

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Gochnatia polymorpha*

Rodrigo Juliano Oliveira¹, Marcela Garcia Carrijo¹, Thainá Domingues Nogueira¹, João Renato Pesarini¹, Natan De David¹, Mariana de Oliveira Mauro¹, Maria Élide Alves Stefanello², Candida Aparecida Leite Kassuya³, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli¹

RESUMO

No Brasil muitas plantas são utilizadas na Medicina popular para o tratamento de doenças, dentre elas encontra-se *Gochnatia polymorpha*. O presente estudo teve por objetivo descrever os efeitos do extrato etanólico da *Gochnatia polymorpha* (EEGP) sobre o DNA da cebola e em células de melanoma murino B16F10 por meio das técnicas do ensaio do MTT e *Allium cepa*. Os resultados quantitativos indicaram que o EEGP é citotóxico para células de melanoma murino nas concentrações entre 1000 e 31,25µg/mL. O EEGP não possui atividade mutagênica no ensaio de *Allium cepa* quando testado na concentração de 15x10⁻⁶µg/mL, e esse mesmo extrato ainda apresentou porcentagem de redução de danos no DNA de 43,90% quando associado ao metilmetanosulfonato. O EEGP apresentou atividade antiproliferativa e citotóxica, o que indica atividade quimioterápica em B16F10. Também apresentou atividade antimutagênica o que indica capacidade de prevenir lesões no DNA que podem se correlacionar ao desenvolvimento de tumores.

Palavras-chave: plantas medicinais; *Gochnatia polymorpha*; aberração cromossômica; viabilidade celular; *Allium cepa*.

EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY, MUTAGENICITY AND ANTIMUTAGENICITY EFFECTS OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Gochnatia polymorpha*

ABSTRACT

In Brazil, several plants are used in folk medicine to treat diseases, among them, is the *Gochnatia polymorpha*. This study aimed to evaluate the effect of an ethanolic extract of *Gochnatia polymorpha* (EEGP) on chromosomal aberrations induced by methyl methanesulfonate (MMS) in cultured meristematic cells of *Allium cepa* and also in murine melanoma cells (B16F10) by MTT assay and *Allium cepa*. Quantitative results indicated that the EEGP is cytotoxic to B16F10 cells at concentrations from 1000 to 31.25 µg/mL. Data of *Allium cepa* assay showed that EEGP did not have mutagenic activity at the concentration of 15x10⁻⁶µg/mL, however, it was verified a reduction of 43.90% in damage when EEGP was associated with MMS. EEGP have antiproliferative and cytotoxic activity, indicating chemotherapeutic activity in B16F10 cells. Antimutagenic activity was also noted, which indicates ability to prevent DNA damage.

Keywords: folk medicine; *Gochnatia polymorpha*; cell viability; chromosomal aberration; *Allium cepa*.

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

² Universidade Federal do Paraná

³ Universidade Federal da Grande Dourados

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas para tratar, curar e prevenir doenças, sendo uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade (1,2).

Apesar dos avanços da medicina moderna, as plantas ainda são uma importante forma de tratamento e, portanto, contribui significativamente para a manutenção da saúde, principalmente em países tropicais como o Brasil, onde elas são mais abundantes (3). Porém, para a maioria das plantas medicinais ainda não existem dados suficientes que suportam a sua eficácia e segurança (4) o que indica a necessidade de avaliações por meio de ensaios biológicos.

As plantas da família *Asteraceae* compreende a maior parte das angiospermas, é constituída por aproximadamente 1.535 gêneros e 23.000 espécies e 17 tribos (5,6), dentre suas espécies se encontra *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera, nativa não endêmica do Brasil encontrada nas Florestas da Mata Atlântica, Florestas de Araucárias, Cerrado e Pampas (7,8). Em Mato Grosso do Sul é conhecida como candeias (7,9).

A espécie *Gochnatia polymorpha* é utilizada na medicina popular (5) como remédio natural, em forma de chá, atuando no tratamento de inflamações, gripe, tosse, coqueluche, asma, reumatismo (7,8,10,11), atualmente ainda há descrição da sua atividade antimutagênica (12) e anticarcinogênica (13).

Os compostos extraídos da *Gochnatia polymorpha* foram identificados como triterpene bauerenyl acetate, guaianolide 11,13-dihydrozaluzanin C, e dimeric guaianolides 10-desoxygochnatiolide A, gochnatiolide A, 8-hydroxi-10-desoxygochnatiolide A e 8-hydroxigochnatiolide A (13), porém são poucos os estudos realizados com o extrato e compostos extraídos dessa planta.

Os estudos realizados *in vitro* e *in vivo* têm esclarecido muitos aspectos tanto em nível molecular quanto celular no campo da Genética Toxicológica. Alguns são também capazes de determinar compostos tóxicos ou benéficos aos seres vivos e ao meio ambiente. Outros servem como *screening* indireto de substâncias anticancerígenas (14).

O ensaio de viabilidade celular, descrito por Mosmann (15), baseia-se na capacidade que as mitocôndrias de células vivas possuem de converter o MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], um sal tetrazolium de coloração amarela, em um formazan de coloração roxa. Assim, entende-se que quanto mais roxa for a solução que contenha as células, maior será o número de células vivas. Por outro lado, quanto menor a intensidade roxa da solução, menor será o número de células viáveis.

O ensaio de *Allium cepa* é realizado em raiz de cebola. Há duas opções para o desenvolvimento do ensaio de *Allium cepa*: cultivar as cebolas compradas em mercados em copos (ou béqueres) com água ou cultivar as sementes compradas em casas agropecuárias em pequenos pratos (ou placas de petri) com papel filtro embebidos em água.

Allium cepa é um teste de fácil execução e baixo custo, além de apresentar alterações genéticas bem definidas, cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$), divisão celular rápida e controlável, com elevada sensibilidade e capacidade de responder a mutágenos de maneira similar a mamíferos, com relação de concordância de 80% com testes de carcinogenicidade em roedores (16,17).

Frente ao exposto, o presente estudo objetivou analisar e descrever a atividade citotóxica, mutagênica e antimutagênica do extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha* sobre o DNA da cebola e em células de melanoma murino B16F10, por meio das técnicas do ensaio MTT e *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio Biológicos

Os procedimentos relativos à cultura de células e ao ensaio de aberrações cromossômica em *Allium cepa* foram realizados no Centro de Estudos em Células Troncos, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen). O EEGP foi preparado e cedido pela Profa. Dra. Maria Éilda Stefanello do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Ensaio de Citotoxicidade

A linhagem celular de melanoma murino B10F16 foi cultivada em sistema de monocamada, a 37°C e 5% de CO₂ em incubadora *Thermo Scientific*®, em frascos de cultura de 25cm² contendo 10mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco®) suplementado a 5% com soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de piruvato de sódio (Gibco®).

O meio de cultura de frascos com células em confluência foi descartado. Em seguida os frascos foram lavados 3 vezes com 5mL de solução tampão fosfato (PBS). Acrescentou-se 500µL de tripsina-EDTA (0,025%) e levou-se o frasco à incubadora a 37°C por 1 minuto. A tripsina foi inativada com 3mL de meio de cultura suplementado. As células foram contadas e semeadas na concentração de 2,0 x 10⁴ células/poço em 11 colunas da placa de 96 poços.

O ensaio de MTT foi realizado segundo Mauro et al. (14) com modificações. Para tanto, a cultura foi estabilizada por 24 horas e em seguida as células foram tratadas. A primeira coluna não possuía células, mas recebeu o extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha* na maior concentração e foi considerado o branco. A segunda coluna recebeu só o veículo do agente indutor de danos (PBS) e do extrato (dimetilsulfóxido - DMSO 2%). A terceira coluna foi tratada com Metilmetanosulfonato (MMS) na concentração de 75,2µg/mL. As outras colunas receberam o extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha* (EEGP) nas concentrações 1000, 500, 250, 125, 62,50, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,91µg/mL.

O tratamento das células se deu por 24 horas. Em seguida o meio de cultura, contendo os tratamentos, foi descartado e acrescentou-se 150µL MTT na concentração de 330µg/mL (Brometo de Tetrazólio Azul de Tiazolilo – CAS 298931; Sigma-Aldrich®). As células foram incubadas por 4 horas. Descartou-se o MTT e acrescentou-se 100µL de DMSO. Procedeu-se a leitura da absorbância em Leitora de microplacas Robonic® em filtro de 540nm.

As análises estatísticas foram realizadas por Análise Variância/Tukey (Graph PadPrism® – versão 5; *Graph-Pad Software Inc.*, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p <0,05.

Ensaio de *Allium cepa*

Sementes comerciais de *Allium cepa* (TOP SEED® - garden/ blue line; Lote: 020595) foram colocadas para germinar em temperatura ambiente em placas de Petri, cobertas com papel filtro, e embebidas com 3mL de água destilada ou nos diferentes tratamentos. O experimento teve duração de 120 horas e os protocolos foram desenvolvidos segundo Mauro et al. (15), com modificações: (I) Controle Negativo: as sementes foram cultivadas por 120 horas em solução etanólica a 1,2%; (II) Controle Positivo (MMS): as sementes foram cultivadas nas primeiras 24 horas em água destilada (3mL), e posteriormente transferidas para placas contendo 3mL de uma solução aquosa de MMS, na concentração de 10µg/mL, por um período de 96 horas; (III) Protocolo de Mutagenicidade – Extrato Etanólico de *Gochnatia polymorpha* (EEGP): as sementes foram colocadas para germinar nas primeiras 72 horas em água destilada. Nas 48 horas seguintes as mesmas foram germinadas em EEGP na concentração de 15 x 10⁻⁶µg/mL; (IV) Protocolo de Antimutagenicidade – Simultâneo Simples: Neste tratamento as sementes foram cultivadas em água destilada (3mL) por 72 horas, e transferidas para uma placa de cultivo contendo 1,5mL soluções de MMS e 1,5mL de EEGP, adicionados simultaneamente, por um período de 48 horas.

Para a confecção das lâminas utilizou-se o protocolo de Fernandes et al. (16) com modificações. As raízes foram colhidas ao meio dia e submetidas à solução fixadora (3 ácido acético:1 etanol) por um período mínimo de 6 horas. Procedeu-se a hidrólise ácida para exposição do material genético (HCl 1N à 60°C, por 6 minutos) e corou-se em reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Os meristemas das raízes foram cortados e corados com uma gota de Carmin Acético (2%). Em seguida o material foi recoberto por lamínula e levemente esmagados. Para a confecção de lâminas permanentes toda a lâmina foi mergulhada em nitrogênio líquido para a retirada da lamínula. Posteriormente com um auxílio de resina sintética (*Permout*®) uma nova lamínula foi depositada sobre o material biológico.

Foram analisadas 5.000 células/tratamento (1.000 células/lâmina) em microscopia de luz com aumento de 40 vezes. As células foram subdivididas em intérfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase e dentre

estas quantificou-se o número de alterações cromossômica e a presença de micronúcleos.

A percentagem de redução de danos (RD%), sugerida por Waters et al., (17), foi obtida por meio do seguinte cálculo:

$$RD\% = \left[\frac{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do grupo associado}}{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do controle negativo}} \right] \times 100$$

As análises estatísticas foram realizadas por Análise Variância/Tukey (Graph PadPrism® – versão 5; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise citotóxica

O ensaio de MTT indicou que o metilmetanosulfonato utilizado como controle positivo foi eficiente em matar 92,31% das células em cultura, demonstrando assim atividade citotóxica para a célula de melanoma B16F10 ($p < 0,05$). A concentração mais alta do EEGP (1000µg/mL) foi ainda mais tóxica do que o MMS e determinou morte celular de 98,37% ($p < 0,05$). As concentrações de 500, 250, 125µg/mL também mostram-se citotóxicas para a linhagem B16F10 ($p < 0,05$). Já as concentrações 62,50 e 31,25µg/mL demonstram uma baixa eficiência citotóxica apesar de significativa ($p < 0,05$) e as doses de 15,62, 7,81 e 3,91µg/mL não causaram morte celular ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de absorbância (nm) ± desvio padrão e porcentagem de viabilidade celular das células B16F10 tratadas com extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha*.

Tratamentos	Média ± DP	Índice de Viabilidade celular (%)
Controle	0,1222 ±	100,00
Negativo	0,0342 ^e	
Controle Positivo	0,0094 ± 0,0100 ^b	7,69
EEGP 1000,00	0,0020 ± 0,0015 ^a	1,63
EEGP 500,00	0,0275 ± 0,0126 ^c	22,50
EEGP 250,00	0,0469 ± 0,0204 ^c	38,38

EEGP 125,00	0,0517 ± 0,0382 ^c	42,31
EEGP 62,50	0,0971 ± 0,0476 ^d	79,46
EEGP 31,25	0,1054 ± 0,0230 ^d	86,25
EEGP 15,62	0,1332 ± 0,0309 ^e	109,00
EEGP 7,81	0,1455 ± 0,0371 ^e	119,07
EEGP 3,91	0,1166 ± 0,0160 ^{d,e}	95,42

Legenda: Controle negativo – veículo do agente indutor de danos (PBS) + veículos do extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha* (DMSO 2%); Controle positivo – Metilmetanosulfonato (MMS - 75,2µg/mL); EEGP – Extrato Etanólico de *Gochnatia polymorpha* (1000,00 a 3,91µg/ml). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey).

Constatou-se que o EEGP é citotóxico para células B16F10 nas concentrações entre 1000 e 31,25 µg/mL e que inclusive a dose de 1000µg/mL é mais tóxica do que o próprio MMS, composto utilizado como controle positivo por causar citotoxicidade e mutagenicidade. Considera-se que o EEGP tem potencial quimioterápico e corrobora com Strapasson et al. (13) que relata atividade antiproliferativa para compostos isolados da *Gochnatia polymorpha* ssp. floccosa em células tumorais de rins, melanoma e ovário.

Análise mutagênica e antimutagênica

Sugere-se que compostos que possam causar danos no DNA vegetal também o façam em mamíferos. Sabendo que esses danos podem correlacionar-se ao desenvolvimento do câncer, o ensaio de *Allium cepa* pode ser empregado para *screening* indireto, de substância anticancerígena. Nesse contexto, o teste de *Allium cepa* é adequado para analisar danos mutagênicos por apresentar significativa correlação com os mesmos danos em sistemas testes de mamíferos (4).

A Tabela 2 apresenta os dados referentes aos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade do EEGP em sistema teste de *Allium cepa*. Os resultados demonstram que o EEGP não é mutagênico. Já na avaliação da antimutagenicidade, em protocolo de tratamento simultâneo simples, o EEGP foi eficiente em reduzir em 43,90% a frequência de danos genéticos induzidos pelo MMS.

Tabela 2. Valores médios das alterações nucleares e cromossômicas, tipos de aberrações cromossômicas e porcentagem de redução de danos no DNA de células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com *Gochnatia polymorpha*.

Tratamentos	Aberrações Cromossômicas					Média ± EPM	%RD
	MN	PO	QUE	PER	BRO		
Mutagenicidade							
Controle negativo	5	2	2	1	0	3,33±1,86 ^a	-
Controle positivo	157	16	49	31	3	85,33±8,11 ^c	-
EEGP	3	1	3	3	0	3,33±0,88 ^a	-
Antimutagenicidade							
Simultâneo simples	47	10	17	9	2	49,33±9,13 ^b	43,90

Legenda: Controle negativo – solução etanólica 1,2% (48h); Controle positivo - MMS – solução aquosa de Metilmetanosulfonato - MMS; EEGP – Extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha* - concentração de $15 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$; Tratamento simultâneo simples (48h da associação de EEGP e MMS); MN: micronúcleo; PO: ponte; QUE: quebra; PER: perda; BRO: broto. EPM – Erro Padrão da Média. %RD: Porcentagem de redução de danos. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey).

No ensaio *Allium cepa*, concluiu-se também para o EEGP, o efeito antimutagênico, além de ausência de atividade mutagênica. Reforçam esses achados o estudo de Horn e Vargas (12) que demonstram que o chá de *Gochnatia polymorpha* não é mutagênico e possui atividade antimutagênica no ensaio de *Salmonella/microsoma*.

Allium cepa é um teste de fácil execução e baixo custo, além de apresentar alterações genéticas bem definidas, cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$), divisão celular rápida e controlável, com elevada sensibilidade e capacidade de responder a mutágenos de maneira similar a mamíferos, com relação de concordância de 80% com testes de carcinogenicidade em roedores (3,4). Assim, sugere-se que compostos que possam causar danos no DNA vegetal também o façam em mamíferos. Sabendo que esses danos podem correlacionar-se ao desenvolvimento do câncer, o ensaio de *Allium cepa* pode ser empregado para *screening* indireto, de substância anticancerígena. Nesse contexto, o teste de *Allium cepa* é adequado para analisar danos mutagênicos por apresentar significativa correlação com os mesmos danos em sistemas testes de mamíferos (4).

O ensaio de aberração cromossômica indicou que plantas que causam lesões no DNA têm potencial carcinogênico e que aquelas que possuem a capacidade de diminuir a frequência de lesões genética induzidas por um agente indutor de danos no DNA são as que possuem capacidade quimiopreventiva, ou seja, capacidade de

prevenir lesões no DNA que poderiam levar ao desenvolvimento de tumores. Essa última assertiva é corroborada por Luiz (34) que, firma que na área de mutagênese o potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica, e então se deve observar uma redução das lesões produzidas no DNA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise do material em estudo constatou-se que o extrato da planta *Gochnatia polymorpha* nas concentrações entre 1000 e $31,25 \mu\text{g/mL}$ é citotóxico para células B16F10. Os resultados do sistema teste de *Allium cepa* demonstram que o EEGP, quando testado na concentração de $15 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$ não é mutagênico e na avaliação da antimutagenicidade o EEGP reduziu em 43,90% a frequência de danos genéticos induzidos pelo MMS.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo teve apoio financeiro da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Edital Chamada FUNDECT Nº 5/2011 – PPP – Processo Nº 23/200.702/2012 – Termo de Outorga Nº 0207/12).

Rodrigo Juliano Oliveira.

Endereço para correspondência: Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul,
Cidade Universitária S/N, 79070-900 Campo Grande, MS,
Brazil.

E-mail: rodrigo.oliveira@ufms.br

Recebido em 22/08/2013

Revisado em 02/04/2014

Aceito em 02/05/2014

REFERÊNCIAS

- (1) FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965-981. 1985.
- (2) CRAGG G. M.; NEWMAN D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695. 2013.
- (3) WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION GENEVA. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. n.1, 2000.
- (4) CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. **Brazilian Journal of Medicinal Biology Research**, vol. 33, n. 2, p. 179-189. 2000.
- (5) VERDI, L. G.; BRIGHENTE, M. C.; PIZZOLATTI, M. G. The *Baccharis* genus (Asteraceae): Chemical, economic and biological aspects. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94. 2005.
- (6) CANCELLI, R. R.; EVADT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. Contribuição a Morfologia Polínica da Família Asteraceae Martinov no Rio Grande do SUL- RS. **Pesquisas Botânica**, n.58, p.347-374, 2007.
- (7) CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: **recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa, p. 265 – 269. 1994.
- (8) CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa, p. 274-280. 2003
- (9) LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1998.
- (10) MOREIRA, A. S.; SPITZER, V.; SCHAPOVAL, E. E.; SCHENKEL, E. P. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 638-640. 2000.
- (11) PIORNEDO R. R.; DE SOUZA, P.; STEFANELLO, M. É.; STRAPASSON, R. L.; ZAMPRONIO, A. R.; KASSUYA, C. A. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.1077-1084. 2011.
- (12) HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *salmonella/microsone* assay. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1043-1049. 2008.
- (13) STRAPASSON, R. L. B.; Cervi, A. C.; Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L.; Salvador, M.J.;

Stefanello, M. É. Bioactivity-guided Isolation of Cytotoxic sesquiterpene Lactones of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccose*. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1053-1056. 2012.

(14) BIAZI, B. I.; OGO, F. M.; OLIVEIRA, R. J. Análise mutagênica e antimutagênica do caroteno luteína pelo teste de *Allium cepa*. **Revista Terra e Cultura: cadernos de ensino e pesquisa**, n. 56, p.11-22, 2013.

(15) MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p.55-63. 1983.

(16) FISKESSJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112. 1985.

(17) NIELSEN, M. H.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. **Hereditas**, v. 121, n. 3, p. 249-254. 1994.

(18) MAURO, M. O.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, R. J.; ISHII, P. L.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutation Research**, v. 715, n. 2, p. 7-12. 2011.

(19) MAURO, M. O.; PESARINI, J. R.; MARIN-MORALES, M. A.; MONREAL, M.T.F.D.; MONREAL, A.C.D.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, R. J. Evaluation of antimutagenic activity and mode of action of fructooligosaccharide inulin in meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, (no prelo). 2013.

(20) 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.

(21) WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model

compounds. **Mutation Research**, v. 238, n. 1, p. 57-85. 1990.

(22) LUIZ, R. C. **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro**. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.