citotóxicos e foram seguidos pelo cocoamidopropilbetaino e, finalmente, o Tween 80.

Diversos experimentos de pós-colheita utilizaram Tween 80 na diluição de produtos apolares a serem aplicados nos frutos. Lima et al. (1999) utilizaram Tween 80 para aplicar o fungicida Benomyl em pêssegos após a colheita. Os autores mantiveram os frutos em temperatura de $1\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ de umidade relativa e estes ficaram adequados ao consumo até o 30° dia de armazenamento.

Ribeiro et al. (2007) investigaram a vida pós-colheita de frutos de morango com revestimento comestível, no qual foi adicionado Tween 80 para realizar a solubilização deste revestimento, e obtiveram um retardamento da senescência destes frutos. Casariego et al. (2008) estudaram a aplicação de uma película comestível em tomate e cenoura e obtiveram a composição de 1,5% de quitosana e 0,1% de Tween 80, como sendo a melhor composição para contribuir com o aumento da vida de prateleira destes frutos.

O Tween 80 é utilizado em ensaios para avaliação de genotoxicidade de substâncias hidrofóbicas, como no teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos Wistar (FONSECA, 2008), e para avaliação da antimutagenicidade, como nos testes de Ames e *Drosophila* “wing spot” (KAREKAR; JOSHI; SHINDE, 2000).

Em ensaios realizados com ratos e camundongos, de ambos os sexos, pela Universidade da Califórnia (2008), em um projeto de classificação da carcinogenicidade de substâncias químicas ('The Carcinogenic Potency Project'), o Tween 80 foi classificado como não carcinogênico.

2.4 PÓS-COLHEITA DE MAMÃO E USO DE EMBALAGENS PROTETORAS.

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea, tipicamente tropical. Sua origem é, provavelmente, a Bacia Amazônica Superior, onde sua diversidade genética é máxima (CARVALHO, DAIUTO; LIMA, 1998). Atualmente, é cultivado em mais de 40 países (ROCHA et al., 2007).

Segundo o IBGE (2008) o Brasil apresentava, em 2006, uma área plantada de cerca de 37 mil hectares e uma produção de 1,9 milhões de toneladas (t) de mamão papaia. Em 2007, a exportação brasileira equivaleu a, aproximadamente, 32 mil toneladas (IBRAF, 2008). De acordo com BRAPEX (2008) os países de destino que mais importaram o mamão brasileiro, em 2007, foram Holanda (cerca de 9 mil t), Estados Unidos (cerca de 4,5 mil t) e Portugal (cerca de 4,3 mil t).

O Espírito Santo, em 2006, apresentou uma área plantada de, aproximadamente, 9,4 mil hectares, produzindo cerca de 750 mil t de mamão (IBGE, 2008). Em 2007, o Espírito Santo foi o estado que mais exportou mamão em kg, correspondendo a 49% da produção nacional (BRAPEX, 2008). A cultura deste fruto está localizada na região norte do estado, onde as condições climáticas e de solo e as tecnologias empregadas geram um elevado padrão de qualidade aos frutos (SILVA, 2008).

A polpa do mamão, por causa de suas características organolépticas, químicas e digestivas, é um alimento ideal e saudável para todas as idades (FIORAVANÇO et al., 2006). Ele tem alta aceitabilidade entre os consumidores e é consumido, em sua maior parte, na forma *in natura* (ROCHA et al., 2007).

Frutos como mamão, maçã, banana, pêra, pêsego e melão são chamados climatéricos. Os frutos climatéricos são os que apresentam, antes da fase de amadurecimento, um pico na produção de etileno, seguido por um aumento característico da respiração. Tais frutos amadurecem depois de colhidos (TAIZ; ZEIGER, 2004; YAMANISHI et al., 2005).

O mamão completa o amadurecimento em, aproximadamente, uma semana sob condições ambientais (FOLEGATTI; MATSUURA, 2002). Durante o período pós-colheita há um amaciamento do mesocarpo e do endocarpo e a produção dos açúcares e constituintes do flavor (PAULL; CHEN, 1983), o que resulta nas propriedades organolépticas desse fruto.

Após a colheita do mamão o amadurecimento ocorre rapidamente, com a produção de etileno e aumento da taxa respiratória, por isso caracteriza-se o fruto como bastante perecível. Em vista de manter a qualidade dos frutos para o mercado interno e externo, faz-se necessário evitar o rápido amolecimento e a incidência de podridões (JACOMINO et al., 2002).

Segundo Lucena et al. (2004) a manutenção da qualidade dos frutos apreciados na alimentação se define por apresentar bons sabores, textura e olfato, além de boa aparência visual, em relação à cor, conformação e tamanho.

A vida pós-colheita pode ser reduzida por causa de fatores pré e pós-colheita, como patógenos e fatores abióticos, os quais originam perdas quantitativas e/ou qualitativas (FOLEGATTI; MATSUURA, 2002).

As perdas que ocorrem na pós-colheita costumam ser mais numerosas que as perdas no campo, uma vez que, durante o armazenamento, os frutos se modificam fisiologicamente, o que ativa microorganismos que o degradam (FENG et al., 2008).

A vida pós-colheita do mamão é aumentada em ambientes refrigerados de 10 a 12°C, sendo que a temperatura não deve ser inferior, já que tal fruto é sensível ao frio, apresentando injúrias. Entretanto, a maior parte da produção brasileira é comercializada a temperatura ambiente. Por isso, é importante o desenvolvimento de outras técnicas que também ampliem a vida pós-colheita dos frutos, em vista de ampliar o período de comercialização (ROCHA et al., 2007; JACOMINO et al., 2002; GONZÁLEZ-AGUILAR; BUTA; WANG, 2003).

Com o objetivo de manter a qualidade dos frutos no período pós-colheita existem diversas técnicas que se baseiam na redução da taxa respiratória e prevenção de desordens bióticas e abióticas (SOLON et al., 2005).

O uso de embalagens protetoras é uma estratégia que visa controlar a perda de água excessiva do fruto por meio da transpiração e reduzir a respiração pelas trocas gasosas com o meio (OLIVEIRA JÚNIOR; COELHO; COELHO, 2005). Assim, consegue-se retardar a senescência do produto, aumentando sua vida útil pós-colheita (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2004). Um tipo de embalagem protetora são os biofilmes, os quais são elaborados à base de macromoléculas biológicas capazes de formar uma matriz contínua (KESTER; FENNEMA, 1986). Os biofilmes comestíveis podem ser consumidos ainda com a película. Tem sido bastante estudado o biofilme formado por biopolímeros de amido, sendo a fécula de mandioca a matéria-prima mais indicada. Tal película é resistente e transparente, é eficiente contra a perda de água, oferece brilho e bom aspecto aos frutos, não é tóxica, pode ser removida do fruto e apresenta baixo custo (LEMOS et al., 2007; LUCENA et al., 2004).

O mais importante agente causal de doenças pós-colheitas em frutos é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (TAVARES; SOUZA, 2005). Um único isolado deste patógeno pode originar tanto a antracnose quanto a mancha chocolate, podendo a lesão permanecer superficial ou penetrar no parênquima (ALVAREZ; NISHIJIMA, 1987). No Brasil e outros países tropicais a antracnose é a doença pós-colheita mais comum do mamão (CIA et al., 2007).

O fungo sobrevive em pecíolos e folhas velhas, de onde seus conídios são disseminados por ventos, insetos, ferramentas e chuva, dentre outros. Os conídios germinam, produzem o apressório e penetram no tecido hospedeiro. As hifas crescem rapidamente no meio intra e intercelular (TAVAREZ; SOUZA, 2005).

Com o largo uso de fungicidas ao longo do tempo, os fitopatógenos desenvolveram resistência a maior parte destes, o que levou a produção de fungicidas cada vez mais tóxicos. Há estudos que indicam possíveis ações carcinogênicas e teratogênicas de fungicidas para o meio ambiente e os seres humanos. Com isso, os consumidores exigem produtos livres de resíduos químicos e muitos produtos já foram retirados de mercado (FENG; ZHENG, 2007; CIA et al., 2007).

Os produtos utilizados para controle da antracnose tiveram a eficiência diminuída em função do aparecimento de microorganismos altamente tolerantes a estes produtos (TAVAREZ; SOUZA, 2005).

Visando reduzir o uso de fungicidas, têm sido realizadas diversas pesquisas para controlar fitopatógenos com produtos alternativos (FRANCO; BETTIOL, 2000; TRIPATHI; DUBEY, 2004). Os produtos naturais provenientes de plantas tendem a apresentar baixa toxicidade em animais, menos efeitos ambientais e alta aceitação pelos consumidores (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

Um método bastante atrativo para controlar doenças pós-colheita é a aplicação de óleos essenciais. Diversos estudos sugerem a utilização de óleos essenciais devido à propriedade antifúngica (REGNIER et al., 2008; SHARMA; TRIPATHI, 2008; FENG; ZHENG, 2007). Os óleos essenciais são produzidos pelas plantas como metabólitos secundários e podem apresentar propriedades anti-sépticas, antifúngicas e medicinais (BAKKALI, et al., 2008). Além disso, possuem baixo índice de toxicidade, são degradados por bactérias do solo e são mais seguros no controle de doenças em pós-colheita de frutos (ISMAN, 2000).

Segundo Feng e Zheng (2007), os óleos essenciais são um grupo de compostos naturais promissor para o desenvolvimento de agentes antifúngicos seguros, uma vez que podem apresentar ações antimicrobianas e antifúngicas, são relativamente seguros e largamente aceitos pelos consumidores.

A ação antifúngica dos óleos essenciais parece ser resultado não apenas de alguns compostos ou classes de compostos e sim da interação de todos os componentes, agindo sinergisticamente (FENG; ZHENG, 2007). Este sinergismo seria uma vantagem, pois os fitopatógenos não desenvolveriam resistência facilmente contra todos os compostos (TRIPATHI; DUBEY, 2004).

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivos: avaliar a possível atividade genotóxica e mutagênica do óleo essencial do fruto de *Schinus terebinthifolius*,s por meio de análises citológicas no Sistema *Allium cepa* e cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1); avaliar a possível atividade genotóxica do surfactante Tween 80 em *A. cepa*; estudar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *S. terebinthifolius in vitro* e *in vivo*.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as possíveis atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas de diferentes concentrações do solvente Tween 80, por meio do organismo teste *A. cepa*;
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*, por meio de análises citológicas em *A. cepa*;
- Averiguar a possível atividade mutagênica do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*, por meio do teste do micronúcleo em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) com bloqueio da citocinese;
- Investigar a potencialidade de inibição do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* sobre o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*;
- Investigar se a aplicação do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* com biofilme retarda a senescência do mamão, aumentando a sua vida de prateleira.

5 CAPÍTULO 1 – ESTUDO GENOTÓXICO DO SURFACTANTE TWEEN 80, POR MEIO DO TESTE DE *Allium cepa*.

RESUMO

O surfactante Tween 80 é utilizado para promover a solubilização de substâncias hidrofóbicas em água. É comumente utilizado como aditivo alimentar e em preparações farmacológicas e cosméticas. É bastante utilizado em testes de genotoxicidade, com diversos sistemas teste, para diluir as substâncias hidrofóbicas a serem investigadas. Neste trabalho, foi avaliado o possível efeito genotóxico desta substância, utilizando o teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*. Foram realizados os tratamentos temporários, no qual as sementes, germinadas em água ultra-pura, permaneceram por 24 h (tratamento agudo) e 72 h (tratamento crônico), nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8% de Tween 80. O controle positivo foi realizado em metil metano sulfonato (4×10^{-4} M) e o controle negativo em água ultra-pura. As raízes foram fixadas em Carnoy e coradas pelo método de Feulgen. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento suave e aproximadamente 5000 células foram analisadas para cada concentração e para os controles. Não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes concentrações e o controle negativo, em relação ao índice mitótico, índice de aberrações e índice de mutagenicidade, o que revela ausência de efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico do Tween 80. Desta forma, o Tween 80 pode ser utilizado em testes de genotoxicidade, em tratamentos temporários, utilizando o organismo teste *A. cepa*, já que o surfactante não interferiu no material genético do mesmo.

Palavras-chave: Tween 80, genotoxicidade, *Allium cepa*.

ABSTRACT

The surfactant Tween 80 is utilized to promote hydrophobic substances solubilization in water. It is commonly used as food additive and in pharmaceutical and cosmetic preparations. It is widely utilized in genotoxicity tests in various test systems to dilute hydrophobic substances that are being investigated. In this work, the possible genotoxic effect of Tween 80 was evaluated by chromosomal aberration test in *Allium cepa*. Temporary treatments have been performed, in which the seeds germinated in ultrapure water stayed for 24 h (acute treatment) and 72 h (chronic treatment) in the concentrations of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8% of Tween 80. The positive control was performed with methyl methane sulfonate (4×10^{-4} M) and the negative control with ultrapure water. The roots were fixed in Carnoy and colored using Feulgen method. The slides were prepared by the common method of gentle squashing and approximately 5000 cells to each concentration and to controls were analyzed. The mitotic index, chromosomal aberration index and mutagenicity index did not differ statistically from the negative controls, disclosing absence of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of Tween 80. Therefore, Tween 80 can be used in genotoxic tests, in temporary treatments, using the *A. cepa* as test organism, since the surfactant did not intervened with *A. cepa* genetic material.

Keywords: Tween 80, genotoxicity, *Allium cepa*.

5.1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são produtos capazes de promover a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água. Podem ser utilizados em cosméticos (MORENO, 2000) e pela indústria farmacêutica (HU et al., 2003). O Tween 80 ou polisorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) é um surfactante não-iônico utilizado para emulsificar óleo em água (FENG et al., 2006). É bastante conhecido e disponível comercialmente (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992).

O Tween 80 é comumente utilizado como aditivo alimentar nos Estados Unidos. Quando ingerido é degradado em gorduras e absorvido no jejuno (WOOD; KATZBERG, 1978). Também é utilizado no preparo de rações para animais, sendo reconhecidamente seguro. Para ruminantes é indicada a sua utilização já que ele aumenta potencialmente a atividade da protease e a degradação da celulose, aumentando a utilização do alimento, o que aumenta o desempenho do animal (KAMANDE et al., 2000).

Wood e Katzberg (1978) sugeriram o uso de Tween 80 a 1-2% juntamente com ditrizoato de sódio para o tratamento de obstrução fecal por mecônio e compactação fecal em bebês e crianças, já que estas soluções mostraram-se eficientes nos estudos de caso realizados.

Segundo Jin et al. (2007) os surfactantes, como o Tween 80, são utilizados em sedimentos contaminados para liberar os contaminantes para a água e esta, então, passar por tratamentos físicos e biológicos.

O Tween 80 é utilizado em ensaios para avaliação da antimutagenicidade de substâncias hidrofóbicas como nos testes de Ames e *Drosophila* "wing spot" (KAREKAR; JOSHI; SHINDE, 2000) e para avaliação de genotoxicidade, como no teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos Wistar (FONSECA, 2008).

Devido à utilização do Tween 80 como aditivo alimentar e em preparações farmacológicas e cosméticas, faz-se necessária a realização de testes para avaliar sua inocuidade.

Os testes genotóxicos alertam sobre riscos potenciais como o câncer e desordens genéticas (RUIZ et al., 1996). O teste genotóxico que utiliza o *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

O ensaio de genotoxicidade pelo teste de *Allium cepa* foi introduzido por Levan em 1938 e posteriormente foi proposto como um método padrão para testar químicos (RANK; NIELSEN, 1993). A região meristemática das raízes é utilizada em estudos clastogênicos desde o início da década de 30, e a frequência de aberrações cromossômicas desde antes da década de 80 (MA et al., 1995).

Ma et al. (1995) defendem que a contagem dos micronúcleos deveria ser feita na região F1 da raiz e não apenas na região meristemática, como é realizado comumente. Os autores compararam a contagem da região meristemática com a contagem da região F1 de raízes de *A. cepa* tratadas com formaldeído, mitomicina C e hidrazido maleico e encontraram uma maior freqüência de micronúcleos na região F1, o que indicou uma maior sensibilidade aos danos mutagênicos nesta região.

Considera-se o *A. cepa* como um eficiente organismo teste de citotoxicidade e genotoxicidade devido à cinética de proliferação, ao crescimento rápido das raízes, ao grande número de células em divisão, à alta tolerância a diferentes condições de cultivo, à disponibilidade durante todo o ano, ao fácil manuseio e ao fato de possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (HOSHINA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006).

Diversos estudos utilizando *A. cepa* como organismo teste relataram a avaliação mutagênica de agentes químicos ambientais, como os pesticidas. Estudos descrevem a indução de aberrações cromossômicas em células de *A. cepa* tratadas com os herbicidas pentaclorofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e butaclor (ATEEQ et al., 2002), bem como trifluralina (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007) e o inseticida fipronil (PEDRO, 2008).

O ensaio de *A. cepa* também é utilizado em estudos de monitoramento ambiental. Alguns autores descrevem a indução de aberrações cromossômicas em células de *A. cepa* tratadas com águas de rios (AMARAL et al., 2007), solos (WHITE; CLAXTON, 2004) e efluentes industriais (GROVER; SATWINDERJEET, 1999).

No presente estudo foi avaliado o possível efeito genotóxico do surfactante Tween 80, nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8%, por meio do teste de aberrações cromossômicas e micronúcleos em *A. cepa*, nas regiões meristemática e F1.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram preparadas soluções de Tween 80 diluídas a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8% em água ultra-pura. Foram utilizadas sementes de *A. cepa*, variedade Baia Periforme, em virtude da disponibilidade na mesma variedade agrônômica ao longo do ano, o que

garante uma maior confiança para os resultados, segundo Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007).

Foi realizado o tratamento temporário (TT), no qual as sementes foram germinadas primeiramente em água ultra-pura até que as raízes atingissem aproximadamente 1 cm de comprimento. Posteriormente, foram transferidas para as diferentes concentrações de Tween 80 a serem avaliadas e para os controles. Como controle negativo foi utilizado água ultra-pura e como controle positivo metil metano sulfonato (MMS) na concentração de 4×10^{-4} M. Após 24 h (tratamento agudo) foram coletadas algumas sementes. As sementes restantes foram coletadas após 72 h (tratamento crônico). As raízes coletadas foram fixadas em Carnoy, etanol/ácido acético (3:1), por 24 h.

As raízes foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C por 7 minutos e lavadas em água destilada. A coloração foi realizada de acordo com a metodologia convencional de Feulgen, na qual as raízes foram acondicionadas em reativo de Schiff por duas horas em local escuro.

Foram isolados o meristema e a região F1 das raízes, recobertos com lamínula e esmagados com uma gota de carmim acético 1%. Para o preparo das lâminas permanentes as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com Bálsamo do Canadá. Foram confeccionadas cinco lâminas para cada amostra de cada tratamento. Foram analisadas, em microscópio de luz, aproximadamente 1000 células de cada região (meristemática e F1) em cada lâmina.

Em relação à região meristemática foram calculados o índice mitótico, o índice de aberrações e o índice de mutagenicidade.

O índice mitótico foi calculado por meio da relação entre o número de células em divisão e o total de células analisadas:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de aberrações cromossômicas foi obtido por meio da frequência de células portadoras de alterações cromossômicas no ciclo celular: células binucleadas, C-metáfase, micronúcleo, microcito, brotamento, quebra, perda, aderência cromossômica, anáfases mutipolares bem como pontes e atrasos na anáfase e na

telófase. O índice de aberrações cromossômicas foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de aberrações} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da frequência de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas. O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo e quebra}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Em relação à região F1 foi calculado o índice de mutagenicidade:

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Após a obtenção dos resultados foi realizada a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), por meio do programa BioEstat 4.0.

5.3 RESULTADOS

O decréscimo do índice mitótico é uma forma confiável de determinar a presença de substâncias citotóxicas (SMAKA-KINCL et al., 1996). Já um aumento do índice mitótico indica que houve uma indução da divisão celular, a qual pode ser considerada prejudicial às células, uma vez que pode levar ao aparecimento de tumorização nos seres vivos (HOSHINA, 2002).

Em relação ao índice mitótico, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações avaliadas de Tween 80 e o controle negativo em ambos os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas e índice de mutagenicidade obtidos dos tratamentos temporários agudo (24 h) e crônico (72 h), das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações de Tween 80.

	Índice mitótico		Índice de aberrações		Índice de mutagenicidade	
	TT 24 h	TT 72 h	TT 24 h	TT 72 h	TT 24 h	TT 72 h
CN	4,92 ± 0,44	4,77 ± 0,34	0,40 ± 0,11	0,41 ± 0,12	0,06 ± 0,06	0,02 ± 0,05
CP	1,47* ± 0,15	1,05* ± 0,93	1,04* ± 0,36	1,03* ± 0,34	0,63* ± 0,39	0,70* ± 0,15
1%	5,59 ± 1,32	4,14 ± 1,17	0,67 ± 0,23	0,55 ± 0,24	0,07 ± 0,08	0,04 ± 0,06
2%	4,25 ± 0,38	4,38 ± 0,58	0,62 ± 0,24	0,64 ± 0,18	0,11 ± 0,08	0,06 ± 0,06
3%	4,79 ± 1,07	3,85 ± 1,32	0,56 ± 0,23	0,38 ± 0,05	0,18 ± 0,16	0,17 ± 0,07
4%	4,59 ± 1,07	3,90 ± 0,95	0,55 ± 0,22	0,49 ± 0,21	0,13 ± 0,11	0,11 ± 0,17
5%	4,86 ± 1,01	4,67 ± 0,56	0,56 ± 0,10	0,32 ± 0,16	0,19 ± 0,21	0,06 ± 0,09
6%	4,43 ± 0,75	4,93 ± 0,92	0,45 ± 0,22	0,45 ± 0,19	0,04 ± 0,06	0,06 ± 0,05
7%	4,89 ± 0,29	4,72 ± 0,81	0,45 ± 0,29	0,33 ± 0,15	0,04 ± 0,06	0,02 ± 0,04
8%	4,94 ± 0,17	4,87 ± 0,83	0,34 ± 0,13	0,44 ± 0,07	0,02 ± 0,05	0,06 ± 0,05

* Diferença significativa em relação ao controle negativo água ultra-pura a 1% pelo teste de Kruskal-Wallis.
 TT – Tratamento temporário, CN – Controle negativo e CP – Controle positivo.

A análise de aberrações cromossômicas registrou a presença de baixa frequência de células com anormalidades cromossômicas na região meristemática de *A. cepa* tratada com Tween 80.

Os resultados do índice de aberrações indicaram que as concentrações de Tween 80 não diferiram significativamente do controle negativo, revelando ausência de genotoxicidade do surfactante nas células meristemáticas de *A. cepa* (Tabela 1).

Para a análise do índice de mutagenicidade, o qual corresponde a aberrações que não são passíveis de um mecanismo de reparo, não houve diferenças significativas entre as concentrações de Tween 80 e o controle negativo em ambos os tratamentos de 24 e 72 h (Tabela 1).

Em relação à análise das células da região F1 da raiz de *A. cepa* não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de Tween 80 e o controle negativo, demonstrando ausência de efeito mutagênico, tanto no tratamento agudo quanto no crônico (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice de mutagenicidade (IM) obtido dos tratamentos temporários agudo (24 h) e crônico (72 h), das células F1 de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações de Tween 80.

	IM F1	
	TT 24 h	TT 72 h
CN	0,08 ± 0,08	0,12 ± 0,08
CP	0,52* ± 0,11	0,48* ± 0,13
1%	0,14 ± 0,11	0,08 ± 0,08
2%	0,08 ± 0,11	0,08 ± 0,04
3%	0,20 ± 0,12	0,04 ± 0,09
4%	0,12 ± 0,13	0,08 ± 0,08
5%	0,18 ± 0,08	0,08 ± 0,04
6%	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,04
7%	0,14 ± 0,11	0,14 ± 0,11
8%	0,10 ± 0,12	0,10 ± 0,10

* Diferença significativa em relação ao controle negativo água ultra-pura a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

CN – Controle negativo e CP – Controle positivo.

5.4 DISCUSSÃO

Em relação ao índice mitótico, não houve diferenças significativas entre as concentrações de Tween 80 e o controle negativo, bem como, não foram observadas células em morte celular. Assim, o surfactante em contato com as raízes de *A. cepa*, por até 72h, não teve efeito citotóxico.

De acordo com Santos et al. (2004) o surfactante Tween 80 a 1% tem efeito de inibição do crescimento de radículas de plântulas de alface, com redução de comprimento da raiz e do hipocótilo. Entretanto, não alterou o índice de velocidade de germinação e a percentagem de germinação.

Segundo Liu, Jiang e Li (1992), a inibição do crescimento da raiz é resultado da inibição da divisão celular, o que leva à diminuição do índice mitótico. Como não encontramos inibição do índice mitótico em *A. cepa*, podemos sugerir que a ausência de inibição pode estar relacionada às raízes já estarem em crescimento quando expostas ao Tween 80 e ao tempo de até 72 h não ter sido suficiente para gerar inibição.

Moreno (2000) estudou o índice de irritação de surfactantes, por meio dos testes de liberação de ácido aracdônico (mediador antiinflamatório) e do vermelho neutro, na cultura de fibroblastos 3T6 *in vitro*. O autor observou que Tween 80 foi o menos irritante e citotóxico dentre quatro surfactantes testados. Os surfactantes cloreto de benzalconio e dodecilsulfato de sódio foram os mais irritantes e citotóxicos, e foram seguidos pelo cocoamidopropilbetaino.

As análises das freqüências de aberrações cromossômicas e mutagenicidade das células de *A. cepa* tratadas com o surfactante Tween 80 revelaram que não houve atividades genotóxicas e mutagênicas significativas, tanto para a região meristemática quanto para a região F1 (células diferenciadas), nos tratamentos agudo e crônico.

Segundo Ma et al. (1995), a região F1 da raiz é mais sensível a danos mutagênicos. Entretanto, segundo Osipov e Kolomiitseva (1996), as células diferenciadas são menos sensíveis que as células pouco diferenciadas ou com alta taxa reprodutiva, porque apresentam baixa taxa mitótica.

Os resultados de ausência de genotoxicidade do presente trabalho são concordantes com os apresentados pela Universidade da Califórnia (2008), no 'The Carcinogenic Potency Project', no qual é descrita a ausência de carcinogenicidade do Tween 80. De acordo com o projeto, os testes realizados com Tween 80, em camundongos e ratos, não foram positivos para carcinogenicidade.

Fonseca (2008) estudando a possível atividade genotóxica do óleo essencial de *Citrus aurantium*, utilizou Tween 80 a 8% para diluição do óleo e também como controle negativo. O autor realizou o teste do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico de ratos Wistar e o ensaio do cometa em células da mucosa gástrica de ratos Wistar e não observou efeito genotóxico, nem nas soluções de óleo de 125, 250 e 500 mg/kg, nem no controle negativo Tween 80 a 8%.

Barwicz, Christian e Gruda (1992) afirmam que o surfactante Tween 80 nas concentrações de 10 e 20% não apresenta efeito tóxico em ratos, pois os autores observaram que houve 100% de sobrevivência dos ratos em que foram injetados tal surfactante. Schick (1966, apud BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992) afirma que o Tween 80 apresenta uma toxicidade intravenosa relativamente baixa.

O Tween 80, nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5%, também se apresentou atóxico em um ensaio feito com *Artemia salina*, um crustáceo utilizado como indicador de toxicidade de substâncias químicas. Dentre os solventes testados o Tween 80 e a água foram os únicos solventes atóxicos, tendo apresentado 100% de sobrevivência nas concentrações testadas (LOPES et al., 2002). Já Daher, Baroody e Howland (2003), encontraram aparente efeito tóxico e irritante no sistema gastrointestinal de ratos tratados com uma solução de Tween 80 a 10%. Entretanto para os tratados com 1% não houve toxicidade.

5.5 CONCLUSÕES

A ausência de citotoxicidade e genotoxicidade do Tween 80, nas concentrações de 1 a 8%, no teste de aberrações cromossômicas em *A. cepa* sugere que este surfactante seja utilizado, em testes de genotoxicidade temporários, para dissolver substâncias

hidrofóbicas que estejam sendo investigadas. Entretanto, é sugerido que sejam realizados outros tipos de testes toxicológicos para comprovar a inocuidade deste surfactante para outros tipos de utilização.

5.6 REFERÊNCIAS

AMARAL, A. de M.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L.; BARBÉRIO, A. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n. 1 e 2, p. 65-72, 2007.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105–113, 2002.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the Aggregation State of Amphotericin B on Its Toxicity to Mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 36, n. 10 p. 2310-2315, 1992.

DAHER, C. F.; BAROODY, G. M.; HOWLAND, R. J. Effect of a surfactant, Tween 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 575–582, 2003.

FENG, J.; ZENG, Y.; MA, C.; CAI, X.; ZHANG, Q.; TONG, M.; YU, B.; XU, P. The Surfactant Tween 80 Enhances Biodesulfurization. **Applied and environmental microbiology**, p. 7390–7393, 2006.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FONSECA, V. B. **Avaliação do potencial toxicogénico e quimioprotetor do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L. in vivo.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GROVER, I. S.; SATWINDERJEET, K. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p.183–188, 1999.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à Bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São Paulo, 2002.

HU, M.; NICULESCU, M.; ZHANG, X. M.; HUI, A. High-performance liquid chromatographic determination of polysorbate 80 in pharmaceutical suspensions. **Journal of Chromatography**. v. 984, n. 2, p. 233-236, 2003.

JIN, D.; JIANG, X.; JING, X.; OU, Z. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, p. 215–221, 2007.

KAMANDE, G. M.; BAAH, J.; CHENG, K. J.; MCALLISTER, T. A.; SHELFORD, J. A. Effects of Tween 60 and Tween 80 on Protease Activity, Thiol Group Reactivity, Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.536–542, 2000.

KAREKAR, V.; JOSHI, S.; SHINDE, S. L. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test. **Mutation Research**, v. 468, p. 183–194, 2000.

LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 117, p. 23-20, 1992.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2002.

MA, T-H. ; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185–195, 1995.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. T.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MORENO, J. J. Arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis as irritant index of surfactants in 3T6 fibroblast cultures. **Toxicology**, v. 143, p. 275–282, 2000.

OSIPOV, A. N.; KOLOMIITSEVA, G. Post-radiation changes of DNA-protein crosslinks and single-stranded DNA breaks in cells of various organs in gamma-irradiated rats. **Biokhimiia**, v. 61, p. 927 – 931, 1996.

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

RUIZ, A. R.; DE LA TORRE R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52, p. 123-127, 1996.

SANTOS, C. C. dos; OLIVEIRA, D. F. de; ALVES, L. W. R.; SOUZA, I. F. de; FURTADO, D. A. S. Efeito de extratos orgânicos, associados ao surfactante Tween 80, na germinação e crescimento de plântula de alface. **Ciência e agrotecnologia**, v. 28, n. 2, p. 296-299, 2004.

SMACKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research** v. 368, p. 171-179, 1996.

UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA. **The Carcinogenic Potency Project**. Disponível em: <<http://potency.berkeley.edu/chempages/POLYSORBATE%2080.html>>. Acesso em: 2 set. 2008.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation research**, v. 567, p. 227-345, 2004.

WOOD, B. P.; KATZBERG, R. W. Tween 80/Diatrizoate Enemas in Bowel Obstruction. **American Journal of Roentgenology**. v. 130, p. 747-750, 1978.

6 CAPÍTULO 2 – ESTUDO GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO ÓLEO DE *Schinus terebinthifolius*, POR MEIO DE CÉLULAS DE *Allium cepa* E DE CHO-K1 COM BLOQUEIO DA CITOCINESE.

RESUMO

Schinus terebinthifolius, conhecida popularmente como aroeira, é uma planta utilizada na medicina popular e como condimento alimentar. No presente estudo, foi avaliado o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius* por meio do teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* e do teste do micronúcleo em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) com bloqueio da citocinese. As diluições do óleo foram feitas no surfactante Tween 80 a 8% em concentrações de 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 e 2,39%. Foram realizados com *A. cepa* os tratamentos temporários agudo (24 h) e crônico (72 h), avaliando-se as regiões meristemática e F1 das raízes. Não foram observadas diferenças significativas, em relação ao índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas e índice de mutagenicidade, entre as concentrações avaliadas e os controles negativo e solvente. No ensaio em cultura de células CHO-K1 foi realizado o tratamento por 3 h e posterior incubação com citocalasina por 18h. Foi calculada a frequência das células binucleadas micronucleadas pelo total de células binucleadas. Também não foram encontradas diferenças significativas, em relação ao índice de mutagenicidade, entre as concentrações estudadas e os controles negativo e solvente. Desta forma, há ausência de genotoxicidade e mutagenicidade do óleo essencial em ambos os sistemas teste. Portanto, a utilização tópica ou o consumo deste óleo são seguros, quanto à genotoxicidade, nas concentrações estudadas.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, genotoxicidade, mutagenicidade, *Allium cepa*, CHO-K1.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius is popularly known as Brazilian peppertree and is a plant used in the popular medicine and as condiment feeds. In the present study, the genotoxic and mutagenic potentials of the essential oil extracted from the *S. terebinthifolius* fruit was evaluated through the chromosomic aberrations test in *Allium cepa* and the micronucleus test in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) with cytokinesis block. The oil dilutions was made with the surfactant Tween 80 8% in the concentrations of 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 and 2.39%. In the *A. cepa* assay acute (24h) and chronic (72h) temporary treatments were performed, in the meristematic and F1 regions of the roots. With regard to the mitotic index, chromosomic aberrations index and mutagenic index significant differences were not observed between the essential oil concentrations and the negative and solvent controls. In the CHO-K1 cells assay, the treatment for 3 h and posterior incubation with cytochalasin for 18 h was done. The frequency of the binucleated cells with micronucleus by the total of binucleated cells was calculated. In the mutagenic index, significant differences between the essential oil concentrations and the negative and solvent controls were not found. In such a way, it has absence of genotoxicity and mutagenicity of the essential oil in both test systems. Therefore, the topical use or the consumption of this oil is safe, with regard to the genotoxicity, in the studied concentrations.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, genotoxicity, mutagenicity, *Allium cepa*, CHO-K1.

6.1 INTRODUÇÃO

O óleo essencial da planta *Schinus terebinthifolius*, conhecida popularmente como aroeira, pode ser utilizado para tratar infecções por cândida, problemas respiratórios e micoses (LIMA et al., 2006). Os frutos são utilizados como condimento alimentar tanto no mercado nacional quanto internacional (LENZI; ORTH, 2004).

O óleo essencial extraído do fruto desta planta corresponde de 5,50 a 8,41% do peso seco do fruto e apresenta atividades larvicida, inseticida e repelente contra o *Aedes aegypti*, vetor do agente etiológico causador da dengue. A concentração mais eficaz com ação repelente foi a de 2,39% (COLE, 2008).

Para alertar sobre riscos potenciais como o câncer e desordens genéticas existem diversos testes que avaliam a genotoxicidade de medicamentos, assim como de plantas utilizadas na medicina popular. Entretanto, as informações, se disponíveis, são dispersas e escassas (RUIZ et al., 1996).

O ensaio de genotoxicidade pelo teste de *Allium cepa* foi introduzido por Levan em 1938 e posteriormente foi proposto como um método padrão para testar produtos químicos (RANK; NIELSEN, 1993). A região meristemática das raízes é utilizada em estudos clastogênicos desde o início da década de 30 e a frequência de aberrações cromossômicas desde antes da década de 80 (MA et al., 1995). O teste genotóxico que utiliza o *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

De acordo com Kovalchuk et al. (1998) os fragmentos cromossômicos são resultantes de quebras no cromossomo e na cromátide, a C-mitose é resultante de distúrbio no fuso, compreendendo C-mitose completa (sem fuso) e anáfase multipolar (fuso parcialmente interrompido) e a aderência cromossômica consiste em cromossomos com superfície com aderência.

O micronúcleo é um tipo de cromatina que pode surgir tanto da disjunção anômala dos cromossomos, devido a anormalidades do fuso, quanto pela quebra de cromossomos. Ele é formado pelo desenvolvimento de um novo envoltório de sistema de membrana ao redor da cromatina que não se moveu para os pólos durante a anáfase (GROVER; SATWINDERJEET, 1999).

Ma et al. (1995) defendem que, como os micronúcleos são revelados apenas na geração subsequente de células, em prófase ou interfase, a contagem dos micronúcleos deveria ser feita na região F1 da raiz e não apenas na região meristemática, como é realizado comumente.

Outro tipo de teste bastante utilizado é o teste do micronúcleo *in vitro*, o qual é bastante útil para avaliar os danos mutagênicos, em virtude da simplicidade de

contagem, da facilidade de ser realizado e da grande aplicabilidade em diversos tipos celulares (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; MARZIN, 1997).

As linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO) apresentam as vantagens de possuir um número cromossômico relativamente pequeno (20-22 cromossomos) e não precisar de estimulação mitótica para o crescimento, já que a maioria das células está em divisão (AARDEMA et al., 2006). Segundo Rabello-Gay et al. (1991, apud LIMA, 2007), estas células também apresentam as vantagens de: facilidade de padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura e densidade populacional); uniformidade metabólica e comportamental, o que possibilita os tratamentos serem realizados em várias fases do ciclo celular; rapidez; economia; boa reprodutividade e a organização dos cromossômica ser igual às células *in vivo*.

Diaz et al. (2007) avaliaram 8 compostos aneugênicos, 25 clastogênicos e 13 não genotóxicos por meio do teste do micronúcleo em células de CHO-K1 e a maior parte dos compostos genotóxicos apresentou maior quantidade de células micronucleadas com o aumento da concentração. Esse estudo revela a compatibilidade de células CHO-K1 para detectar substâncias genotóxicas por meio do teste *in vitro* do micronúcleo.

No presente trabalho, foi avaliado o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial presente no fruto de *S. terebinthifolius* por meio do teste de aberrações cromossômicas e micronúcleos em *A. cepa* (nas regiões meristemática e F1) e do teste do micronúcleo em células de (CHO-K1) com bloqueio da citocinese.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Caracterização do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*.

O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*, utilizado no presente experimento, foi cedido pelo prof. Reginaldo Bezerra dos Santos do Departamento de Química da UFES, sendo extraído, por meio de hidrodestilação, de acordo com o método

empregado pela AOAC (1995), como relatado por Cole (2008). Os frutos maduros, devidamente identificados botanicamente, foram colhidos na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). As exsiccatas foram depositadas no herbário da instituição: registro VIES 14711. Cole (2008) também identificou os compostos existentes neste óleo essencial, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, e observou predominância de terpenos. Os mais abundantes foram os monoterpenos (85,1%), sendo os mais abundantes δ -3-careno (30,37%), limoneno (14,44%), α -felandreno (12,60%), α -pineno (12,59%), mirceno (5,82%), e o-cimeno (3,46%); seguido pelos sesquiterpenos (5,34%): *trans*-cariofileno, γ -muuruleno, *E,E*- α -farneseno, δ -cadineno e epi- α -cadinol.

6.2.2 Avaliação genotóxica por meio de *Allium cepa*.

Foram preparadas soluções diluídas a 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 e 2,39% do óleo essencial de *S. terebinthifolius* em Tween 80 a 8% em água ultra-pura. A concentração 2,39% foi a relatada por Cole (2008) como sendo a menor concentração do óleo com efeito repelente em *Aedes aegypti*. Para os testes de aberrações cromossômicas foram utilizadas sementes de *A. cepa*, variedade Baia Periforme, pela sua disponibilidade ao longo do ano que, segundo Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007), garante uma maior confiança para os resultados.

Foram utilizados como controle negativo água ultra-pura e como controle positivo metil metano sulfonato na concentração de 4×10^{-4} M. Também foi realizado o controle com o solvente (CS) utilizado na diluição do óleo essencial (Tween 80 a 8%).

Foi realizado o tratamento temporário (TT), no qual as sementes foram germinadas primeiramente em água ultra-pura até as raízes atingirem aproximadamente 1 cm de comprimento. Posteriormente, foram transferidas para as diferentes concentrações do óleo essencial a serem avaliadas e para os controles. Após 24 horas (tratamento agudo) foram coletadas algumas sementes. As sementes restantes foram coletadas após 72 horas (tratamento crônico). As raízes coletadas foram fixadas em Carnoy, etanol/ácido acético (3:1), por 24 horas.

As raízes foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C por 7 minutos e lavadas em água destilada. A coloração foi realizada de acordo com a metodologia convencional de Feulgen, na qual as raízes foram acondicionadas em reativo de Schiff, por duas horas em local escuro.

Foram isolados o meristema e a região F1 das raízes, recobertos com lamínula e esmagados com uma gota de carmim acético 1%. Para o preparo das lâminas permanentes as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com Bálsamo do Canadá. Foram confeccionadas cinco lâminas para cada amostra de cada tratamento. Foram analisadas, em microscópio de luz, aproximadamente 1000 células de cada região em cada lâmina.

Em relação à região meristemática foram calculados o índice mitótico, o índice de aberrações cromossômicas e o índice de mutagenicidade.

O índice mitótico foi calculado por meio da relação entre o número de células em divisão e o total de células analisadas:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de aberrações cromossômicas foi obtido por meio da frequência de células portadoras de alterações cromossômicas no ciclo celular: células binucleadas, C-metáfase, micronúcleo, microcito, brotamento, quebra, perda, aderência cromossômica, anáfases mutipolares bem como pontes e atrasos na anáfase e na telófase. O índice de aberrações cromossômicas foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de aberrações} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da frequência de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas. O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo e quebra}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Em relação à região F1 foi calculado apenas o índice de mutagenicidade:

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

6.2.3 Avaliação mutagênica por meio de células de CHO-K1 com bloqueio da citocinese.

As células de CHO-K1 utilizadas foram fornecidas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) em maio de 2008. As células foram crescidas em estufa BOD a 37°C em frascos de cultura de tecidos (25 cm²) contendo meio Ham's F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica. Nessas condições o ciclo celular foi de 12 h.

Após 24h de estabilização em cultura, foi descartado o meio e os frascos lavados duas vezes com PBS. Foram adicionados 5 mL do meio contendo 50 µL de cada tratamento. Cada tratamento foi realizado em triplicatas. Os tratamentos consistiram nas concentrações de 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 e 2,39% do óleo do fruto de *S. terebinthifolius*, diluídas em Tween 80 a 8%. Foram desenvolvidos testes controles, positivo em metil metano sulfonato (MMS) a 4×10^{-4} M, negativo em PBS e controle com o solvente Tween 80 a 8%. Então, as células foram incubadas por 3 h.

Após o tempo, foi descartado o meio e os frascos lavados duas vezes com PBS. Foram adicionados 5 mL do meio contendo citocalasina B (3 µL/mL) e a cultura de células foi incubada por 18 h. Decorrido o tempo, as células foram colhidas. O meio de cultura foi reservado em tubo de centrifuga e os fracos lavados 2 vezes com PBS. As células foram desprendidas com tripsina (0,025%), a qual, em seguida foi inativada com o meio reservado. Adicionou-se uma gota de formol (40%) e centrifugou-se a 1250 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1,5 mL de citrato de sódio (1%). O pellet de células foi homogenizado e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 5 mL de fixador metanol/ácido acético (3:1) e novamente homogenizou-se e centrifugou-se.

O fixador foi retirado até a obtenção da diluição celular desejada. O pellet de células foi ressuspensão e as lâminas preparadas. A suspensão de células foi gotejada nas lâminas limpas e geladas a 4°C. As lâminas foram coradas com Giemsa (5%).

Foram confeccionadas cinco lâminas para cada amostra, e analisadas, em microscópio de luz, aproximadamente 500 células binucleadas em cada lâmina.

O índice de mutagenicidade foi verificado pela freqüência de células binucleadas com micronúcleos pelo número de células binucleadas analisadas:

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células binucleadas com micronúcleo}}{\text{n}^\circ \text{ total de células binucleadas analisadas}} \times 100$$

As análises estatísticas dos dois ensaios (*A. cepa* e CHO-K1) foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), por meio do programa BioEstat 4.0.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Avaliação genotóxica por meio de *Allium cepa*.

Segundo Gadano et al. (2002) o índice mitótico pode ser utilizado como um indicador da correta prolifração das células. Um decréscimo no índice mitótico é indicador de citotoxicidade da substância, já um aumento indica indução da divisão celular, que pode levar ao aparecimento de tumorização nos seres vivos (SMAKA-KINCL et al., 1996; HOSHINA, 2002).

Não foram observadas diferenças significativas, em relação ao índice mitótico, entre as diferentes concentrações do óleo essencial avaliadas e os controles negativo e solvente (Tabela 1). Os dados sugerem que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* não interferiu no índice de divisão celular mitótica de *A. cepa*, não apresentando efeito citotóxico.

Tabela 1 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas e índice de mutagenicidade obtidos dos tratamentos temporários (TT) agudo (24 h) e crônico (72 h), das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius*.

	Índice mitótico		Índice de aberrações		Índice de mutagenicidade	
	TT 24 h	TT 72 h	TT 24 h	TT 72 h	TT 24 h	TT 72 h
CN	4,40 ± 0,86	4,82 ± 0,67	0,67 ± 0,29	0,77 ± 0,34	0,33 ± 0,28	0,38 ± 0,22
CS	4,40 ± 0,66	4,22 ± 0,29	0,73 ± 0,29	0,69 ± 0,22	0,35 ± 0,28	0,30 ± 0,19
CP	1,86 [#] ± 0,81	0,90* ± 0,76	1,83* [#] ± 0,16	1,71* [#] ± 0,47	1,50* [#] ± 0,32	1,49* [#] ± 0,52
0,05%	4,64 ± 0,73	4,80 ± 1,15	0,78 ± 0,43	0,73 ± 0,30	0,16 ± 0,19	0,54 ± 0,32
0,10%	3,77 ± 0,75	5,04 ± 0,53	0,80 ± 0,21	1,10 ± 0,64	0,39 ± 0,30	0,56 ± 0,68
0,50%	4,20 ± 0,97	5,22 ± 1,29	0,75 ± 0,38	0,74 ± 0,13	0,34 ± 0,24	0,34 ± 0,13
1,00%	4,03 ± 0,37	3,82 ± 0,62	0,49 ± 0,07	0,60 ± 0,21	0,26 ± 0,09	0,29 ± 0,11
2,39%	5,01 ± 0,96	4,21 ± 0,94	0,45 ± 0,11	0,47 ± 0,17	0,29 ± 0,34	0,17 ± 0,20

* Diferença significativa em relação ao controle negativo a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Diferença significativa em relação ao controle solvente a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

CN – Controle negativo, CS – Controle solvente e CP – Controle positivo.

Foram quantificadas as alterações cromossômicas durante a divisão celular. Embora as células tratadas com óleo essencial tenham apresentado algumas aberrações cromossômicas, as diferenças entre o índice de aberrações das concentrações de óleo não foram significativamente diferentes dos controles negativo e solvente (Tabela 1). Portanto, podemos inferir que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* não induziu alta taxa de aberrações cromossômicas em *A. cepa*, não demonstrando, assim, efeito genotóxico.

As análises do índice de mutagenicidade revelaram que as concentrações do óleo avaliadas não diferiram estatisticamente dos controles negativo e solvente (Tabela 1). Para todas as concentrações avaliadas foram observadas baixas taxas de células portadoras de micronúcleos.

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações e os controles negativo e solvente nas células que já passaram pelo processo de diferenciação (Tabela 2). Desta forma, podemos sugerir a ausência de efeito mutagênico também nas células já diferenciadas.

Tabela 2 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice de mutagenicidade (IM) obtido dos tratamentos temporários agudo (24 h) e crônico (72 h), das células da região F1 de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius*.

	IM F1	
	TT 24 h	TT 72 h
CN	0,08 ± 0,08	0,06 ± 0,05
CS	0,04 ± 0,09	0,08 ± 0,08
CP	0,54 ± 0,34	0,60 ± 0,24
0,05%	0,02 ± 0,04	0,06 ± 0,05
0,10%	0,14 ± 0,05	0,08 ± 0,08
0,50%	0,10 ± 0,10	0,12 ± 0,11
1,00%	0,18 ± 0,08	0,08 ± 0,08
2,39%	0,08 ± 0,08	0,10 ± 0,07

* Diferença significativa em relação ao controle negativo a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Diferença significativa em relação ao controle solvente a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

CN – Controle negativo, CS – Controle solvente e CP – Controle positivo.

Os controles água ultra-pura (CN) e Tween 80 a 8% (CS) não diferiram estatisticamente entre si em todos os tratamentos realizados. Assim, o surfactante Tween 80 a 8% não gerou aberrações cromossômicas no organismo teste *A. cepa*.

6.3.2 Avaliação mutagênica por meio de células de CHO-K1 com bloqueio da citocinese.

Nas análises das células CHO-K1 foram observadas células binucleadas, células binucleadas com micronúcleo e células mononucleadas. O índice de mutagenicidade foi calculado pela freqüência de células binucleadas com micronúcleo pelo número de células binucleadas analisado.

Nas células de CHO-K1, para todas as concentrações do óleo essencial de *S. terebinthifolius*, foram registradas baixa freqüência de células binucleadas com micronúcleo. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações e os controles negativo e solvente (Tabela 3). Os dados sugerem a ausência de efeito mutagênico do óleo essencial em células de CHO-K1.

Tabela 3 – Valores médios (%) e desvios padrões do índice de mutagenicidade (IM) das células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com bloqueio da citocinese, submetidas a diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius*.

	IM
CN	3,05 ± 0,41
CS	2,29 ± 0,80
CP	9,64* [#] ± 2,64
0,05%	2,67 ± 0,72
0,10%	3,54 ± 1,43
0,50%	2,29 ± 0,56
1,00%	3,16 ± 0,43
2,39%	2,80 ± 0,67

* Diferença significativa em relação ao controle negativo a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

[#] Diferença significativa em relação ao controle solvente a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

CN – Controle negativo, CS - Controle solvente e CP – Controle positivo.

Os controles negativo (PBS) e solvente (Tween 80 a 8%) não diferiram entre si no índice de mutagenicidade do ensaio com células de CHO-K1. Assim, o surfactante Tween 80 a 8% não induziu a formação de micronúcleos em células de CHO-K1.

6.4 DISCUSSÃO

O ensaio de *A. cepa* revelou que o óleo de *S. terebinthifolius* não interferiu no índice mitótico. Nesello, Serafini e Pauletti (2007) observaram efeito alelopático do óleo de *S. terebinthifolius* sob a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento radicular das plantas *Lactuca sativa* (alface) e *Bidens pilosa* (picão-preto). Segundo Liu, Jiang e Li (1992) a inibição do crescimento da raiz é resultado da inibição da divisão celular, em decorrência da diminuição do índice

mitótico. Como não foi encontrada inibição do índice mitótico em *A. cepa*, sugere-se que a ausência de inibição pode estar relacionada às raízes já estarem em crescimento quando expostas ao óleo essencial e ao tempo de até 72 h não ter sido suficiente para gerar inibição.

Souza et al. (2005) estudando o efeito citotóxico e alelopático de plantas medicinais observaram que embora o extrato aquoso de estévia, na concentração de 5 mg/mL, tenha diminuído o índice de velocidade de germinação de sementes de alface, ele não inibiu o índice mitótico. Inclusive, o índice mitótico apresentou-se significativamente superior em relação ao controle negativo. Desta forma, mesmo com a germinação inibida o autor também não observou inibição do índice mitótico.

Os testes genotóxicos e mutagênicos realizados com células de *A. cepa* e de CHO-K1 revelaram ausência de genotoxicidade e mutagenicidade do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* nas concentrações de 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 e 2,39% em ambos os sistemas teste.

Como as células de CHO-K1 são células epiteliais, infere-se que o uso tópico do óleo essencial não traria malefícios à pele em relação à mutagenicidade. Desta forma, o uso tópico deste óleo na medicina popular (LIMA et al., 2006) ou como repelente contra o mosquito *A. aegypti*, vetor do vírus da dengue (COLE, 2008), é possível. Entretanto, ainda faz-se necessário a realização de outros testes toxicológicos para observar se o óleo pode ter outra ação, como de irritação.

Segundo Degáspari, Waszczyntyj e Santos (2004) extratos alcoólicos e aquosos de frutos de *S. terebinthifolius* apresentam um bom poder antioxidante. Os agentes antioxidantes protegem os organismos aeróbicos contra as espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Desta forma as substâncias antioxidantes impedem que ocorra dano oxidativo a macromoléculas importantes (VELÁZQUEZ et al., 2003). Assim, a composição dos frutos *S. terebinthifolius* tem a propriedade de diminuir a quantidade de danos oxidativos que podem ocorrer ao DNA de organismos que estão em contato com os mesmos.

Os resultados de atoxidade dos frutos de *S. terebinthifolius* são concordantes com o estudo de Pires et al. (2004), que revelou atoxidade do extrato do fruto por via oral em camundongos. A dose limite utilizada pelos autores, 5 g.kg⁻¹, equivale a 2.500

vezes superior à utilizada como condimento habitualmente, sugerindo inocuidade ao consumo humano.

O resultado de ausência de genotoxicidade também está de acordo com o estudo realizado por Ruiz et al. (1996) que também revelou ausência de genotoxicidade dessa espécie, entretanto, trabalhando com extrato alcoólico das folhas. O extrato estudado não mostrou efeito tóxico no crescimento das colônias no ensaio de segregação somática de *Aspergillus nidulans*, demonstrando ausência de efeito genotóxico.

Por outro lado, Carvalho et al. (2003) encontraram atividade mutagênica estudando o decocto da casca desta planta. O decocto provocou citotoxicidade às cepas TA 100 e TA 102 de *Salmonella typhimurium* no teste de Ames. Os autores atribuíram a mutagenicidade à flavonóides existentes na casca que teriam estrutura mutagênica devido à posição da hidroxila.

Segundo Cole (2008) o óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*, aqui estudado, apresentou predominância terpênica (90,44%). Desta forma, os flavonóides com estrutura mutagênica não foram observados no óleo do fruto.

Os monoterpenos são compostos naturais que são encontrados em plantas aromáticas e medicinais, e são os principais constituintes dos óleos essenciais das plantas. Apesar dos óleos essenciais e seus componentes de monoterpenos serem largamente utilizados em aditivos alimentares, cosmética e produtos para casa, como inseticidas e detergentes, apenas poucos deles foram estudados. Tem-se o pulegone com propriedade hepatotóxica e o safrole com genotóxica (GOMES-CARNEIRO et al., 2005).

Gomes-Carneiro et al (2005) estudaram β -mirceno, α -terpineno e (+)- e (-)- α -pineno e observaram ausência de genotoxicidade desses no teste de Ames. Os compostos α -pineno e mirceno são encontrados no óleo essencial de *S. terebinthifolius* e, por isso, não estariam relacionados a proporcionar ação genotóxica ao óleo.

O limoneno, também presente no óleo de *S. terebinthifolius*, está presente em 97,8% do óleo de *Citrus aurantium* (laranja-azedo). O óleo de *C. aurantium* apresentou ausência de efeito mutagênico no teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos Wistar (FONSECA, 2008). Desse modo, percebe-se que, provavelmente, não haja atividade genotóxica por parte do limoneno.

Entretanto, os óleos essenciais apresentam composição complexa e os compostos formadores interagem entre si, agindo sinergisticamente (FENG; ZHENG, 2007). De acordo com McGeorge et al. (1983, apud ALEEM; MALIK, 2005), o efeito genotóxico, muitas vezes, pode não ser atribuído a compostos específicos em uma mistura, e sim, a um conjunto de interações químicas da amostra como um todo.

Desta forma, observamos que os compostos presentes no óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*, na proporção observada, não geraram efeito genotóxico e mutagênico em ambos os sistemas teste avaliados.

Em relação ao Tween 80 a 8%, utilizado para a diluição do óleo essencial, não foram observadas genotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa* e mutagenicidade em células de CHO-K1. Portanto, nossos resultados sugerem a utilização do surfactante Tween 80 a 8%, em testes de genotoxicidade com ambos os sistemas teste, para diluir substâncias hidrofóbicas, sem causar danos genotóxicos.

A ausência de genotoxicidade do Tween 80 a 8% também foi registrada por Fonseca (2008) no teste do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico de ratos Wistar e no ensaio do cometa em células da mucosa gástrica de ratos Wistar.

6.5 CONCLUSÕES

O teste de aberrações cromossômicas em *A. cepa* e o teste do micronúcleo em células de CHO-K1 demonstraram a ausência de genotoxicidade e mutagenicidade do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*. Desta forma, este óleo essencial não causaria danos genotóxicos a quem o utilizar topicamente. Entretanto, ainda faz-se necessária a realização de outros testes toxicológicos para verificar a total inocuidade deste óleo essencial.

6.6 REFERÊNCIAS

- AARDEMAA, M. J.; SNYDER, R. D.; SPICER, C.; DIVI, K.; MORITA, T.; MAUTHE, R. J.; GIBSON, D. P.; SOELTER, S.; CURRY, P. T.; THYBAUD, V.; LORENZON, G.; MARZIN, D.; LORGE, E. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test III. Using CHO cells. **Mutation Research**. v. 607, p. 61–87, 2006.
- ALEEM, A.; MALIK, A. Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 404–412, 2005.
- AOAC. Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- CARVALHO, M. C. R. D.; BARCA, F. N. T. V.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Evaluation of Mutagenic Activity in an Extract of Pepper Tree Stem Bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 42, p.185–191, 2003.
- COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. dos. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.
- DIAZ, D.; SCOTT, A.; CARMICHAEL, P.; SHI, W.; COSTALES, C. Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 630, p. 1–13, 2007.
- FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126–1130, 2007.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.
- FONSECA, V. B.; **Avaliação do potencial toxicogênico e quimioprotetor do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L. *in vivo***. 2008. Dissertação

(Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology** v. 81, p.11-16, 2002.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; VIANA, M. E. S.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+)- and (-)- α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay. **Food and Chemical Toxicology**. V. 43, p. 247–252, 2005.

GROVER, I. S.; SATWINDERJEET, K. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p.183–188, 1999.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à Bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São Paulo, 2002.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE JR., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, p.153–163, 2003.

KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O.; ARKHIPOV, A.; HOHN, B. Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 1054-1059, 1998.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 02, p.198-201, 2004.

LIMA, M. C. de **Investigação da possível atividade mutagênica e antimutagênica do extrato da casca da *Rhizophora mangle* L. utilizado na confecção de painéis de barro no município de Vitória/ES, pelo sistema in vivo e in vitro**. 2007. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

LIMA, M. R. F. de; LUNA, J. de S.; SANTOS, A. F. dos; ANDRADE, M. C. C. de; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J.-P.; MÁRQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137–147, 2006.

LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 117, p. 23-20, 1992.

MA, T-H. ; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL , H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185–195, 1995.

MARZIN, D. The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. **Mutation Research**, v. 392, p.175-181, 1997.

NESELLO, M. A.; SERAFINI, L. A.; PAULETTI, G. F. **Efeito alelopático do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* sobre *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa***. In: XV Encontro de jovens pesquisadores da UCS, 2007, Caxias do Sul. Resumos dos trabalhos, 2007.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do reino (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmacêutica Boraense**, v. 23, n. 02, p. 176-182, 2004.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

RUIZ, A. R.; DE LA TORRE R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52, p. 123-127, 1996.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research** v. 368, p. 171-179, 1996.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKY, V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2005.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER , H.A.; M. P. de BUSCHIAZZO, SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, p.91–97, 2003.

7 CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* E *in vivo*.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o efeito do óleo essencial do fruto de *Schinus terebinthifolius* sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* e no desenvolvimento da antracnose no período pós-colheita de frutos de mamão. As diferentes concentrações de óleo foram diluídas em Tween 80 a 8%. No experimento *in vitro* foram preparados meios de cultura BDA com concentrações de 0,05, 0,10, 0,25 e 0,50% do óleo essencial. O controle negativo foi realizado apenas com meio BDA e o controle solvente com meio BDA e Tween 80 a 8%. A inibição do crescimento do fungo foi diretamente proporcional à quantidade do óleo e a maior inibição encontrada foi de 79,07% na concentração de óleo de 0,50%. No experimento *in vivo* os frutos do mamoeiro foram inoculados com o fungo. Foram realizados quatro tratamentos: com biofilme, com biofilme mais 0,50% do óleo, com fungicida Prochloraz e frutos controle. Embora o tratamento com óleo tenha sido eficiente contra o fungo, não foi indicado comercialmente, pois apresentou valores elevados de perda de massa fresca e de firmeza e também apresentou sintomas de fitotoxicidade. Assim, o óleo tem propriedade antifúngica contra *C. gloeosporioides* *in vitro* e *in vivo*, todavia causou fitotoxicidade ao mamão, não sendo indicado seu uso comercial. Desta forma, sugerem-se estudos com o mesmo óleo em frutos menos sensíveis à fitotoxicidade.

Palavras-chave: *Carica papaya*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Schinus terebinthifolius*, controle alternativo.

ABSTRACT

This work evaluated the effect of *Schinus terebinthifolius* fruit essential oil on the mycelial growth velocity index (MGVI) of *Colletotrichum gloeosporioides* fungus *in vitro* and on the anthracnose development during the postharvest period of papaya fruits *in vivo*. The different oil concentrations were diluted in Tween 80, 8%. In the *in vitro* experiment BDA culture media with concentrations of 0.05, 0.10, 0.25 e 0.50% of the essential oil was prepared. The negative control was performed just with BDA media and the solvent control with BDA media and Tween 80, 8%. The fungus growth inhibition was directly proportional to the oil amount and the biggest joined inhibition was of 79.07% of the 0.50% oil concentration. In the *in vivo* experiment the papaya plant fruits were inoculated with the fungus. Four treatments were performed: with biofilm, with biofilm plus 0.50% of the oil, with the fungicide Prochloraz and control fruits. The treatment with oil has been efficient against the fungus, but it was not indicated commercially, therefore it presented high values of fresh mass loss and firmness and also fitotoxicity symptoms. Thus, the essential oil had antifungic activity against *C. gloeosporioides* *in vitro* and *in vivo*, however it caused fitotoxicity to papaya fruits, which is not indicated commercially. Therefore, it is suggested studies with the same oil in less phytotoxicity sensitive fruits.

Keywords: *Carica papaya*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Schinus terebinthifolius*, alternative control.

7.1 INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea, tipicamente tropical e que atualmente é cultivado em mais de 40 países. O fruto do mamoeiro é climatérico e completa seu amaduracimento (que envolve o amaciamento do mesocarpo e do endocarpo e a produção dos açúcares e constituintes do flavor), sob condições ambientais, em aproximadamente uma semana depois de colhido (ROCHA et al.,

2005; YAMANISHI et al., 2005; FOLEGATTI; MATSUURA, 2002; PAULL; CHEN, 1983).

A vida pós-colheita dos frutos pode ser reduzida em virtude de patógenos e fatores abióticos, que originam perdas quantitativas e/ou qualitativas (FOLEGATTI; MATSUURA, 2002). Os biofilmes comestíveis são resistentes, transparentes, eficientes contra a perda de água e oferecem brilho e bom aspecto aos frutos (LEMOS et al., 2007), mas não oferecem ação contra patógenos.

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é o mais importante agente causal de doenças pós-colheita em frutos (TAVARES; SOUZA, 2005). Um único isolado deste patógeno pode originar tanto a antracnose quanto a mancha chocolate, podendo a lesão permanecer superficial ou penetrar no parênquima (ALVAREZ; NISHIJIMA, 1987).

O controle de fitopatógenos tem sido feito por meio de agentes químicos sintéticos, mas seu uso vem sendo restringido, devido às suas possíveis ações carcinogênicas e teratogênicas, à alta toxicidade e aos efeitos colaterais em humanos, além de originar poluição ambiental e requerer um longo período de tempo para a sua completa degradação (FENG; ZHENG, 2007).

Segundo Feng e Zheng (2007) o uso de óleos essenciais é promissor para o desenvolvimento de agentes antifúngicos seguros por poderem apresentar ações antimicrobianas e antifúngicas, serem relativamente seguros e largamente aceitos pelos consumidores. Por isso, diversos estudos sugerem a utilização de óleos essenciais que possuem propriedades antifúngicas na pós-colheita de frutos (REGNIER et al., 2008; SHARMA; TRIPATHI, 2008; FENG et al., 2008).

Schinus terebinthifolius é uma planta conhecida popularmente como aroeira e que tem seus frutos utilizados como condimento alimentar, tanto no mercado nacional quanto internacional (LENZI; ORTH, 2004). O fruto possui de 5,50 a 8,41% de óleo essencial. Este óleo apresenta uma composição química predominante de monoterpenos (85,1%), sendo os mais abundantes δ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), α -felandreno (12,60%), α -pineno (12,59%), mirceno (5,82%) e o-cimeno (3,46%), seguido pelos sesquiterpenos (5,34%) *trans*-cariofileno, γ -muuruleno, *E,E*- α -farneseno, δ -cadineno e epi- α -cadinol (COLE, 2008). O óleo é utilizado topicamente para tratar problemas respiratórios, micoses e infecções por cândida

(LIMA et al., 2006). A ação antifúngica de extratos de folhas de *S. terebinthifolius* é discutida para várias espécies, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii* (BRAGA et al., 2007; JOHANN et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi testar a eficácia do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, e avaliar, *in vivo*, o período pós-colheita de frutos de mamoeiro tratados com biofilme de amido contendo o mesmo óleo.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*.

Para execução do teste *in vitro* foi preparado o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) líquido e em seguida foram feitos os diferentes tratamentos testados. As diferentes concentrações de óleo do fruto de *S. terebinthifolius* testadas foram diluídas em BDA e Tween 80 a 8% (surfactante). Foram utilizadas as concentrações de 0,05, 0,10, 0,25 e 0,50% do óleo. Foram feitos um controle negativo apenas com BDA e um controle solvente com BDA e Tween 80 a 8%, totalizando 6 tratamentos.

Cada tratamento foi feito em triplicata, perfazendo dezoito placas de Petri. Após a solidificação do meio, discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro foram transferidos para o centro das placas e foi adicionado a estes 3 µL de suspensão de esporos de *C. gloeosporioides* na concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Nas placas de Petri foram feitos dois eixos perpendiculares com o auxílio de uma caneta de retroprojektor, para facilitar a medição de crescimento micelial. As placas de Petri inoculadas foram, então, incubadas em câmara de crescimento tipo BOD (Biological Oxygen Demand) a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram realizadas medidas do diâmetro da colônia, sobre os eixos perpendiculares, com auxílio de um paquímetro digital de marca Digimess. As medidas foram realizadas nos dias 2, 4, 6 e 8 após a inoculação.

O cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), expresso em cm.dia^{-1} , foi realizado conforme proposto por Oliveira (1991, apud GOMES, 2008), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Onde,

D: Diâmetro médio atual

Da: Diâmetro médio anterior

N: número de dias após a inoculação

Os dados de IVCM foram submetidos à análise estatística por meio da Análise de Variância ANOVA e posteriormente teste de comparação de médias Tukey ($p < 0,05$), por meio do programa Assistat 7.5 beta.

7.2.2 Controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vivo*.

Frutos de mamão do grupo Solo, cultivar Golden, fornecidos pela empresa Caliman Agrícola S.A., de Linhares, ES, foram coletados no estágio 1 de maturação de acordo com o Ministério da Integração Nacional (2000) (Figura 1). Os frutos foram transportados para o Setor de Botânica da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foram lavados e sanificados com uma solução de hipoclorito de cálcio 200 mg.L^{-1} .



Figura 1 – Aspecto visual externo de um fruto de mamão, utilizado no experimento, colhido no estágio um de maturação.

Os frutos foram inoculados com o fungo *C. gloeosporioides*. Foi realizado um ferimento por um conjunto de agulhas hipodérmicas em três pontos da superfície do fruto. O látex que saiu dos ferimentos dos frutos foi retirado com papel. Sobre o ferimento foi adicionado 3 μL de suspensão de esporos na concentração de $1,3 \times 10^6$ conídios. mL^{-1} (Figura 2).



Figura 2 – Inoculação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em três pontos do fruto, indicados por seta.

Os frutos foram submetidos a quatro tratamentos: frutos controle (C); frutos com biofilme de 1% de amido (Figura 3) (B); frutos com biofilme de 1% de amido, 8% de Tween 80 e 0,5% de óleo essencial de aroeira (O) e frutos tratados por imersão em água contendo o fungicida Prochloraz a 0,025% por 3 minutos (F).

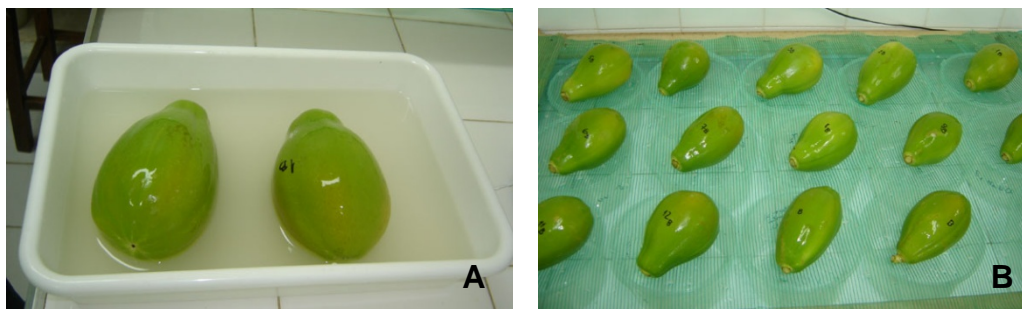


Figura 3 – A - Aplicação dos biofilmes nos frutos. B- Secagem do biofilme.

Durante o período pós-colheita os frutos foram mantidos em temperatura de aproximadamente 25°C. As análises foram realizadas em triplicatas nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 após a colheita.

A perda de massa fresca (PMF) foi obtida pela diferença entre a massa inicial (dia 0) e a no momento da realização das análises, sendo expressa em porcentagem. A firmeza da polpa ($\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi determinada por meio de um penetrômetro manual, com ponteira de 8 mm. As medidas foram realizadas na região equatorial dos frutos, depois de retirada a casca, em três pontos equidistantes. Os teores de sólidos solúveis (SS), expressos em °Brix, foram obtidos retirando-se uma amostra do suco do fruto e colocando-se sobre a lente do refratômetro. O pH da polpa foi medido por potenciometria. Para isto, foram maceradas 2 g do fruto, completados com água para 100 mL e avaliado por meio de um pHmetro digital (AOAC, 1992). A acidez titulável (AT), expressa em mg de ácido cítrico/100 mL de suco, foi feita pela titulação de uma alíquota de suco, em presença de fenolftaleína, com NaOH 0,1 N até o pH atingir 8,1 (AOAC, 1992).

A análise da atividade antifúngica dos diferentes tratamentos utilizados foi realizada por meio de análise visual das 3 regiões em que o fungo *C. gloeosporioides* foi inoculado.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada por meio do programa Assistat 7.5 beta, sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste T ($p < 0,01$ e $p < 0,05$).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*.

Foram observadas diferenças significativas entre o IVCM nos diferentes tratamentos. Os tratamentos controles negativo e solvente não diferiram estatisticamente e apresentaram os maiores índices (Tabela 1). Por outro lado, as concentrações de 0,05, de 0,10 e de 0,25% apresentaram IVCM intermediários. A concentração de 0,50% foi a que apresentou o crescimento mais lento, com uma média de 1,04 cm.dia⁻¹, enquanto o controle negativo cresceu a 4,96 cm.dia⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e erro padrão do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (cm.dia⁻¹) e valores médios da capacidade de inibição do IVCM (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* em BDA nas diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius* e nos controles.

	IVCM (cm.dia ⁻¹)	Inibição do IVCM (%)
CN	4,96 ± 0,17 a	0,00
CS	5,36 ± 0,03 a	0,00
0,05%	4,57 ± 0,11 ab	7,88
0,10%	3,78 ± 0,44 bc	23,80
0,25%	2,81 ± 0,22 c	43,33
0,50%	1,04 ± 0,15 d	79,07

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

CN – Controle negativo BDA e CS – Controle solvente BDA + Tween 80 a 8%.

Na figura 4, pode-se observar, comparativamente, os diferentes tamanhos das colônias de fungo no 8° dia após a incubação, em relação aos diferentes tratamentos realizados.

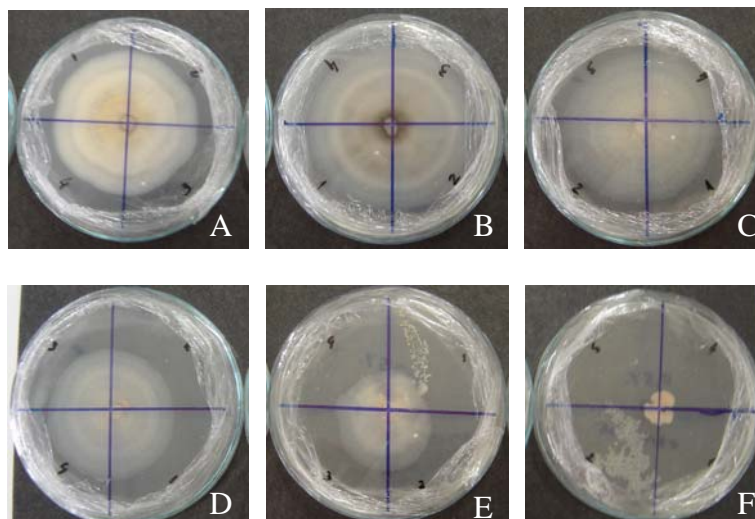


Figura 4 – Efeito *in vitro* de diferentes concentrações do óleo de *Schinus terebinthifolius* em *Colletotrichum gloeosporioides* em BDA, no 8º dia após a incubação. A – Controle negativo, B – Controle solvente, C – 0,05%, D – 0,10%, E – 0,25% e F – 0,50% do óleo.

Na tabela 1, encontra-se, também, a capacidade das diferentes concentrações do óleo essencial em inibir o crescimento do fungo em porcentagem. Constatou-se que na concentração correspondente a 0,50% houve maior inibição (79,07%) do crescimento micelial.

Desta forma, o óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresentou propriedade antifúngica contra o fungo *C. gloeosporioides*, a qual aumentou, significativamente, com o aumento da concentração do óleo (Tabela 1). É provável que o crescimento micelial fosse completamente inibido em concentrações maiores que 0,50%. Entretanto, economicamente, é importante que sempre seja utilizada a menor concentração com efeito satisfatório. Por isso, a concentração de 0,50% já pode ser indicada para o controle alternativo do fungo.

Feng e Zheng (2007) encontraram, utilizando óleo de tomilho, uma inibição de 62% do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e consideraram tal resultado promissor para a utilização de óleos de plantas no controle de doenças pós-colheita.

Alguns autores estudando o efeito de óleos essenciais sob o IVCM de fungos também observaram inibição significativa do crescimento do fungo. Gomes (2008), investigando a ação dos óleos essenciais de cravo, capim-limão e tomilho sob o IVCM de *C. gloeosporioides*, encontrou inibição significativa do crescimento do fungo para os três óleos. Sendo que os óleos de tomilho e cravo inibiram

completamente o crescimento do fungo na maior concentração utilizada (300 ppm). Tzortzakis e Economakis (2007), investigando o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) contra os fungos patogênicos *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, *in vitro*, observaram diminuição significativa do crescimento de todos os fungos.

Provavelmente, o potencial fungitóxico dos óleos essenciais é proveniente do sinergismo entre os seus constituintes (TRIPATHI; DUBEY, 2004). Entretanto, o mecanismo de ação antifúngica desses óleos ainda não é conhecido (FENG; ZHENG, 2007).

De acordo com Tzortzakis e Economakis (2007), os compostos voláteis emitidos pelos óleos essenciais têm efeito na superfície de crescimento micelial e na percepção e transdução de sinais envolvidos na mudança de fase de desenvolvimento do fungo (de vegetativa para reprodutiva). Por isso, os óleos também causam impacto no processo de esporulação do fungo.

Estudos de IVCM de fungos tratados com extratos de plantas e algas também apresentaram resultados positivos para antifungicidade. Paulert (2005) observou que extratos metanólicos da macroalga marinha *Ulva fasciata* inibiram, significativamente, o IVCM de *Colletotrichum lindemuthianum* (causador da antracnose em feijoeiro comum), sendo que a concentração de 1 mg.L⁻¹ inibiu em 17,08% e a de 2 mg.L⁻¹ em 55,87%.

7.3.2 Controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vivo*.

Ao longo do período de armazenamento dos frutos de mamoeiro ocorreu um incremento significativo em nível de 1% na PMF de todos os tratamentos (Figura 5). Estes resultados estão de acordo com os observados por Rocha et al. (2005) que relataram um aumento da PMF do mamão 'Formosa' com o aumento do período de armazenamento. Segundo Carvalho (2000), a PMF está relacionada aos processos de transpiração e respiração, uma vez que estes ocasionam ao fruto a perda de água e de material de reserva, respectivamente.

Em relação aos diferentes tratamentos, foram observadas diferenças significativas a partir do 4º dia. O tratamento B foi o que apresentou menor PMF, uma vez que o biofilme protetor controla a perda excessiva de água do fruto através da redução da transpiração e da respiração (OLIVEIRA JÚNIOR; COELHO; COELHO, 2005). O tratamento O apresentou PMF bastante elevada (Figura 5), se destacando dos outros tratamentos. Elevados valores de PMF não são desejáveis, já que a desidratação pode interferir nas propriedades físicas, fisiológicas, patológicas, estéticas, nutricionais e econômicas do fruto (SOLON et al. 2005).

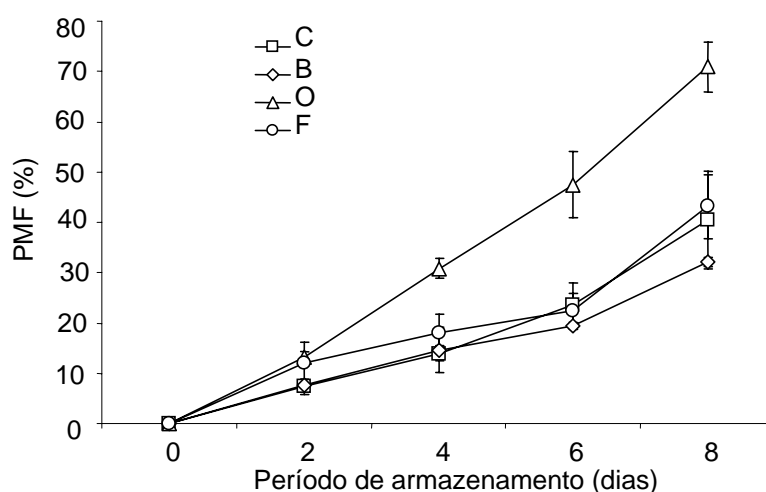


Figura 5 – Valores de perda de massa fresca (PMF) (%) dos diferentes tratamentos de mamão. Barras verticais representam erro padrão. C – controle, B – biofilme, O – biofilme + óleo, F – fungicida.

Ao longo do tempo, ocorreu uma redução significativa da firmeza dos frutos, em nível de 1% (Figura 6), o que, segundo Paull e Chen (1983), está relacionada à atividade da pectinametilesterase e poligalacturonase, enzimas que degradam a parede celular.

O tratamento C apresentou menor firmeza, que pode estar relacionada ao maior amadurecimento destes frutos em virtude desses não terem recebido nenhum tratamento. O tratamento O apresentou firmeza maior que os outros tratamentos no oitavo dia após a colheita, o que não é desejável comercialmente, pois frutos excessivamente firmes podem ter a aceitação comercial reduzida, já que não amoleceram devidamente (JACOMINO et al., 2002).

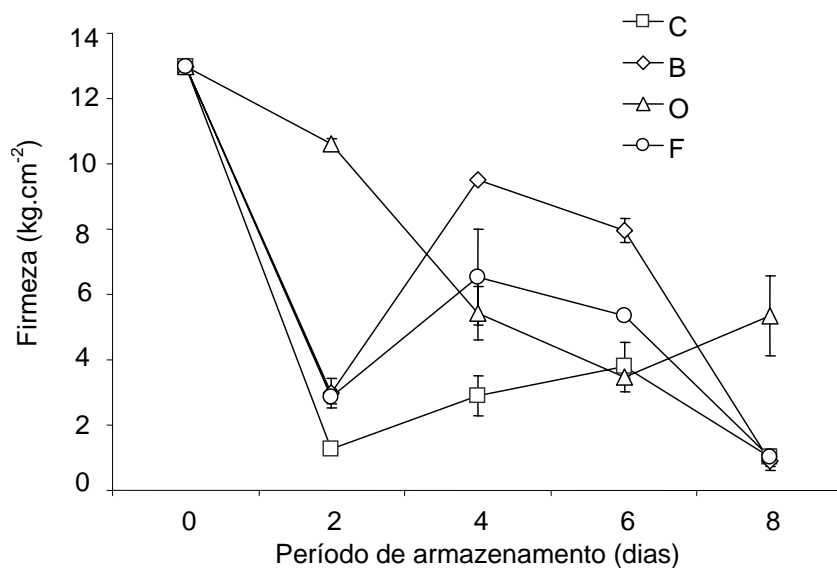


Figura 6 - Valores de firmeza (kg.cm^{-2}) dos diferentes tratamentos de mamão. Barras verticais representam erro padrão. C – controle, B – biofilme, O – biofilme + óleo, F – fungicida.

A AT dos frutos decresceu em todos os tratamentos, até o 4º dia (Figura 7). De acordo com Xavier (2007), a diminuição dos ácidos orgânicos, ao longo do armazenamento, está relacionada com a utilização destes como substrato para respiração. Segundo Oliveira Júnior, Coelho e Coelho (2005), o decréscimo da AT é explicado pela utilização dos ácidos orgânicos em diversas rotas metabólicas.

Os tratamentos F e O tiveram um aumento no 8º dia e o C no 6º dia. A tendência dos frutos é de perder AT ao longo do amadurecimento, entretanto, pode ocorrer um pequeno aumento da AT com o avanço da maturação (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O aumento da AT pode estar relacionado à maior perda de água, uma vez que em virtude desta perda há o efeito da concentração dos ácidos no interior do fruto (XAVIER, 2007). O tratamento B foi o único que não apresentou aumento da AT nos últimos dias e foi também o tratamento que apresentou menor PMF devido ao biofilme. Por isso, relaciona-se à maior quantidade de água dentro desses frutos, em relação aos outros tratamentos, como sendo responsável pela ausência de efeitos de concentração.

Em relação aos diferentes tratamentos, o C apresentou valores de AT maiores. Esta maior quantidade de ácidos orgânicos pode estar relacionada ao maior amadurecimento dos frutos controle, já que eles também apresentaram maior perda de firmeza. Tanto a característica de maior AT quanto de menor firmeza estão relacionados à maior ação da enzima pectinametilesterase e, conseqüentemente maior amadurecimento (XAVIER, 2007).

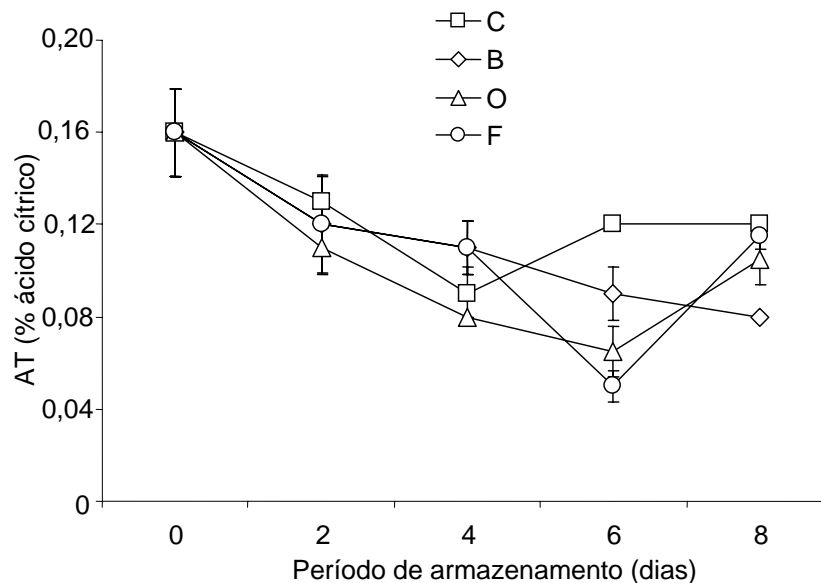


Figura 7 – Valores de acidez titulável (AT) (% ácido cítrico) dos diferentes tratamentos de mamão. Barras verticais representam erro padrão. C – controle, B – biofilme, O – biofilme + óleo, F – fungicida.

Com relação aos SS, houve uma pequena queda no início do período de armazenamento e um pequeno aumento no final do período, ambos significativos (Figura 8). Ocorreu uma queda no 2º dia, que pode estar relacionada ao maior consumo de constituintes orgânicos no processo respiratório (PRADO et al., 2003). É provável que o aumento de SS, em todos os tratamentos, no 8º dia, esteja relacionado ao amadurecimento do fruto, em virtude da degradação de polissacarídeos de reserva e da parede celular e da perda de água que resultaram em maior concentração dos SS no fruto (XAVIER, 2007). Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si, variando de 11,28 a 13,65 °Brix.

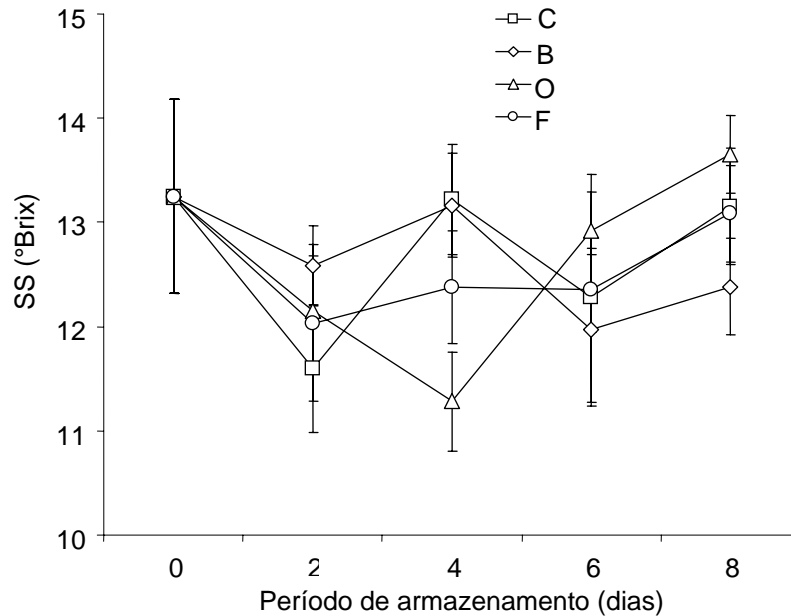


Figura 8 – Valores de teor de sólidos solúveis (SS) (°Brix) dos diferentes tratamentos de mamão. Barras verticais representam erro padrão. C – controle, B – biofilme, O – biofilme + óleo, F – fungicida.

Todos os tratamentos se apresentaram semelhantes em relação ao pH. O pH sofreu uma pequena queda no 2º dia após a colheita e, em seguida, aumentou significativamente ao longo do tempo (Figura 9). O aumento do pH está de acordo com Chitarra e Chitarra (2005), que afirmaram que as frutas têm a acidez diminuída ao longo do amadurecimento e que o mamão mais maduro possui maior pH.

O tratamento O diferiu, significativamente, dos outros tratamentos, apresentando maior pH. É possível que este resultado esteja relacionado ao stress causado pelo óleo no fruto. Carvalho, Daiuto e Lima (1998) também relacionaram ao stress sofrido por um tratamento, a diferença de pH apresentada, em relação aos demais tratamentos.

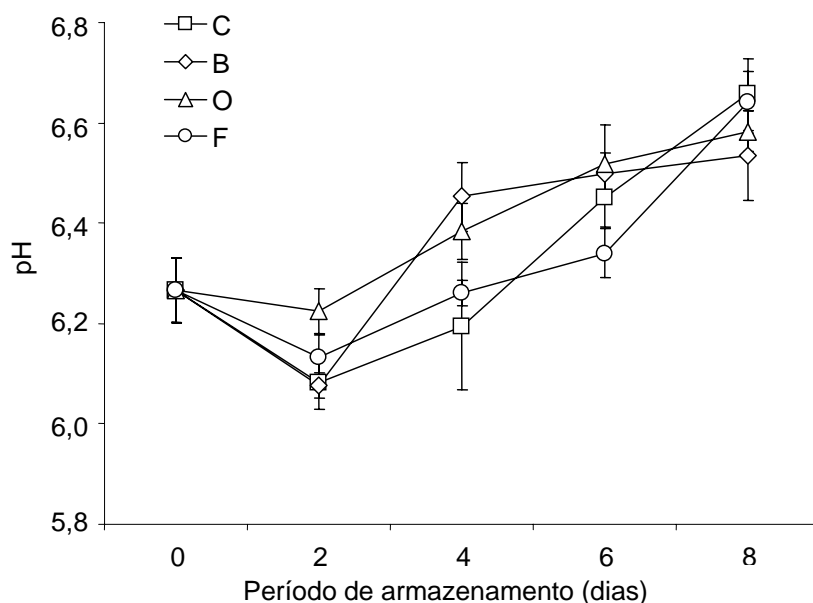


Figura 9 – Valores de pH dos diferentes tratamentos de mamão. Barras verticais representam erro padrão. C – controle, B – biofilme, O – biofilme + óleo, F – fungicida.

A análise antifúngica revelou a presença de sintomas de antracnose ao redor do local de inoculação apenas nos tratamentos B e C (Figura 10 A). Verificou-se, por isso, que O e F foram eficientes contra o fungo *C. gloeosporioides*.

Visualmente, os frutos tratados com óleo de *S. terebinthifolius*, na concentração utilizada, apresentaram injúrias, as quais aumentaram ao longo do tempo (Figura 10 B). As injúrias relacionam-se a um efeito de fitotoxidade desse óleo essencial em frutos do mamoeiro, tornando-os impróprios para o comércio. Plotto, Roberts e Roberts (2003) também encontraram fitotoxidade em frutos de tomate quando estes foram tratados com emulsão de nardo.

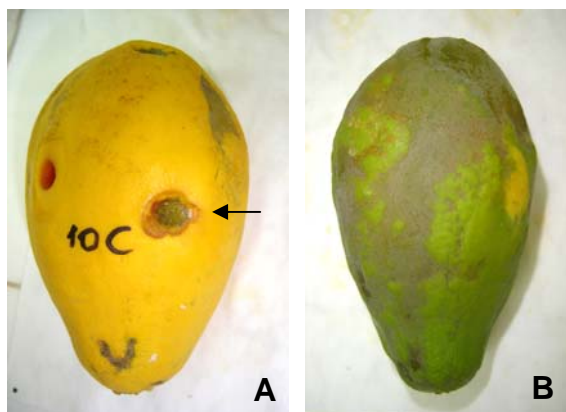


Figura 10 – Frutos de mamão no 8º dia após a colheita. A – Fruto controle, com sintoma de antracnose ao redor da região de inoculação (seta), B – Fruto de mamão tratado com óleo essencial de *S. terebinthifolius* com sintomas de fitotoxidade.

O mamoeiro é uma planta considerada muito sensível à fitotoxidade, sendo que o grau deste efeito é variável em relação aos produtos e às formulações do mesmo produto utilizados no controle de pragas e doenças (VIEIRA; RUGGIERO; MARIN, 2003). Desta forma, é provável que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* possa ser utilizado para inibir o crescimento do fungo *C. gloeosporioides* durante a vida de prateleira de outras frutas que também são atacadas por este fungo, mas que não sejam muito sensíveis à fitotoxidade, como o fruto do mamoeiro.

7.4 CONCLUSÕES

O óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius* apresentou atividade fungitóxica contra o fungo *C. gloeosporioides in vitro*. A inibição do crescimento do fungo foi diretamente proporcional à concentração do óleo e a maior concentração utilizada (0,50%) apresentou uma inibição de 79,07%.

O tratamento com óleo essencial *in vivo*, em mamão, se revelou eficiente contra o fungo *C. gloeosporioides* durante o período pós-colheita avaliado. Todavia, o mesmo não é indicado para o comércio em virtude da elevada perda de massa fresca e

maior firmeza e de características visuais que demonstraram sintomas de fitotoxidade.

Sugerem-se pesquisas que explorem a viabilidade da utilização do óleo de *S. terebinthifolius* para controle o fungo *C. gloeosporioides* em outros frutos que não sejam muito sensíveis à fitotoxidade.

7.6 REFERÊNCIAS

ALVAREZ, A. M.; NISHIJIMA, W. F. Postharvest diseases of papaya. **Plant Disease**. v. 71, n. 8, p. 681-686, 1987.

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC, 1992.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. DE O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 396–402, 2007.

CARVALHO, A.V. **Avaliação da qualidade de kiwis cv. Hayward minimamente processados**. 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CARVALHO, A. V.; DAIUTO, A. R.; LIMA, L. C. de O. Qualidade de mamão (*Carica papaya*) minimamente processado e armazenado em condições refrigeradas. **Revista da Universidade de Alfenas**, v. 4, p.137-140, 1998.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras-MG:ESAL/FAEPE, 2005.

COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

FENG, W.; ZHENG, X; CHEN, J.; YANG, Y. Combination of cassia oil with magnesium sulphate for control of postharvest storage rots of cherry tomatoes. **Crop Protection**, v.27, p.112–117, 2008.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126–1130, 2007.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mamão**: Pós-colheita. EMBRAPA: Mandioca e Fruticultura. Brasília. Frutas do Brasil, 21. 2002.

GOMES, L. I. S. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeitos de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A.; BRACKMANN, A.; CASTRO, P. R. C. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.303-308, 2002.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 632-637, 2007.

LEMO, O. L.; REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R.; VILA, M. T. R.; SILVA, K. S. Utilização de biofilme comestível na conservação de pimentão ‘Magalir’ em duas condições de armazenamento. **Bragantia**, v.66, n.4, p.693-699, 2007.

LENZI, M; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 02, p.198-201, 2004.

LIMA, M. R. F. de; LUNA, J. de S.; SANTOS, A. F. dos; ANDRADE, M. C. C. de; SANT’ANA, A. E. G.; GENET, J.-P.; MÁRQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137–147, 2006.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. **FrutiSéries Mamão**. Brasília, 2000. Disponível em: <www.integracao.gov.br> Acesso em: 10 jun. 2008.

OLIVEIRA JÚNIOR, L.F.G.; COELHO, E.M.; COELHO, F. C. Utilização de atmosfera modificada na conservação do mamão (*Carica papaya* L.) ‘Golden’ sob refrigeração. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.30, n.1, p. 73-77, 2005.

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PAULL, R. E.; CHEN, N. J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. **Plant Physiology**. v. 72, p. 382-385, 1983.

PLOTTO, A.; ROBERTS, D. D.; ROBERTS, R. G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, v. 628, p. 737–745, 2003.

PRADO, M. E. T.; CHITARRA, A. B.; BONNAS, D. S.; PINHEIRO, A. C. M.; MATTOS, L. M. Armazenamento de abacaxi 'Smooth Cayenne' minimamente processado sob refrigeração e atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 67-70, 2003.

REGNIER, T.; PLOOY, W. du ; COMBRINCK, S. ; BOTHA, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p.254–258, 2008.

ROCHA, R. H. C.; NASCIMENTO, S. R. de C.; MENEZES, J. B.; NUNES, G. H. de S.; SILVA, E de O. Qualidade pós-colheita do mamão Formosa armazenado sob refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.386-389, 2005.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p.246–254, 2008.

SOLON, K. N.; MENEZES, J. B.; MEDEIROS, M. K. M. de; AROUCHA, E. M. M.; MENDES, M. de O. Conservação pós-colheita do mamão formosa produzido no Vale do Assu sob atmosfera modificada. **Revista Caatinga**, v.18, n.2, p.105-111, 2005.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.235–245, 2004.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 253–258, 2007.

VIEIRA, A.; RUGGIERO, C.; MARIN, S. L. D. Fitotoxicidade de fungicidas, acaricidas e inseticidas sobre o mamoeiro (*Carica papaya* L.) cultivar Sunrise Solo Improved Line 72/12. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 175-178, 2003.

XAVIER, V. L. S. M. **Processamento mínimo de mamão e abacaxi: Respostas fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

YAMANISHI, O. K.; FAGUNDES, G. R.; MACHADO FILHO, J. A.; FALCÃO, J. V.; MIRANDA, S. de P. Comportamento da maturação de mamão Tainung 1 cultivado em Brasília- DF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 314-316, 2005.

8 CONCLUSÃO GERAL

O surfactante Tween 80 não apresentou genotoxicidade no organismo teste *A. cepa* nos tratamentos temporários. Isso sugere que o surfactante possa ser utilizado na diluição de substâncias hidrofóbicas em testes de genotoxicidade.

O óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius* não apresentou atividades genotóxica e mutagênica no teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* e no teste do micronúcleo em células de CHO-K1. Desta forma, no que diz respeito à genotoxicidade e mutagenicidade, o óleo pode ser utilizado topicamente na medicina popular e como repelente.

O óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius* apresentou ação antifúngica, *in vitro*, contra o fungo *C. gloeosporioides*, o qual gera doenças pós-colheita. Por isso, a aplicação do óleo pode ser uma forma eficiente de controle alternativo do patógeno. É sugerida a sua aplicação em frutos para evitar o desenvolvimento deste fungo, aumentando a vida pós-colheita dos mesmos.

Em mamão, a aplicação do óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolius* foi eficiente contra o fungo *C. gloeosporioides*, o qual havia sido incubado. Entretanto, o óleo gerou sintomas de fitotoxicidade nos frutos, não sendo indicado comercialmente para frutos de mamoeiro.

9 REFERÊNCIAS

AARDEMAA, M. J.; SNYDER, R. D.; SPICER, C.; DIVI, K.; MORITA, T.; MAUTHE, R. J.; GIBSON, D. P.; SOELTER, S.; CURRY, P. T.; THYBAUD, V.; LORENZON, G.; MARZIN, D.; LORGE, E. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test III. Using CHO cells. **Mutation Research**. v. 607, p. 61–87, 2006.

ALEEM, A.; MALIK, A. Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 404–412, 2005.

ALVAREZ, A. M.; NISHIJIMA, W. F. Postharvest diseases of papaya. **Plant Disease**. v. 71, n. 8, p. 681-686, 1987.

AMARAL, A. DE M.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L.; BARBÉRIO, A. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n. 1 e 2, p. 65-72, 2007.

AMORIM, M. M. R. de; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC., 1992.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105–113, 2002.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.

BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the Aggregation State of Amphotericin B on Its Toxicity to Mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 36, n. 10 p. 2310-2315, 1992.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. DE O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 396–402, 2007.

BRAPEX – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE PAPAYA. **Exportação**. Disponível em: <<http://www.brapex.net>>. Acesso em: 04 mar. 2008.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology** v. 100, p. 131–134, 2005.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. de O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89 2002.

CARVALHO, A. V.; DAIUTO, A. R.; LIMA, L. C. O. Qualidade de mamão (*Carica papaya*) minimamente processado e armazenado em condições refrigeradas. **Revista da Universidade de Alfenas**, v. 4, p. 137-140, 1998.

CARVALHO, A.V. **Avaliação da qualidade de kiwis c.v. Hayward minimamente processados**. 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CARVALHO, M. C. R. D.; BARCA, F. N. T. V.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Evaluation of Mutagenic Activity in an Extract of Pepper Tree Stem Bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 42, p.185–191, 2003.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1452–1459, 2008.

CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. de A.; HERINGE, A. P.; OLIVEIRA, R. R. de; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. M. O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1552-1560, 2008.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras:ESAL/FAEPE, 2005.

CHRISTOFOLETTI, C. A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A.; CAMILI, E. C.; SANTOS, C. A. Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 366–373, 2007.

COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspective of plant genetic and cytogenetic assays. **Mutation Research**, v. 99, p. 13–36, 1982.

DAHER, C. F.; BAROODY, G. M.; HOWLAND, R. J. Effect of a surfactant, Tween 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 575–582, 2003.

DIAZ, D.; SCOTT, A.; CARMICHAEL, P.; SHI, W.; COSTALES, C. Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 630, p. 1–13, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. dos. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.

DEMARINI, D. M.; GUDI, R.; SZKUDLINSKA, A.; RAO, M.; RECIO, L.; KEHL, M.; KIRBY, P. E.; POLZIN, G.; RICHTER, P. A. Genotoxicity of 10 cigarette smoke condensates in four test systems: Comparisons between assays and condensates. **Mutation Research**, v. 650, p. 15–29, 2008.

DONNELLY, M. J.; GREEN, D. M.; WALTERS, L. J. Allelopathic effects of fruits of the Brazilian pepper *Schinus terebinthifolius* on growth, leaf production and biomass of seedlings of the red mangrove *Rhizophora mangle* and the black mangrove *Avicennia germinans*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.357, p. 149–156, 2008.

FENG, J.; ZENG, Y.; MA, C. ; CAI, X. ; ZHANG, Q. ; TONG, M.; YU, B.; XU, P. The Surfactant Tween 80 Enhances Biodesulfurization. **Applied and environmental microbiology**, p. 7390–7393, 2006.

FENG, W.; ZHENG, X; CHEN, J.; YANG, Y. Combination of cassia oil with magnesium sulphate for control of postharvest storage rots of cherry tomatoes. **Crop Protection**, v.27, p.112–117, 2008.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126–1130, 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. v.455, p. 81–95, 2000.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, M. C.; CARVALHO, R. I. N. de; MANICA, I. Qualidade do mamão 'Solo' comercializado em Porto Alegre de outubro/91 a junho/92. **Ciência agrônômica**, v. 27, n. 1/2, p. 67-71, 1996.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mamão: Pós-colheita**. EMBRAPA: Mandioca e Fruticultura. Brasília. Frutas do Brasil, 21. 2002.

FONSECA, V. B. **Avaliação do potencial toxicogenético e quimioprotetor do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L. *in vivo***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Controle de bolor verde em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Pesquisa em Andamento Embrapa Meio Ambiente**, n. 1, p.1-4, 2000.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A. de; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. de V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Díptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GADANO, A.; GURNI, A; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology** v. 81, p.11-16, 2002.

GOMES, L. I. S. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeitos de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; VIANA, M. E. S.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTEN, F. J. R. Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+)- and (-)- α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay. **Food and Chemical Toxicology**. V. 43, p. 247–252, 2005.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; BUTA, J. G.; WANG, C. Y. Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 361-370, 2003.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations - a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v. 426, p. 107–112, 1999.

GRIPPA, G. de A. **Avaliação da qualidade de amostras de água do rio Santa Maria da Vitória/ES por meio da análise de aberrações cromossômicas e mutagenicidade no sistema de *Allium cepa***. 2007. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

GROVER, I. S.; SATWINDERJEET, K. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p.183–188, 1999.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à Bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São Paulo, 2002.

HU, M.; NICULESCU, M.; ZHANG, X. M.; HUI, A. High-performance liquid chromatographic determination of polysorbate 80 in pharmaceutical suspensions. **Journal of Chromatography**. v. 984, n. 2, p. 233-236, 2003.

ISMAN, M. B. Plant essential oil for pest and disease management, **Crop Protection**, v.19, n.1, p. 603-608, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 04 mar. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 04 mar. 2008.

JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A.; BRACKMANN, A.; CASTRO, P. R. C. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropano. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.303-308, 2002.

JIN, D.; JIANG, X.; JING, X.; OU, Z. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, p. 215–221, 2007.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 632-637, 2007.

KAMANDE, G. M.; BAAH, J.; CHENG, K. J.; MCALLISTER, T. A.; SHELFORD, J. A. Effects of Tween 60 and Tween 80 on Protease Activity, Thiol Group Reactivity,

Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.536–542, 2000.

KAREKAR, V.; JOSHI, S.; SHINDE, S. L. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test. **Mutation Research**, v. 468, p. 183–194, 2000.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v.40, n.12, p. 47-59, 1986.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D; FENECH, M.; ISHIDATE JR., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.. MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, p.153–163, 2003.

KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O.; ARKHIPOV, A.; HOHN, B. Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 1054-1059, 1998.

KOYAMA, S.; NAKAHARA, T.; WAKE, K.; TAKI, M.; ISOZUMI, Y.; MIYAKOSHI, J. Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 541, p. 81–89, 2003.

KRISTEN, U. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. **Toxicology in vitro**, v. 2, p. 181-191, 1997.

KUKI, K. N.; OLIVA, M. A.; PEREIRA, E. G.; COSTA, A. C.; CAMBRAIA, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. **Science of Total Environment**, v. 403, p. 207-214, 2008.

LEMOS, O. L.; REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R.; VILA, M. T. R.; SILVA, K. S. Utilização de biofilme comestível na conservação de pimentão 'Magalir' em duas condições de armazenamento. **Bragantia**, v.66, n.4, p.693-699, 2007.

LENZI, M; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 02, p.198-201, 2004.

LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 117, p. 23-20, 1992.

LIMA, L. C.; GIANNONI, J. A.; CHITARRA, M. I. F.; BOAS, E V. de B. V. Conservação pós-colheita de pêssegos 'Premier' sob armazenamento refrigerado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 2, p. 303-308, 1999.

LIMA, M. C. de **Investigação da possível atividade mutagênica e antimutagênica do extrato da casca da *Rhizophora mangle* L. utilizado na confecção de painéis de barro no município de Vitória/ES, pelo sistema in vivo e in vitro.** 2007. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

LIMA, M. R. F. de; LUNA, J. de S.; SANTOS, A. F. dos; ANDRADE, M. C. C. de; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J.-P.; MÁRQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137–147, 2006.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUCENA, C. C. de; SILVA, A. C. da; SILVA, A. C.; FEITOSA, H. de O.; ALMEIDA, F. F. D. de; CONEGLIAN, R. C. C.; VASCONCELLOS, M. A da S. Efeito da película de amido na conservação pós-colheita de frutos de banana cv. "Nanicão". **Agronomia**, v.38, n.2, p. 34 - 37, 2004.

LUCENA, P. L. H. de; RIBAS FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J. dos; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 46-51, 2006.

MA, T-H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185–195, 1995.

MA, T. H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research**, v. 426, p. 103–106, 1999.

MANRIQUE, V.; CUDA, J. P.; OVERHOLT, W. A.; WILLIAMS, D. A.; WHEELER, G. S. Effect of host-plant genotypes on the performance of three candidate biological control agents of *Schinus terebinthifolius* in Florida. **Biological Control**, v. 47, n. 2, p. 167-171, 2008.

MARZIN, D. The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. **Mutation Research**, v. 392, p.175-181, 1997.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. T.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MEDAL, J. C.; VITORINO, M. D.; HABECK, D. H.; GILLMORE, J. L.; PEDROSA, J. H.; SOUSA, L. P. de. Host Specificity of *Heteroperreya hubrichi* Malaise (Hymenoptera: Pergidae), a Potential Biological Control Agent of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Biological Control**, v. 14, p. 60–65, 1999.

MELO JÚNIOR, E. J. M. de; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J.A.; DINIZ, M.F.A.; MARCELINO JÚNIOR C.A.C.; SANT'ANA, A.E.G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, v. 9, p. 109–116, 2002

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. **FrutiSéries Mamão**. Brasília, 2000. Disponível em: <www.integracao.gov.br> Acesso em: 10 jun. 2008.

MORENO, J. J. Arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis as irritant index of surfactants in 3T6 fibroblast cultures. **Toxicology**, v. 143, p. 275–282, 2000.

MORGAN, E.C.; OVERHOLT, W.A. Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae) aqueous extract on germination and growth of selected Florida native plants. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 132, n.1, p. 11–15, 2005.

NESELLO, M. A.; SERAFINI, L. A.; PAULETTI, G. F. **Efeito alelopático do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* sobre *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa***. In: XV Encontro de jovens pesquisadores da UCS, 2007, Caxias do Sul. Resumos dos trabalhos, 2007.

OLIVEIRA JR., L.F.G.; COELHO, E. M.; BERBERT, P. A.; COELHO, F. C. Armazenamento de mamão 'Golden', em condições de atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 29, n. 2, p.139-142, 2004.

OLIVEIRA JR., L.F.G.; COELHO, E.M.; COELHO, F. C Utilização de atmosfera modificada na conservação do mamão (*Carica papaya* L.) Golden sob refrigeração **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.30, n.1, p. 73-77, 2005.

OSIPOV, A. N.; KOLOMIITSEVA, G. Post-radiation changes of DNA-protein crosslinks and single-stranded DNA breaks in cells of various organs in gamma-irradiated rats. **Biokhimiia**, v. 61, p. 927 – 931, 1996.

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da**

macroalga marinha *Ulva fasciata*. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PAULL, R. E.; CHEN, N. J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. **Plant Physiology**, v. 72, p. 382-385, 1983.

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

PHELPS, J. B.; HOFFMAN, W. P.; LEE, C.; MURPHY, G. P.; GARRIOTT, M. L. Relative cytotoxicity values at the lowest effective concentration for 12 positive chemicals in the *in vitro* micronucleus test utilizing Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 561, p. 153–158, 2004.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do reino (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmacêutica Boraense**, v. 23, n. 02, p. 176-182, 2004.

PRADO, M. E. T.; CHITARRA, A. B.; BONNAS, D. S.; PINHEIRO, A. C. M.; MATTOS, L. M. Armazenamento de abacaxi 'Smooth Cayenne' minimamente processado sob refrigeração e atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 67-70, 2003.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

REGNIER, T.; PLOOY, W. du ; COMBRINCK, S. ; BOTHA, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p.254–258, 2008.

RIBEIRO, C.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; MIRANDA, A. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 63–70, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Porto Alegre: ULBRA, 2003.

ROCHA, R. H. C.; MENEZES, J. B.; NASCIMENTO, S. R. de C.; NUNES, G. H. de S. Qualidade do mamão 'Formosa' armazenado sob refrigeração. **Revista Caatinga**, v.20, n.1, p.75-80, 2007.

ROCHA, R. H. C.; NASCIMENTO, S. R. de C.; MENEZES, J. B.; NUNES, G. H. de S.; SILVA, E de O. Qualidade pós-colheita do mamão 'Formosa' submetido a diferentes temperaturas de refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.386-389, 2005.

RUIZ, A. R.; DE LA TORRE R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52, p. 123-127, 1996.

SANTOS, C. C. dos; OLIVEIRA, D. F. de; ALVES, L. W. R.; SOUZA, I. F. de; FURTADO, D. A. S. Efeito de extratos orgânicos, associados ao surfactante Tween 80, na germinação e crescimento de plântula de alface. **Ciência e agrotecnologia**, v. 28, n. 2, p. 296-299, 2004.

SANTOS, L. C.; AMORIM, M. M. R. Uso da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para tratamento de infecções vaginais. **Femina**, v. 30, p. 339-342, 2002.

SANTOS, O. J. dos; RIBAS FILHO, J. M.; CZECHKO, N. G.; BRANCO NETO, M. L. C.; NAUFEL JR, C.; FERREIRA, L. M.; CAMPOS, R. P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R. D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 39-45, 2006.

SANTOS, P. L. dos; SANTOS, A. C. A. dos; SERAFINI, L. A.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F. **Determinação da composição química e do rendimento do óleo essencial de folhas e talos de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. In: XII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2004, Caxias do Sul, RS.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 563–568, 2005.

SILVA, G. G. **Avaliação do efeito da radiação gama na qualidade do mamão (*Carica papaya* L.): características nutricionais, textura, parâmetros de estresse oxidativo e genéticos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p.246–254, 2008.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research** v. 368, p. 171-179, 1996.

SOLON, K. N.; MENEZES, J. B.; MEDEIROS, M. K. M. de; AROUCHA, E. M. M.; MENDES, M. de O. Conservação pós-colheita do mamão formosa produzido no Vale do Assu sob atmosfera modificada. **Revista Caatinga**, v.18, n.2, p.105-111, 2005.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKY, V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2005.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p. 87–93, 2006.

STIMULATE the mind. **Cosmetics & Toiletries Magazine**, Estados Unidos, v. 122, n. 9, p. 84, set. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TEIXEIRA, R. de O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 551-555, 2003.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.235–245, 2004.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 253–258, 2007.

UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA. **The Carcinogenic Potency Project**. Disponível em: <<http://potency.berkeley.edu/chempages/POLYSORBATE%2080.html>>. Acesso em: 2 set. 2008.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; M. P. de BUSCHIAZZO, SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, p.91–97, 2003.

XAVIER, V. L. S. M. **Processamento mínimo de mamão e abacaxi: Respostas fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation research**, v. 567, p. 227-345, 2004.

WOOD, B. P.; KATZBERG, R. W. Tween 80/Diatrizoate Enemas in Bowel Obstruction. **American Journal of Roentgenology**. v. 130, p. 747-750, 1978.

YAMANISHI, O. K.; FAGUNDES, G. R.; MACHADO FILHO, J. A.; FALCÃO, J. V.; MIRANDA, S. de P. Comportamento da maturação de mamão Tainung 1 cultivado em Brasília- DF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 314-316, 2005.