

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Efeito do Óleo Essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth e
do seu Componente Majoritário Nerolidol sobre a
estabilidade genômica de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação de Mestrado

Angelo Regis de Moura Sperotto

Porto Alegre

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Efeito do Óleo Essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth e
do seu Componente Majoritário Nerolidol sobre a
estabilidade genômica de *Saccharomyces cerevisiae***

Angelo Regis de Moura Sperotto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi

Porto Alegre

2012

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica desta Universidade, e no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. O projeto foi financiado pelo Instituto Nacional de Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Amazônica (INPeTAm), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Jenifer Saffi, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança depositada em meu trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e, principalmente, pela compreensão em vários momentos difíceis. Obrigado por despertar o interesse científico e a vontade de contribuir com a ciência.

Ao Professor João Antônio Pegas Henriques, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, do apoio científico e financeiro e pelo exemplo de pesquisador comprometido com a fidedignidade na investigação científica.

A Dinara Jaqueline, “a Tia Jaque”, minha co-orientadora que oportunizou a entrada no mundo científico como seu aluno de iniciação científica, proporcionando embasamento teórico e prático de pesquisas biológicas. Por ensinar a enfrentar os desafios decorrentes do meu projeto e da vida, por ser um exemplo de pesquisadora comprometida, pelo companheirismo e amizade.

A Valéria Péres, por me dar a oportunidade de ingressar em seu projeto da *Piper gaudichaudianum* Kunth, pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda nos momentos em que a experiência era fundamental.

As colegas, Diana, Albanin, Valéria, Jaque e Ana Arigony, pelo incentivo, troca de experiências e apoio em todas as ocasiões, inclusive nas “bebemorações”.

Ao bolsista Marcelo, que aderiu ao projeto em andamento e integrou-se com qualidade, sempre disposto a ajudar, pois “força” nunca lhe faltava.

A Nusha, sempre disponível, incentivando e orientando com seus sábios conselhos.

Ao pessoal do Genotox, Mirian, Izabel, Miriana, Márcia e Jaque, oportunizando o suporte necessário no decorrer do projeto e nos momentos de descontração dentro e fora dos laboratórios.

As bolsistas, Bruna Castilhos, Bruna Immich e Larissa Milano que estavam sempre dispostas a ajudar e por tornar o ambiente do laboratório mais alegre.

Aos demais colegas do laboratório 2010, Iuri, Cristiano, Clara, Renata, Fabrício, Micheli, Andréia, André, Tatiana, “as Colombianas”, Fernanda, Kelly e Patrícia, pelas discussões científicas e pelos momentos de descontração.

A Silvia Centeno e Luciano Saucedo, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela amizade, pela ajuda, esclarecimentos e pelas confraternizações.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento, Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto e Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, pela colaboração, orientação e sugestões para o projeto.

Aos funcionários e professores do Departamento de Biofísica, em especial a Iranez, Prof^a. Ana Lígia, Dona Zelma, Jussara, Dona Helena, Prof. Eduardo Diaz, Prof^a. Angélica e Prof^a. Kátia, pelas orientações e por tornar o ambiente agradável e descontraído.

Aos amigos Gabriel Wiegert, Jader Ferrazza, Gustavo Postay, Marlon Pessini, Jorge Sperotto, Jeferson Pannebecker, Rafael Sapiezinski, Eugênio Ascoli, Vinícius Corcione, Eduardo Farina, Roberto Salami, Rafael Beck, Felipe Duarte, Tiago Gubiani, e as minhas amigas Tielle Duarte e Katiúcia Antonow, pela amizade, pelos momentos de lazer, apoio e por estarem (alguns) sempre comigo ao lado do grandioso Internacional.

A toda família do Bloco Magrinho pelos diversos momentos de descontração e festejos.

A Nadia pelo carinho, paciência, por estar sempre ao meu lado, apoiando e encorajando em todos os momentos.

A toda minha família em especial aos meus pais, Mario e Sandra, e minha irmã Nathalia, pela constante demonstração de amor, pela confiança, oportunidade e todo apoio que sempre precisei.

A Deus, pela proteção e alento em todos os momentos.

INDÍCE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
1. Introdução Geral.....	18
1.1. <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth.....	19
1.1.1. Aspectos gerais.....	19
1.1.2. Composição química de extratos de <i>Piper gaudichaudianum</i> e atividades farmacológicas relacionadas.....	20
1.1.2.1. Composição química.....	20
1.1.2.2. Atividades farmacológicas.....	22
1.1.3. Óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i>	24
1.1.3.1. Óleos essenciais: uma visão geral.....	24
1.1.3.2. Características fitoquímicas do óleo essencial de <i>P. gaudichaudianum</i>	25
1.1.3.3. Atividades farmacológicas do óleo essencial de <i>P. gaudichaudianum</i>	26
1.2. Nerolidol componente majoritário do óleo essencial de <i>P. gaudichaudianum</i>	27
2. Vias de Reparo de DNA.....	29
2.1. Reparo por excisão de bases (BER).....	29
2.2. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER).....	31
2.3. Reparo por recombinação homóloga (HR).....	33
2.4. Reparo por recombinação não-homóloga (NHEJ).....	35
2.5. Reparo pós-replicativo (PRR).....	37

2.6. Reparo por síntese de translesão (TLS).....	37
3. Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes.....	39
4. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo.....	41
4.1. Avaliação da Atividade Mutagênica.....	42
4.2. Estudo de mecanismos de reparação de DNA envolvidos na resposta citotóxica.....	44
4.3. Defesas antioxidantes e ensaio de atividade antioxidante em <i>S. cerevisiae</i>	44
OBJETIVOS.....	46
1. Objetivo geral.....	47
1.1. Objetivos Específicos.....	47
CAPÍTULO I.....	48
<i>Piper gaudichaudianum</i> essential oil and its major compound nerolidol induce cytotoxic effects by generating ROS.....	49
DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÕES.....	94
PERSPECTIVAS.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	114
CURRICULUM VITAE.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
6-4PP	6-4- pirimidina pirimidona
ATP	adenosina trifosfato
BER	<i>base excision repair</i> (reparo por excisão de bases)
CAT	catalase
CIM	concentração inibitória mínima
CPD	dímeros de pirimidina ciclobutano
CS	Síndrome de Cockayne
DCFH-DA	2'7'-diclorofluoresceína
DL ₅₀	dose letal mediana
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNA-PKcs	cinase dependente de DNA
DSB	quebras dupla no DNA
ERN	espécies reativas do nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GC/MS	cromatografia gasosa e espectrometria de massa
GC-FID	cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama
GGR	reparo do genoma global no NER
GPX	glutathiona peroxidase
GSH	glutathiona
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HOCL	ácido hipocloroso

HR	<i>homologous recombination</i> (reparo por recombinação homóloga)
IC ₅₀	concentração inibitória em 50%
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NER	<i>nucleotide excision repair</i> (reparo por excisão de nucleotídeos)
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (reparo por recombinação não-homóloga)
NO [•]	óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	superóxido
OH [•]	radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	peroxinitrito
PRR	<i>post-replication repair</i> (reparo pós-replicativo)
RNA	ácido ribonucleico
RPA	<i>replication protein A</i>
sítios AP	sítio apurínico/apirimidínico
SOD	superóxido dismutase
TB	<i>trypan blue</i> (azul de trypan)
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCR	reparo acoplado à transcrição no NER
TLS	<i>translesion synthesis</i> (síntese de translesão)
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
ζ	DNA polimerase zeta
η	DNA polimerase eta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arbusto característico de <i>piper gaudichaudianum</i> kunth.....	20
Figura 2. Estrutura química (E)-Nerolidol.....	27
Figura 3. Modelo de reparo por excisão de bases em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 4. Modelo de reparo por nucleotídeos em células de mamíferos.....	33
Figura 5. Modelo de reparo por recombinação homóloga.....	35
Figura 6. Modelo de reparo por recombinação não homóloga.....	36
Figura 7. Modelo de reparo por síntese de translesão.....	39
Figura 8. Modelo de redução univalente da molécula de oxigênio.....	40
Figura 9. Modelo de detoxificação de ERO pelas enzimas SOD, CAT e GPX.....	41

CAPÍTULO I

Figure 1. GC x GC-TOFMS total ion current chromatogram (TIC) data colour plot of <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil. Detail of a 2D-GC chromatogram from 6.5 to 45 min.....	72
Figure 2. Expansion of a part of the GC x GC contour plot of standard nerolidol. (A) Detail of a 2D-GC chromatogram from 23.5 to 25 min. (B) Spectra of a majority peak in the sample, spectra of an identification peak in the standard and in the NIST library, respectively. The experimental conditions are given in the text.....	73
Figure 3. Survival of <i>S. cerevisiae</i> strains deficient in BER after treatment with <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil (A) and nerolidol (B). In detail, the BY4741 and <i>apn1Δ</i> strains after nerolidol treatment (C). The survival of the parental strain (BY4741 and SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ntg1 and Ntg2.....	74

Figure 4. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in NER after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). The survival of the parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the NER endonucleases Rad1 and Rad10.....75

Figure 5. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in HR and NHEJ after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). In detail, the BY4741, *rad50* Δ and *ku70* Δ strains after nerolidol treatment (C). The survival of the parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the HR protein Rad52 and NHEJ proteins Rad50 and Ku70.....76

Figure 6. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in TLS after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). In detail, the BY4741 and *rev3* Δ strains after nerolidol treatment (C). The survival of the parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the TLS proteins Rev1, Rev3, Rad18 and Rad30.....77

Figure 7. Survival of *S. cerevisiae* quadruple mutant strains deficient in BER, HR, NER and TLS after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). The survival of the parental strain (SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ntg1 and Ntg2, the NER protein Rad1, the HR protein Rad52, the NER endonuclease Rad1 and the TLS protein Rev3.....78

Figure 8. Survival of *S. cerevisiae* single and double mutant strains deficient in superoxide dismutase and/or catalase after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). The survival of the parental strain (SOD) is compared to that of variants defective for the superoxide dismutase proteins Sod1 and Sod2 and the catalase protein Ctt1.....79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table I. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used in this study. BER: base excision repair; NER: nucleotide excision repair; HR: homologous recombination; NHEJ: non-homologous end-joining; TLS: translesion synthesis.....	80
Table II. 56 main volatile components identified in the essential oil of <i>Piper gaudichaudianum</i> leaves using GC x GC-TOFMS.....	81
Table III. Reversion of point mutation for (<i>his1-7</i>), ochre allele (<i>lys1-1</i>), and frameshift mutations (<i>hom3-10</i>) in haploid XV185-14c strain of <i>S. cerevisiae</i> after <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil treatment at 30°C for 18 h.....	83
Table IV. Reversion of point mutation for (<i>his1-7</i>), ochre allele (<i>lys1-1</i>), and frameshift mutations (<i>hom3-10</i>) in haploid XV185-14c strain of <i>S. cerevisiae</i> after nerolidol treatment at 30°C for 18 h.....	84
Table V. Induction of forward mutation (<i>CANI</i>) in N123 strain of <i>S. cerevisiae</i> after <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil treatment at 30°C for 18 h.....	85
Table VI. Induction of forward mutation (<i>CANI</i>) in N123 strain of <i>S. cerevisiae</i> after nerolidol treatment at 30°C for 18 h.....	86
Table VII. Effects of <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil and nerolidol on the ROS production in SOD strains.....	87

RESUMO

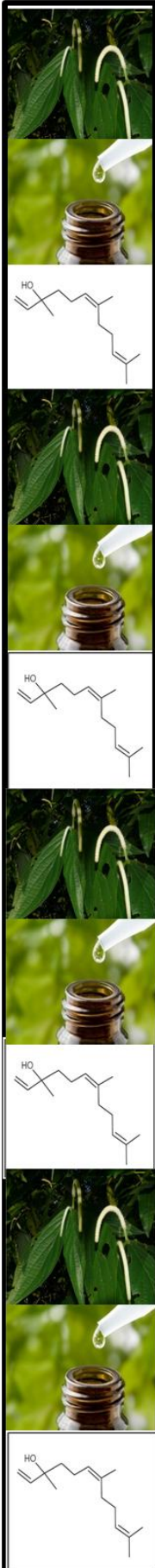
Piper gaudichaudianum Kunth é uma planta da família Piperaceae, que se desenvolve abundantemente em toda a Mata Atlântica, sendo popularmente conhecida como pariparoba, jaborandi ou iaborandi. Na medicina popular suas raízes frescas são mastigadas e utilizadas como anti-inflamatório no alívio de dores de dente e contra distúrbios hepáticos. Um dos componentes mais estudados desta planta é o óleo essencial, cujas análises fitoquímicas revelaram o (E)-nerolidol como um dos compostos majoritários. No presente estudo, foram avaliadas as propriedades citotóxicas e mutagênicas, bem como investigados os mecanismos de citotoxicidade do óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e de seu componente majoritário nerolidol, utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Foram empregadas linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em genes de reparo para excisão de bases (BER), excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR), recombinação não-homóloga (NHEJ), reparo pós-replicativo (PRR) e síntese translesão (TLS). A influência do sistema redox foi avaliada em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em superóxido dismutase e/ou catalase. Os resultados dos tratamentos das linhagens XV185-14c e N123 de *S. cerevisiae* demonstram que, tanto o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, quanto o nerolidol induzem citotoxicidade de maneira dose dependente, sendo essa citotoxicidade mais pronunciada nos tratamentos com nerolidol. Nas avaliações de mutagênese o óleo essencial induziu efeito mutagênico na linhagem XV185-14c na concentração mais alta, entretanto o nerolidol não induziu qualquer tipo de efeito mutagênico. Os ensaios com as linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em reparo revelaram um importante papel da via BER no efeito citotóxico, tanto para os tratamentos com óleo essencial, o qual induziu uma grande sensibilidade na linhagem deficiente na DNA glicosilase Ntg2, quanto para o nerolidol, que induziu sensibilidade nas mutantes para a endonuclease Apn1 e glicosilase Ntg1. Curiosamente, linhagens deficientes em TLS e PRR não apresentaram sensibilidade aos tratamentos com o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, entretanto os simples mutantes *rev1Δ*, *rad30Δ* e *rad18Δ* demonstraram notável resistência ao nerolidol. Além disso, verificou-se em linhagens deficientes na enzima superóxido dismutase (*sod1Δ* e *sod2Δ*) um aumento de sensibilidade nos tratamentos com o óleo essencial e com o nerolidol. No ensaio de detecção de radicais livres, por 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA),

verificou-se que ambos tratamentos induzem aumento de espécies reativas de oxigênio. Considerando a resposta das diferentes linhagens de *S. cerevisie* utilizadas neste estudo, o conjunto destes resultados leva-nos a sugerir que tanto o óleo essencial quanto o nerolidol não são mutagênicos e que a citotoxicidade induzida pelo óleo essencial está relacionada com a formação de lesões oxidativas, sendo o nerolidol o principal responsável pelos efeitos biológicos induzidos pelo óleo essencial de *P. gaudichaudianum*.

ABSTRACT

Piper gaudichaudianum Kunth is a plant of the Piperaceae family, which develops abundantly throughout the Atlantic Forest, popularly known as pariparoba, jaborandi or iaborandi. In popular medicine the fresh roots are chewed and used as anti-inflammatory to relief of toothaches, and against liver disorders. One of the most studied components of the plant is the essential oil, which the phytochemical analysis revealed (E)-nerolidol as major compound. In the present study, we have evaluated the cytotoxicity and mutagenicity, as well as investigated the mechanism of cytotoxicity of essential oil of *P. gaudichaudianum* and its major component nerolidol using different strains *S. cerevisiae*. Strains deficient in DNA repair mechanisms such as base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ), post-replication repair (PRR) and translesion synthesis (TLS) were employed. The influence of the redox system was evaluated in superoxide dismutase and/or catalase defective strains. The results of treatment of XV185-14 and N123 *S. cerevisiae* strains demonstrated that the essential oil and nerolidol induced cytotoxicity in a dose dependent manner, and this cytotoxicity is more pronounced with nerolidol treatments. In the mutagenicity assay only *P. gaudichaudianum* essential oil, but not nerolidol was able to induce mutagenic effect at highest concentration in XV185-14c strain. Employing *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in DNA repair treated with *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol, it was observed an important role of the BER pathway in the cytotoxic response, since the essential oil induced a great sensitivity in strain deficient in DNA glycosylase Ntg2, and nerolidol in mutants deficient in Apn1 endonuclease and glycosylase Ntg1. Interestingly, deletion of TLS and PRR proteins had no influence on sensitivity to the essential oil, however single mutants *rev1Δ*, *rad30Δ* and *rad18Δ* exhibited a remarkable resistance to nerolidol. Besides, the absence of superoxide dismutase enzyme increases the sensitivity to essential oil and nerolidol. In the 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH-DA) assay for detection of free radical generation, both treatments were able to increase ROS production. Considering the response of the different *S. cerevisiae* strains used in this study, our results demonstrate that *P. gaudichaudianum* essential oil and its major compound nerolidol are not mutagenic but do induce significant cytotoxic effects in *S. cerevisiae* that might be

related to ROS generation. The cytotoxicity observed is mainly related to the generation of oxidative lesions. Moreover, nerolidol is the major compound responsible for the biological effects induced by *P. gaudichaudianum* essential oil.



INTRODUÇÃO

1. Introdução Geral

As plantas medicinais são empregadas desde as antigas civilizações para curar as enfermidades e aliviar a dor. Nos últimos tempos, vem aumentando a utilização de plantas ou seus derivados como alternativa na busca do alívio de alguma sintomatologia, o que vem acompanhado do crescente comércio internacional de plantas medicinais e do grande interesse mundial em países que possuam uma flora que possa ser explorada (Shu, 1998; Licciardi e Underwoo, 2011; Nadembega *et al.*, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80 % da população mundial utiliza plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. No entanto, da grande biodiversidade que há no mundo, muitas espécies são usadas empiricamente sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas (Wangchuk *et al.*, 2011).

O Brasil representa um dos maiores centros com potencial na exploração de plantas medicinais por possuir uma flora exuberante, com mais de 55.000 espécies catalogadas, correspondendo aproximadamente 20% da diversidade biológica do planeta (Calixto, 2000). A utilização de plantas medicinais no Brasil originou-se da cultura de diversos grupos indígenas, bem como da colonização portuguesa e africana (Simões *et al.*, 2003). Foi a partir dos colonizadores que o conhecimento e identificação das plantas medicinais tiveram início, obtido, especialmente, pelo uso tradicional (ou etnofarmacologia), e assim permitindo o planejamento de pesquisas de novos fármacos a partir do conhecimento empírico já existente (Yunes e Calixto, 2001; Jeyaprakas *et al.*, 2011).

Apesar da grande biodiversidade a disposição, e do pouco conhecimento ainda disponível do ponto de vista botânico, químico e farmacológico, se faz necessário um incremento de investimentos na pesquisa para identificação e caracterização de novas drogas. Ações são imprescindíveis para a legalização das normas de uso e registro de fitoterápicos, a fim de evitar o uso indiscriminado pela medicina popular, que vem promovendo a redução drástica das populações naturais de algumas espécies (Viegas Jr *et al.*, 2006)

1.1. *Piper gaudichaudianum* Kunth

1.1.1. Aspectos gerais

A família Piperaceae compreende aproximadamente três mil espécies distribuídas em oito gêneros, dos quais se destacam os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*. São plantas de ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Argentina, no Paraguai e nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. No Brasil, existem aproximadamente 460 espécies de cinco gêneros, muitas delas extremamente comuns na Mata Atlântica, onde ocorrem em abundância e diversidade (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002). Este grande número de espécies caracteriza-se pelo uso medicinal popular e pela importância econômica e comercial, devido à produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, indústria farmacêutica e também pela indústria de inseticidas (Silva e Machado, 1999; Puhl *et al.*, 2011).

As plantas desta família caracterizam-se por apresentar espécies arbustivas, eretas ou escandentes, arvoretas, ou plantas herbáceas epifíticas, terrestres ou suculentas com caule nodoso, folhas pecioladas ou raramente sub-sésseis, e estípulas adnatas ao pecíolo ou ausentes (Albiero *et al.*, 2005).

O gênero *Piper* é o mais estudado e conhecido do ponto de vista químico, do qual se destacam espécies como a pimenta, *Piper nigrum*, e espécies medicinais de ampla utilização, como a *Piper betle*, *Piper longum*, *Piper angustifolium*, *Piper methysticum*, assim como outras de grande importância em sistemas tradicionais de medicina, como a chinesa e ayurvédica (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002). Investigações fitoquímicas realizadas com espécies do gênero *Piper* têm conduzido ao isolamento de várias classes de compostos ativos, tais como: amidas, alcalóides, profenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, dihidrochalconas, flavonas e flavononas (Parmar *et al.*, 1997; Puhl *et al.*, 2011).

Piper gaudichaudianum Kunth (Figura 1) é uma planta da família Piperaceae, que se desenvolve abundantemente em toda a Mata Atlântica, sendo conhecida como “pariparoba” no Sul do Brasil e “jaborandi ou iaborandi” nas outras partes do Brasil (Di Stiasi, 1987; Péres *et al.*, 2006a; Péres *et al.*, 2009). É um arbusto de pequeno porte, com folhas curto-pecioladas, membranáceas, um pouco ásperas, acuminadas no ápice, assimétricas na base, com inflorescência tipo espiga, levemente curvadas, chegando a

alcançar 8 cm de comprimento (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002). É encontrada em bordas de florestas e em clareiras produzidas pela queda de árvores (Guimarães e Valente, 2001).



Figura 1. Arbusto característico de *P. gaudichaudianum*. (Imagem do Laboratório de Palinologia da ULBRA).

Trata-se de uma espécie amplamente coletada para comercialização como adulteração do jaborandi verdadeiro, pois apresenta grande semelhança morfológica (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002). Floresce durante todo o ano e frutifica em janeiro, março, agosto e de outubro a dezembro (Bardelli *et al.*, 2008). Seus frutos são fonte de alimento para morcegos que promovem uma ampla distribuição das suas sementes, associado com a rusticidade da espécie, o que possibilita seu aproveitamento em projetos de restauração de ambientes, e assim tornando-a uma das espécies mais encontradas na Mata Atlântica (Teixeira, 2003).

Na região da Mata Atlântica, tanto a infusão das folhas, como as folhas frescas são utilizadas para aliviar a dor de dente, ao passo que as raízes frescas são mastigadas como anti-inflamatório e contra distúrbios hepáticos (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002).

1.1.2. Composição química de extratos de *Piper gaudichaudianum* e atividades farmacológicas relacionadas

1.1.2.1. Composição química

Os estudos referentes aos extratos fitoquímicos da *P. gaudichaudianum* tem mostrado uma grande diversidade de metabólitos com marcantes atividades biológicas. Neste contexto Rorig *et al.*, (1991) identificaram a presença de flavonóides (traços),

triterpenos e alcalóides, falso-positivo para saponinas em ensaio de espumas, e negativo para hemólise na pesquisa fitoquímica das folhas coletadas no Rio Grande do Sul (Sapiranga-RS). No estudo realizado por Stipp (2000), que permitiu a caracterização qualitativa dos componentes presentes nas folhas coletadas em Sete Barras-SP, foram encontrados os seguintes metabólitos secundários: catequinas, esteróides, flavonas, flavonóides, saponinas, taninos catéquicos, triterpenos pentacíclicos e xantonas.

Nos ensaios de Moreira *et al.*, (2001) foram isoladas folhas de *P. gaudichaudianum* duas misturas diferentes: um extrato hexânico no qual encontraram fitosteróides (β -sitosterol e estigmasterol) e um extrato metanólico onde foram identificadas chalconas (2',6'-dimetoxi-4'-hidroxichalcona e 2',6'-dimetoxi-4'-hidroxi-diidrochalcona). Teixeira (2003) nos seus experimentos identificou os componentes voláteis em doze amostras diferentes de frutos de *P. gaudichaudianum*, sendo seis destas extraídas pelo método de aeração: frutos imaturos coletados pela manhã (majoritários: 31% de β -cariofileno e 9,11% de sabineno), frutos imaturos coletados pela tarde (majoritários: 21,07% de sabineno e 20,87 de β -cariofileno), frutos imaturos coletados pela noite (majoritários: 21,44 de β -cariofileno e 16,24% de sabineno), frutos maduros coletados pela manhã (majoritários: 11,06% de sabineno e 8,69% de *trans*-Hidrato do sabineno), frutos maduros coletados pela tarde (majoritários: 12,75% de sabineno e 12,62% de α -humuleno), e frutos maduros coletados pela noite (majoritários: 3,83% de sabineno e 2,97% de aromadendreno). As outras seis amostras avaliadas foram extraídas pelo método de hidrodestilação: frutos imaturos coletados pela manhã (majoritários: 15,43% de β -cariofileno e 10,45% de α -humuleno), frutos imaturos coletados pela tarde (majoritários: 14,68% de fenchona e 13,91% de (*E*)-nerolidol), frutos imaturos coletados pela noite (majoritários: 17,26% de fenchona e 11,45% de (*E*)-nerolidol), frutos maduros coletados pela manhã majoritários: 10,76% de β -cariofileno e 2,79% de α -humuleno), frutos maduros coletados pela tarde (majoritários: 15,74% de β -cariofileno e 10,67% de α -humuleno), e frutos maduros coletados pela noite (majoritários: 10,80% de α -humuleno e 8,38% de linalol).

Dando continuidade nos seus experimentos Teixeira (2003) analisou os constituintes não voláteis, onde foram identificados cinco componentes: 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina), 2,2-dimetil-6-carboxicromeno-4-ona 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida, (*E*)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilibol B) e 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metil. Sendo esta a primeira descrição

da ocorrência natural do composto 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida. No isolamento de compostos presentes nas folhas de *P. gaudichaudianum*, coletadas em São Paulo-SP foram identificados os compostos isolados 2 cromenos: ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2*H*-1-benzopirano-6-carboxílico denominado de “ácido gaudichaudianum” e o 2,2-dimetil-2*H*-1-benzopirano-6-carboxilato de metila), 3 ácidos benzóicos prenilados (ácido 4-metóxi-3-(3',7'-dimetilocta-2'-*E*-6'-dienil) benzóico, ácido 4-hidróxi-3-(3',7'-dimetilocta-2'-*E*-6'-dienil) benzóico, 4-hidróxi-3-(3'-metil-1'-oxo-2'-butenil) benzoato de metila denominado taboganato de metila e a pinocebrina (Lago *et al.*, 2004).

Péres em 2006 realizou um estudo da composição das folhas e inflorescências de *P. gaudichaudianum*. Os componentes majoritários identificados nas flores foram o α -humuleno (23,05%), β -cariofileno (10,40%) e o β -pineno (7,00%). Nas folhas foram identificados o (*E*)-nerolidol (38,13%), α -humuleno (18,00%) e β -cariofileno (8,24%). Posteriormente, foi quantificada uma série de compostos de dois extratos com polaridades diferentes, o éter de petróleo e o etanólico. Os compostos identificados e quantificados nos dois extratos foram o (*E*)-nerolidol, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido 9,12,15-octadecatrienóico, fitol, ácido esteárico, ácido lignocérico, esqualeno, vitamina E, estigmasterol e β -sitosterol (Péres *et al.*, 2006a; 2006b).

Dos galhos e folhas de *P. gaudichaudianum* foram isolados uma série de cromenos, entre eles estão o ácido 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxílico, 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila, 8-hidróxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila e o 2,2-dimetil-8-(3'-metilbut-2'-enil)-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila, além do ácido gaudichaudianum, previamente descrito (Batista *et al.*, 2008).

1.1.2.2. Atividades farmacológicas

O uso tradicional da *P. gaudichaudianum* é fundamentalmente como antiinflamatório e analgésico. Entretanto, estudos com o extrato aquoso para avaliação de atividade analgésica (1000 mg Kg⁻¹ de sólidos totais, via oral em camundongos), pelo modelo de contorções abdominais induzidas por peróxido de benzoila, não revelaram um efeito promissor. O extrato diminuiu a frequência das contorções em alguns dos intervalos testados, entretanto, não ficou definido qual o período crítico para a caracterização da melhor atividade analgésica. Além disso, os efeitos observados foram de curta duração,

sendo que não houve atividade analgésica detectada no teste de imersão de cauda (Di Stiasi, 1987).

Ainda no sentido de verificar o efeito analgésico foi testado um extrato hidrometanólico (70%). No modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,8% (i.p. – 10ml Kg⁻¹) o extrato foi ativo (1000 mg Kg⁻¹, via oral), entretanto, apresentou-se inativo no modelo de imersão da cauda em água aquecida à 50 ± 1 °C. O extrato diminuiu o número de contorções abdominais em 23, 20 e 22%, respectivamente ao tempo de 30, 60 e 90 minutos após administração. Dessa forma, pode-se dizer que o extrato hidrometanólico das folhas de *P. gaudichaudianum* possui atividade analgésica comparável ao uso de analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais. Neste mesmo estudo, o extrato apresentou-se inativo na avaliação da atividade antiulcerogênica, utilizando modelo de indução de úlcera por etanol absoluto e por indometacina. A toxicidade aguda e o cálculo da DL₅₀, do referido extrato não puderam ser determinadas, já que não ocorreu nenhuma morte entre os animais tratados. Observou-se que o extrato reduziu a atividade motora (dose 1620 mg Kg⁻¹, via oral) 1 hora após o tratamento. Com a administração de 2916 e 5249 mg Kg⁻¹ (via oral), a redução da atividade foi intensificada persistindo até a terceira hora de observação. Verificou-se uma sedação evidente na dose de 5249 mg Kg⁻¹ (via oral) aos 30 minutos, persistindo até a terceira hora (Stipp, 2000).

A atividade antiinflamatória dos extratos hexânico e metanólico das folhas de *P. gaudichaudianum* (100 mg Kg⁻¹ – via oral) foi demonstrada, pelo teste de inibição do corante azul de Evans (1%), para a cavidade peritoneal. Neste estudo, foi feito o isolamento da porção ativa do extrato hexânico, constituída dos fitosteróis estigmasterol e β-sitosterol, e da porção ativa do extrato metanólico decorrente de chalconas (Moreira *et al.*, 2001). Péres (2006) demonstrou atividade antiinflamatória de um extrato etanólico a 70% das partes aéreas de *P. gaudichaudianum*, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina (350 mg Kg⁻¹, i.p.). O extrato hidroalcoólico apresentou uma inibição da inflamação de 72% na terceira hora após administração da carragenina.

Em uma análise dos extratos das folhas de *P. gaudichaudianum* Pulh *et al.*, (2011) testaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto, o qual apresentou uma boa atividade contra *Bacillus subtilis* e *Candida tropicalis* (concentração inibitória mínima (CIM)=62,5 µg ml⁻¹), uma atividade moderada contra *Staphylococcus aureus* (CIM=250 µg ml⁻¹), e uma atividade fraca contra *Trichophyton rubrum* (CIM=1.000 µg ml⁻¹). A fração hexânica mostrou boa atividade contra *C. tropicalis* (CIM=62,5µg ml⁻¹) e atividade moderada

contra *T. rubrum* (CIM=500 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A fração diclorometano-acetato de etila (95:5) mostrou boa atividade contra *B. subtilis* (CIM=15,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$), *S. aureus* (CIM=62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e *C. tropicalis* (CIM=62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), mas atividade moderada contra *T. rubrum* (CIM=250 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A fração diclorometano-acetato de etila (50:50) mostrou boa atividade contra *B. subtilis* (CIM=31,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$), atividade moderada contra *S. aureus* (CIM=125 $\mu\text{g ml}^{-1}$), *C. tropicalis* (CIM=250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e *T. rubrum* (CIM=500 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A fração acetato de etila mostrou atividade moderada contra *C. tropicalis* (CIM=500 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Desta forma, pode-se afirmar que, de um modo geral, os extratos de *P. gaudichaudianum* apresentam atividade analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana.

1.1.3. Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum*

1.1.3.1. Óleos essenciais: uma visão geral

Os óleos essenciais são produtos naturais, obtidos a partir do metabolismo secundário das plantas. São compostos complexos, com baixo peso molecular, caracterizam-se por apresentar odor forte, por serem voláteis e são usualmente designados como compostos aromáticos. São obtidos de diferentes partes da planta, como flores, brotos, galhos, folhas, sementes e frutos, geralmente extraídos das partes da planta pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, também conhecida por hidrodestilação. São também chamados de óleos voláteis, etéreos ou essências (Bakkali *et al.*, 2008; Noorizadeh *et al.*, 2011).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de provocar variações significativas (Simões *et al.*, 2003; Prins, *et al.*, 2010). A insolação, a relação temperatura, umidade do ar e o tipo de solo, especialmente no que diz respeito à disponibilidade de água pelas plantas, são fatores edafoclimáticos que mais afetam a produção dos óleos essenciais (Da Cunha *et al.*, 2005). Na grande maioria, são constituídos de substâncias terpênicas (monoterpenos e sesquiterpenos), e freqüentemente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (Angnes, 2005). A época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal

também podem ter influência sobre a composição e teor em óleo volátil (Silva *et al.*, 2003).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo seu apetite por essas plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (Bakkali *et al.*, 2008; Noorizade *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais já fazem parte do nosso cotidiano há muitos anos, principalmente nas indústrias alimentícia, agrônômica, sanitária, cosméticas, de perfumes e nas indústrias farmacêuticas, como substâncias com atividade carminativa, antimicrobiana, inseticida, analgésica e antiinflamatória, entre outras (Prins *et al.*, 2010; Noorizade *et al.*, 2011).

1.1.3.2. Características fitoquímicas do óleo essencial de *P. gaudichaudianum*

Sendo o óleo essencial das folhas nosso objeto de estudo, verificamos que as análises da composição fitoquímica do óleo essencial de *P. gaudichaudianum* descrevem os terpenos como principais componentes. Rorig *et al.*, (1991) identificou por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (GC/MS), com rendimento de 0,30%, como principais constituintes do óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum*, os compostos d-Limoneno, citral A, citral B, geraniol, linalol β -cariofileno e para-cimeno. Em outro estudo com o óleo essencial das folhas coletadas na mesma região da amostra do trabalho anterior, apresentando o mesmo rendimento, foi determinada a presença de 12% de monoterpenos, sendo os principais o β -pineno e o linalol, e 85% de sesquiterpenos, especialmente o α -humuleno (37,5%) e o β -cariofileno (17,45 %) (Poser *et al.*, 1994).

Andrade *et al.*, (1998) analisaram duas amostras do óleo essencial de partes aéreas de *P. gaudichaudianum*. A primeira (A) amostra obteve rendimento de 0,8% e a segunda amostra (B) rendimento de 0,6% na produção de óleo essencial. Os constituintes majoritários em ambas as amostras foram β -cariofileno (A:12,1%; B:19,3%), α -humuleno (A:13,3%; B:29,2%), β -selineno (A:15,7%; B:3,7%) e α -selineno (A:16,6%; B:8,9%). Destacou-se a presença do benzoato de benzila na amostra B, único representante da classe dos arilpropanóides presente no óleo essencial.

De Moraes *et al.*, (2007) realizaram uma pesquisa de óleos essenciais de algumas plantas do gênero *Piper* com potencial larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*. Nesse trabalho, extraíram e analisaram o óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum*, onde os componentes majoritários foram viridiflorol (27,50%), aromadendreno (15,55%), β -selineno (10,50%) e selin-11-em-alfa-ol (8,48%).

Nos estudos com o óleo essencial das folhas, utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) e GC/MS, identificou-se 87,6% de sesquiterpenos, sendo os principais (E)-nerolidol (22,4%), α -humuleno (16,5%), (E)-cariofileno (8,9%) e biciclogermacreno (7,4%) (Péres *et al.*, 2009).

1.1.3.3. Atividades farmacológicas do óleo essencial de *P. gaudichaudianum*

O óleo essencial das folhas *P. gaudichaudianum* é tradicionalmente utilizado para aliviar a dor de dentes. Entre as atividades biológicas descritas para o óleo inclui-se a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* ($IC_{50} = 121 \mu\text{g mL}^{-1}$) (De Moraes *et al.*, 2007). Neste estudo, a atividade foi considerada baixa em relação aos outros óleos essenciais testados, ricos em fenilpropanóides. Também foi demonstrado que o óleo essencial apresenta uma alta atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (CIM) = 62.5 mg mL⁻¹) e *Candida krusei* (CIM = 31.25 mg mL⁻¹) (Morandim-Giannett *et al.*, 2010).

Nos estudos de Péres *et al.*, (2009) investigou-se o efeito tóxico, mutagênico e genotóxico do óleo essencial utilizando células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79). Os tratamentos das células foram realizados com o óleo essencial nas concentrações de 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 e 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e através do ensaio colorimétrico com MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), de exclusão com azul de Trypan (TB) e sobrevivência clonogênica, verificou que o óleo essencial induziu citotoxicidade dose dependente ($IC_{50} = 4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Houve indução de danos no DNA pelo ensaio cometa alcalino (analisa quebras de cadeia simples, cadeia dupla do DNA e sítios álcali-labeis), a partir da dose de, 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ao contrário, no cometa neutro (analisa somente quebras duplas no DNA) não houve indução de danos. No teste de micronúcleo foi verificada indução significativa de danos no DNA a partir da concentração de 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) detectou-se um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio a partir da concentração de 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir dos dados obtidos na literatura, as principais atividades descritas para o óleo essencial das folhas *P. gaudichaudianum* compreendem: atividade larvicida moderada, antifúngica, citotóxica em células V79, indução de danos na cadeia simples do DNA e um efeito pró-oxidante.

1.2. Nerolidol componente majoritário do óleo essencial de *P. gaudichaudianum*

O nerolidol (Figura 2) é o principal componente do óleo essencial utilizado neste estudo, extraído a partir das folhas da *P. gaudichaudianum* (Péres *et al.*, 2006 e 2009). É um sesquiterpeno natural, encontrado nos óleos essenciais de muitos tipos de plantas. Foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como agente aromatizante de alimentos, e tem um amplo uso na indústria de cosméticos, sendo um componente importante na fixação de aromas, podendo ser encontrado nas fragrâncias de perfumes, sabonetes, xampus e artigos de higiene, bem como em produtos não cosméticos, como produtos de limpeza e detergentes. O nerolidol, atualmente, vem sendo utilizado em testes de penetração da pele como um potenciador transdérmico de medicamentos (Lapczynski *et al.*, 2008).

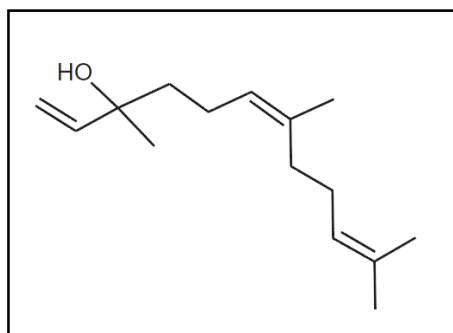


Figura 2. Estrutura química (E)-Nerolidol (Lapczynski *et al.*, 2008).

Brehm-Stecher e Johnson, em 2003, verificaram a atividade inibitória do nerolidol para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por meio de ensaios de difusão em disco, e confirmaram que o nerolidol é um bom potenciador de permeabilidade bacteriana para antimicrobianos. Lee *et al.*, (2007) estudaram a atividade antifúngica do nerolidol em porcos infectados com *Microsporium gypseum* e analisaram por CIM a lesão de pele, cultura de cabelo e exame histopatológico dos tecidos. Com base nos CIMs o nerolidol foi clinicamente eficaz nas melhoras das lesões. Também foi confirmado através de ensaios *in vitro* que na dose de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ o nerolidol inibe em 100% o crescimento

do trofozoíto esquizonte, sendo considerado um componente promissor contra o parasita da malária *Plasmodium falciparum* (Lopes *et al.*, 1999).

Arruda *et al.*, (2005) testaram o efeito antileishmania do nerolidol *in vitro* para o tratamento da forma promastigota da *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, e *Leishmania chagasi*, e da forma amastigota da *Leishmania amazonensis*. Os resultados mostraram que o nerolidol nas concentrações de 67, 74, 75 e 85 μM apresentou atividade inibitória de 50%, tanto na forma promastigota como na amastigota, e nos tratamentos com macrófagos infestados com *L. amazonensis* o nerolidol apresentou uma redução na infecção de 95% na dose de 100 μM . Nos estudos de Klopell *et al.*, (2007) verificaram a atividade antiulcerogênica do nerolidol em ratos, através da indução de lesões gástricas agudas por etanol, indometacina e por estresse. Após a indução das lesões gástricas, os ratos foram tratados com nerolidol em doses de 50, 250 e 500 mg Kg^{-1} , e foi observado que o nerolidol apresentou atividade antiulcerogênica significativa nas 3 doses, tanto nas úlceras induzidas por indometacina quanto na por estresse, e nas lesões induzidas por etanol foi significativo as doses de 250 e 500 mg Kg^{-1} .

A citotoxicidade do nerolidol no parasita unicelular *Trypanossoma brucei*, causador da doença do sono ou tripanossomíase africana, foi demonstrada *in vitro* na dose de 1,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Hoet *et al.*, 2006). Este composto também apresentou excelente atividade antiinflamatória nos estudos realizados pela determinação do óxido nítrico e das prostaglandinas E2 em macrófagos (RAW 264.7) (Tung *et al.*, 2008).

São poucos os estudos disponíveis na literatura com relação aos efeitos do nerolidol sobre a estabilidade genômica. O potencial genotóxico do nerolidol foi avaliado nas concentrações de 250, 500 e 2000 mg kg^{-1} , pela indução de dano no DNA utilizando o ensaio cometa em sangue periférico em células de fígado de ratos e através do ensaio de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea de ratos. Os resultados do ensaio cometa mostraram que o nerolidol não induziu dano no DNA, tanto em sangue periférico em células de fígado, quanto eritrócitos de medula óssea, mas apresentou um aumento significativo de micronúcleos nas doses de 500 e 2000 mg kg^{-1} (Pículo *et al.*, 2010). Nos ensaios de atividade mutagênica pelo teste *Salmonella*/microsoma (Teste de Ames, utilizando as linhagens TA98 e TA100), o nerolidol não foi mutagênico nas concentrações testadas de 14, 28, 56, 111 e 222 $\mu\text{g/placa}$ (Gonçalves *et al.*, 2011).

Com base nos dados disponíveis na literatura e relatados acima, pode-se concluir que o nerolidol apresenta atividade de potenciador de permeabilidade bacteriana para

antimicrobianos, atividade antifúngica, antileishmania, antiulcerogênica, antiinflamatória e antiparasitária.

2. Vias de Reparo de DNA

Durante a evolução, os organismos têm sido expostos a vários estresses provenientes do metabolismo celular e do meio ambiente. Entre os principais agentes endógenos pode-se citar os radicais livres, derivados do metabolismo do oxigênio, que são capazes de oxidar bases, gerar sítios apurínicos/apirimídicos e quebras de DNA (Kupiec *et al.*, 2004). Além desses, os agentes exógenos são grandes indutores de danos do DNA, entre eles a radiação ionizante, que gera quebras duplas no DNA e diversos agentes químicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (presentes na fumaça do cigarro) e as lesões formadas por ligações cruzadas (crosslinks) induzidas por agentes quimioterápicos. Para eliminar esses danos induzidos no DNA e garantir a sobrevivência da espécie, as células de cada organismo precisaram se capacitar de sistemas de reparação bastante eficazes (Hoeijmakers, 2001; Prasad *et al.*, 2011; Pankaj *et al.*, 2011).

Os danos no DNA, quando não reparados, podem desencadear graves problemas como morte celular em organismos unicelulares e cânceres em organismos multicelulares. Várias doenças humanas estão relacionadas com a não reparação do dano ao DNA, entre elas pode-se citar: Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom, Síndrome de Werner, câncer de cólon não poliposo hereditário, *Xeroderma pigmentosum* (XP), entre outras. Devido à grande diversidade de lesões existentes, diferentes sistemas enzimáticos e geneticamente controlados deram origem aos sistemas de reparo de DNA, que pode ser classificado em: reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR) e não-homóloga (NHEJ), reparo pós-replicativo (PRR) e síntese translesão (TLS) (Jeppesen *et al.*, 2011; Reed, 2011).

2.1. Reparo por excisão de bases (BER)

O reparo por excisão de bases é um processo de reparação multienzimático, que é requisitado quando uma única base do DNA é modificada. É ativado quando há um dano gerado por agentes alquilantes, radiações ionizantes, metabolismo normal oxidativo da célula e quando uma base errônea é incorporada durante replicação e reparo (Boiteux e Guillet, 2004; Almeida e Sobol, 2007; Prasad *et al.*, 2011).

No BER as bases modificadas são reconhecidas e excisadas por uma enzima DNA glicosilase específica, a qual origina um sítio apurínico/apirimidínico (sítios AP). Estes sítios AP são processados por uma AP-endonuclease, levando a interrupções de cadeia simples, que são então preenchidas por uma DNA polimerase, em uma via curta (*short patch* BER), preenchendo um trecho de apenas um nucleotídeo, ou uma via longa (*long patch* BER), que substitui de 2 a 13 nucleotídeos. A escolha de uma das vias é geralmente determinada pela natureza da DNA glicosilase e do sítio AP resultante, mas também pode depender do momento do ciclo celular e da localização sub-nuclear do processo. Por fim, as extremidades da fita de DNA são seladas pela DNA ligase (Figura 3) (Boiteaux e Guiller, 2004; Almeida e Sobol, 2007; Wilson III *et al.*, 2011).

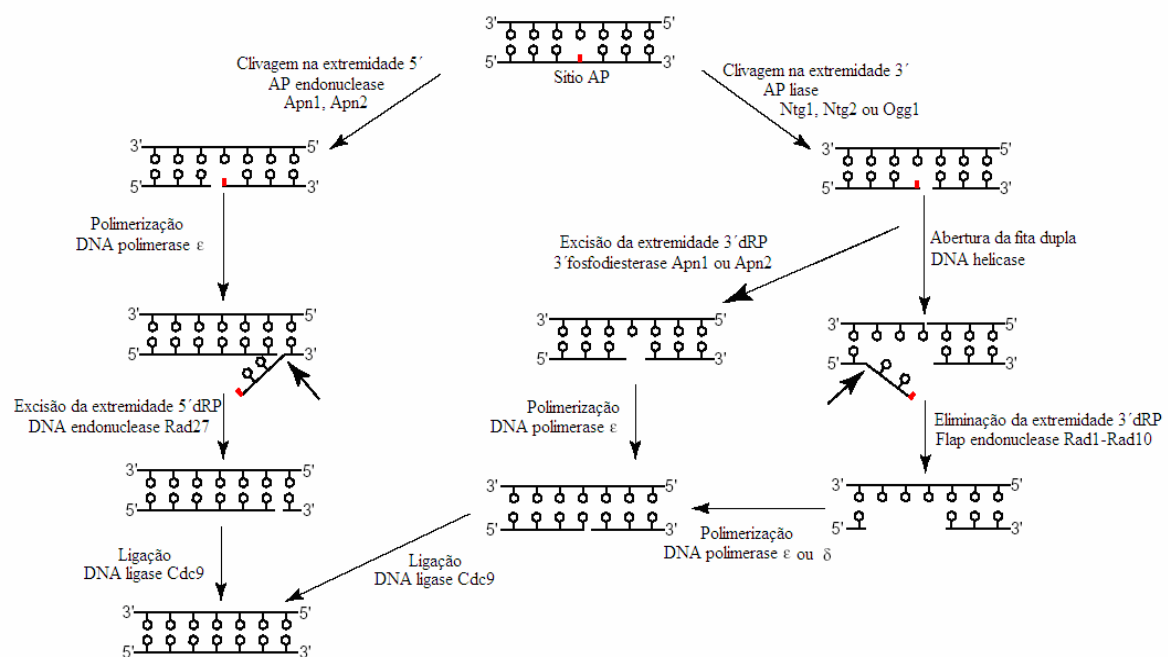


Figura 3. Representação da reparação por excisão de bases em *Saccharomyces cerevisiae*. Em linhagens selvagens, a reparação por BER ocorre preferencialmente via AP endonuclease (Apn1), DNA polimerase (Polε), 5'-flap endonuclease (Rad27) e uma DNA ligase (Cdc9) (Parte esquerda). Uma fração menor de sítios AP é clivada por AP liases (Ntg1, Ntg2 ou Ogg1), seguida pela Apn1 ou Apn2. Uma forma alternativa é a clivagem por Rad1-Rad10 endonuclease (Parte Direita) (Adaptado de Boiteaux e Guillet, 2004).

Diferentes proteínas são necessárias, para o BER, tais como Ntg1 e Ntg2, que tem função de DNA-glicosilase/AP-liase, clivando a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar podendo apresentar atividade de liase. Apn1 que é uma AP-endonuclease, que age hidrolisando a ligação fosfodiester na extremidade 5' da lesão, atuando principalmente sobre sítios AP, com atividade de fosfodiesterase sobre 3' fosfato e 3' fosfoglicolato (Boiteux e Guillet, 2004 Wilson III *et al.*, 2011).

Os sítios AP gerados durante o processo de BER podem ser reparados pelo NER, tolerados pelo sistema de TLS ou HR, ou se não houver reparo, a célula pode ter sua maquinaria de replicação bloqueada, resultando em morte celular (Hegde *et al.*, 2010).

2.2. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

O NER é a via de reparação de DNA mais versátil e flexível. É a única via adaptada para remover uma grande variedade de lesões que levam a distorções estruturais na cadeia do DNA (Guzder *et al.*, 1995), como danos induzidos pela luz UV (dímeros de pirimidina ciclobutano - CPD e 6-4- pirimidina pirimidona - 6-4PP), pontes intra e intercadeia, que distorcem a dupla hélice de DNA e interferem no pareamento de bases, no bloqueio da replicação e transcrição (Prakash e Prakash, 2000). O sistema geral do NER é bastante conservado desde bactérias até humanos (Costa *et al.*, 2003; Bohane *et al.*, 2011; Fagbemi *et al.*, 2011).

O processo do NER em eucariotos envolve uma série de reações enzimáticas necessárias para remover as lesões no DNA. Inicialmente ocorre o reconhecimento da lesão, seguido pela ligação de diversas proteínas ao local de dano no DNA fazendo duas incisões na fita simples (3' e 5' ao dano) e, por fim, acontece a remoção do fragmento de oligonucleotídeos (24 à 32 nucleotídeos contendo o dano). Em seguida, a lacuna é preenchida pela ação das DNA polimerases, e por fim, a reparação do dano é completada pela ação da DNA ligase, restaurando assim a fita de DNA (Prakash e Prakash, 2000; Friedberg *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2003; Rouillon *et al.*, 2010).

O NER está dividido em duas sub-vias de reparação, o reparo do genoma global (GGR), o qual é independente da transcrição, e o reparo acoplado à transcrição (TCR), que é dependente da ação da RNA polimerase II (RNAPol II). O GGR-NER depende da distorção acentuada da dupla hélice causada pela lesão e pela estrutura da cromatina,

iniciada pelo reconhecimento da lesão pelo complexo proteico, que em mamíferos é feito pela XPC/HHR23B. No TCR-NER, o reconhecimento da lesão resulta do bloqueio da RNA polimerase, que em seguida leva a montagem de um complexo no sítio da lesão, envolvendo as proteínas CSA, CSB e/ou TFIIS. Feito o reconhecimento da lesão é acionado o restante da maquinaria do NER, que promove a excisão da lesão, preenchimento da fenda pela polimerase, seguida de um passo final de ligação (Figura 3) (Costa *et al.*, 2003; Hanawalt e Spivak, 2008; Rouillon *et al.*, 2010; Reed, 2011).

Estudos realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem contribuído para o entendimento do mecanismo do NER, bem como as funções das diversas proteínas envolvidas nesse sistema. Em *S. cerevisiae*, existem diferentes genes que codificam proteínas essenciais para o reconhecimento da lesão e incisão no DNA, tais como Rad1, Rad2, Rad3, Rad4, Rad10 e Rad14. Em nossos estudos utilizamos mutantes nas proteínas Rad1 (homóloga da proteína XPF (ERCC4) de mamíferos) e Rad10 (homóloga da proteína ERCC1 de mamíferos). O complexo Rad1-Rad10 tem função de nuclease, clivando o DNA na extremidade 5' da lesão, que estão envolvidas no reparo de lesões induzidas pela luz UVC, e são fundamentais na recombinação mitótica e no reparo de quebras duplas no DNA (Sweder e Hanawalt, 1992; Prakash e Prakash, 2000; Friedberg *et al.*, 2006; Fagbemi *et al.*, 2011).

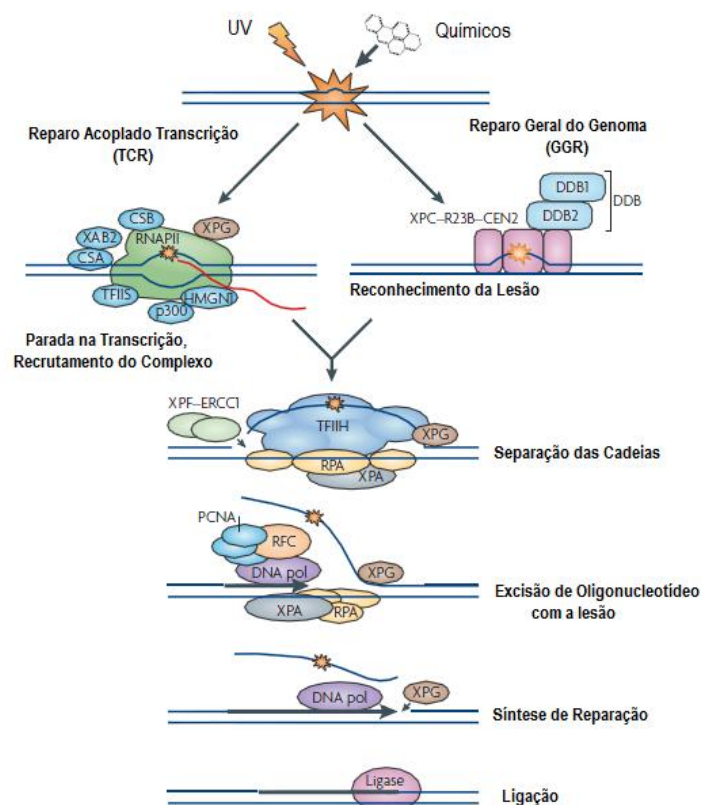


Figura 4. Reparação por excisão de nucleotídeos em células de mamíferos. O reconhecimento do dano é diferente para GGR e TCR, porém o processamento da lesão requer as mesmas proteínas. Adaptado de Hanawalt e Spivak (2008).

Em humanos, as deficiências no NER originam doenças hereditárias como o *Xeroderma pigmentosum* (XP), a Síndrome de Cockayne (CS) e a Tricotiodistrofia. Pacientes que sofrem de uma dessas doenças autossômicas recessivas são sensíveis a luz solar, e conseqüentemente tem predisposição ao câncer (Nardo *et al.*, 2009).

2.3. Reparo por recombinação homóloga (HR)

A recombinação homóloga é um dos mecanismos usados para reparação de quebras duplas do DNA (DSB), que é requerida para manutenção dos telômeros, e conseqüentemente, para a proliferação na ausência de telomerase. A HR tem um papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica de organismos eucariotos e

procariotos, pois a incapacidade de reparar as DSB pode levar a processos carcinogênicos, através da ativação de oncogenes, ativação de supressores tumorais ou perda da heterosidade (Aylon e Kupiec, 2004; Krogh e Symington, 2004; Li e Heyer, 2008).

O reparo por HR é um processo livre de erro, no qual é utilizada a fita homóloga intacta de DNA (cromátide-irmã ou cromossomo homólogo), como molde para reconstituir a cadeia danificada. A eficiência da HR depende da acessibilidade à seqüência de DNA homóloga, atuando principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular, quando as cromátides-irmãs estão disponíveis. Em *Saccharomyces cerevisiae* os genes centrais envolvidos no reparo constituem a via RAD52 de epistasia, na qual estão incluídas as proteínas Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rdh54/tidi, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 e Xrs2 (Krogh e Symington, 2004; Mladenov e Iliakis, 2011).

A recombinação homóloga é iniciada pela remoção das extremidades 5' nas DSBs pelo complexo MRX(N) (Mre11/Rad50/Xrs2 em *Saccharomyces cerevisiae* e Mre11/Rad50/Nbs1 em mamíferos). Em seguida, ocorre à ligação de diversas unidades da proteína RPA (*replication protein A*), que realiza a retirada de estruturas secundárias da cauda de DNA de fita simples. Após, a proteína Rad52 liga-se às duas outras terminações 3' das cadeias opostas situadas a cada lado da cadeia dupla, para proteger contra a digestão por endonucleases celulares. Em seguida, a proteína Rad51 juntamente com a proteína Rad54, aproxima a dupla fita contendo a lesão a uma dupla fita intacta (cromátide irmã ou de um cromossomo homólogo) formando um heteroduplex. As cadeias servem de molde para a síntese de reparo por uma DNA polimerase. Finalizando, as duas cadeias se separam (resolução das junções de Holliday) e a ligação das terminações das cadeias reparadas é garantida pela DNA ligase sem perda de informação genética (Figura 5) (Saffi e Henriques, 2003; Krogh e Symington, 2004; Aylon e Kupiec, 2004).

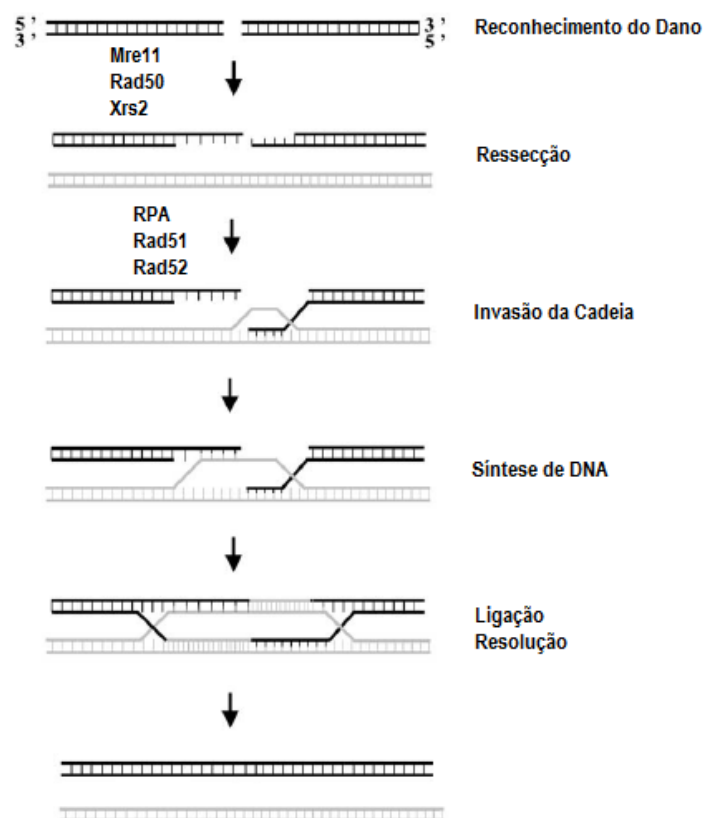


Figura 5. Diagrama do reparo pela recombinação homóloga. Após a ressecção das extremidades pelo complexo MRX, ocorre a formação do nucleofilamento de proteína Rad51 e busca pela sequência homóloga na cadeia molde. O processo é seguido pela síntese da nova cadeia, ligação das extremidades e resolução das junções de Holiday (modificado de Aylon e Kupiec, 2004).

2.4. Reparo por recombinação não-homóloga (NHEJ)

A reparação por recombinação não-homóloga foi inicialmente descrita em células de mamíferos como a principal via de reparo de DSBs. Ao contrário da recombinação homóloga, esse sistema não necessita da homologia entre duas cadeias de DNA e não utiliza, ou muito pouco, os pares de base homólogos entre as extremidades quebradas de DNA. Entretanto, é considerada uma via de reparação sujeita a erro, pelo fato de poder ocasionar pequenas inserções ou deleções (Pastwa e Blasiak, 2003; Mladenov e Iliakis, 2011).

O reconhecimento das DSB pelo NHEJ é realizado da mesma forma que na HR, o complexo MRX(N) é quem faz o reconhecimento da DSB. Após a sinalização do dano no

DNA o processo de NHEJ é iniciado pela ligação de dois heterodímeros formados pelas proteínas Ku70/Ku80 a ambas as extremidades quebradas do DNA, possivelmente protegendo as extremidades da degradação e sinalizando o dano para as demais proteínas da via. Em seguida, as extremidades da cadeia quebrada se complexam com as subunidades catalíticas da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKcs). Posteriormente, a lacuna é preenchida por uma DNA polimerase e após o alinhamento das cadeias, essas são religadas pela DNA ligase IV, em presença da proteína Xrcc4 (Figura 6) (Pastwa e Blasiak, 2003; Saffi e Henriques, 2003; Pardo *et al.*, 2009; Lieber, 2010; Mladenov e Iliakis, 2011).

A reparação de DSB por recombinação não homóloga em levedura parece acontecer na fase G1 do ciclo celular, quando não há cromossomos homólogos que propiciem a recombinação homóloga. Além disso, NHEJ e HR parecem possuir papéis que se sobrepõem durante o reparo de DSB na fase S do ciclo celular (Pastwa e Blasiak, 2003).

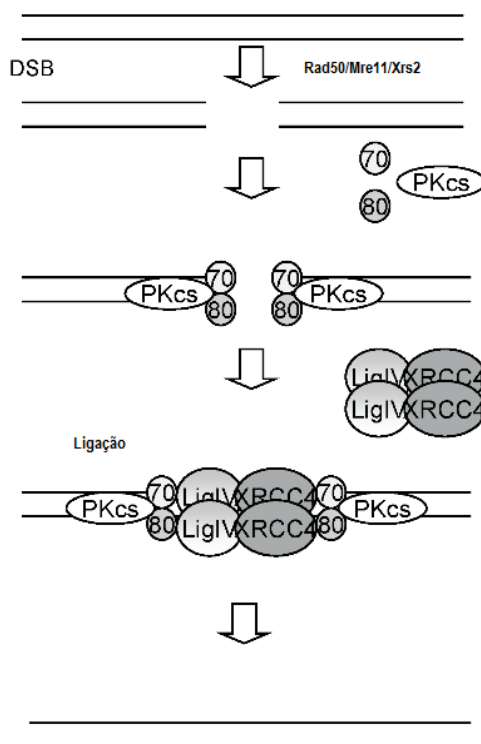


Figura 6. Modelo para recombinação não homóloga. A DSB é reconhecida, as extremidades de DNA são processadas e posteriormente religadas (adaptado de Pastwa e Blasiak, 2003).

2.5. Reparo pós-replicativo (PRR)

Como visto nos itens anteriores, uma variedade de processos existem para que as células reparem o dano no DNA a fim de garantir que a fidelidade do genoma seja mantida. No entanto, se a lesão for deixada sem reparo ou a maquinaria de replicação estiver bloqueada, ocorrerá uma parada no ciclo celular podendo levar, em última análise, à morte celular. Por este motivo, mecanismos que permitem o desvio (*bypass*) de lesões e a conclusão da replicação, sem a real remoção dos danos, são essenciais para a sobrevivência das células. Estes mecanismos são coletivamente chamados de processos de tolerância a danos ou reparação pós-replicativa (*post-replication repair* – PRR) (Ting *et al.*, 2010)

A PRR compreende tanto processos livres de erro, quanto sujeito a erro. A via sujeita a erro envolve a síntese translesão (TLS), na qual a DNA polimerase replicativa é substituída por uma DNA polimerase com fidelidade reduzida. Até recentemente, havia pouca informação sobre como ocorreria esta canalização e como seria escolhida uma via em detrimento da outra. No entanto, nos últimos anos tem sido mostrado que a proteína PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* - antígeno nuclear de proliferação celular), o fator de processividade de DNA polimerases, envolvido em síntese e reparação de DNA tem papel fundamental na determinação das consequências do encontro do dano pela forquilha de replicação (Putnam *et al.*, 2010; Ting *et al.*, 2010)

Em *S. cerevisiae*, a via PRR canaliza as lesões para diferentes vias de desvio do dano, onde atuam proteínas do grupo de epistasia Rad6. A proteína Rad6 é uma ubiquitina-conjugante, que em conjunto com Rad18, mono-ubiquitina a lisina 164 da PCNA (Inagaki *et al.*, 2009; Ting *et al.*, 2010).

2.6. Reparo por síntese de translesão (TLS)

A maioria das lesões no DNA bloqueia a progressão de enzimas que replicam o DNA. As lesões no DNA podem ser letais e normalmente são reparadas por NER ou BER, mas quando essas vias de reparação não conseguem reparar a lesão, a célula, como forma de evitar a morte celular, nestes casos, contém vias de reparo de DNA de tolerância ao dano, que atuam reiniciando a replicação na presença do dano, sem remover a lesão (Friedberg, 2005)

A TLS é uma via de reparação de tolerância, pós-replicativa e mutagênica. É um processo no qual o dano não é efetivamente reparado, mas ocorre um desvio (*bypass*) das lesões, permitindo a conclusão da replicação. No reparo por TLS as DNA polimerases tem um papel fundamental, na qual uma DNA polimerase mais tolerante às alterações da estrutura molde que as normais, insere um nucleotídeo no lado oposto à base lesada e prolonga a cadeia. No entanto, este nucleotídeo que é adicionado, pode ser correspondente ao original ou não, desta forma, pode introduzir mutações como substituição de bases, inserção ou deleção no DNA que está sendo reparado (Figura 7) (Prakash *et al.*, 2005; Lehmann *et al.*, 2005).

Os mecanismos da TLS podem ser divididos em duas categorias: livre de erro e o que comete erros. O livre de erro incorpora predominantemente o nucleotídeo correto no lado oposto ao dano, enquanto o que comete erros adiciona um nucleotídeo errado, gerando assim mutações. Em *S. cerevisiae*, a TLS depende do produto dos genes do grupo epistático de Rad6: Rev1, Rev3, Rev7 e Rad30. A proteína Rev3 compreende a subunidade catalítica da DNA polimerase zeta (ζ), associada à proteína Rev7, outra subunidade desta enzima, sendo capazes de ultrapassar vários tipos de lesões, incluindo dímeros de pirimidina e sítios AP. *RAD30* codifica a DNA polimerase eta (η), que é capaz de reparar danos gerados por UV via TLS livre de erros, além da alta fidelidade na reparação de lesões como pontes intra-cadeia G-G causadas por cisplatina, danos gerados por acetilaminofluoreno, 8-deoxiguanosina e dímeros de timina. A DNA polimerase η é sujeita a erro quando repara O⁶-metilguanossina por TLS (Goodman, 2002; Prakash *et al.*, 2005; Lehmann *et al.*, 2005; Bichara *et al.*, 2011).

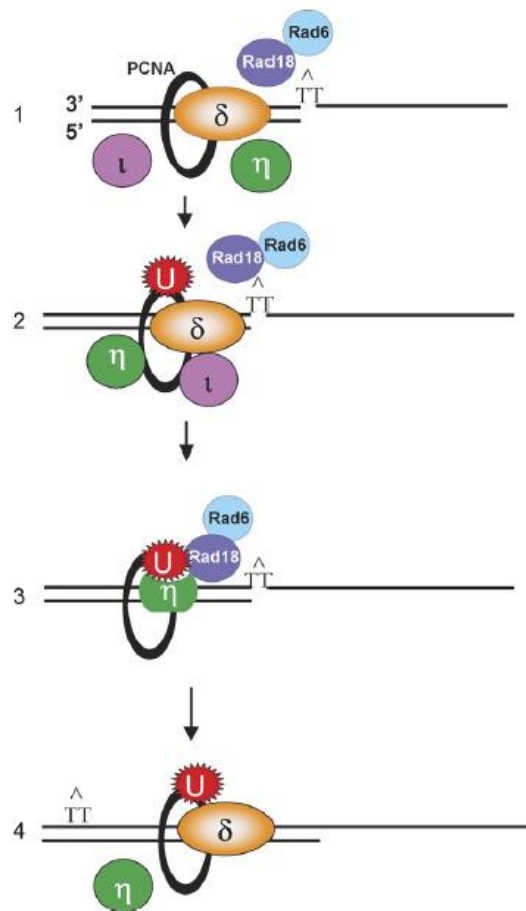


Figura 7. Modelo de reparo por síntese de translesão. (1) A replicação está parada devido a uma lesão, na qual a polimerase replicativa pol δ , que é responsável pela replicação do DNA genômico, não foi capaz de ultrapassar a lesão. Como consequência, há o recrutamento do complexo Rad6-Rad18. (2) Ocorre a ubiquitinação da PCNA, que dissocia as polimerases de replicação e recruta polimerases que são capazes de ultrapassar lesões (no exemplo a pol η). (3) É inserido um nucleotídeo no filamento oposto ao que contém a lesão, e a pol η realiza a extensão (4) Após ultrapassar a lesão, o complexo é dissociado e as polimerases de replicação são re-associadas, dando continuidade à síntese de DNA (adaptado de Lehmann *et al.*, 2007).

3. Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes

Os radicais livres são definidos como átomo ou molécula que possua um elétron desemparelhado no seu orbital de valência, eles atuam como agentes oxidantes, pois tendem a adquirir elétrons para se estabilizar. Os radicais derivados do oxigênio têm sido denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), dentre os quais destacam-se o radical

hidroxil ($\text{OH}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). A produção de ERO nos seres vivos é consequência de diversos processos metabólicos, que envolvem reações de transferência de elétrons. A fonte mais comum de radicais livres nos organismos aeróbicos ocorre durante as transferências de elétrons na mitocôndria pela cadeia respiratória, que utiliza o oxigênio molecular para obtenção de energia química em forma de adenosina trifosfato (ATP). Cerca de 2 a 5% do oxigênio sofre redução incompleta produzindo espécies parcialmente reduzidas, entre elas $\text{O}_2\cdot^-$, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), $\text{OH}\cdot$, as quais são resultantes respectivamente da redução de um, dois e três elétrons (Figura 8) (Boveris, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000; Cadet *et al.*, 2011; Pan, 2011; Ray *et al.*, 2012).

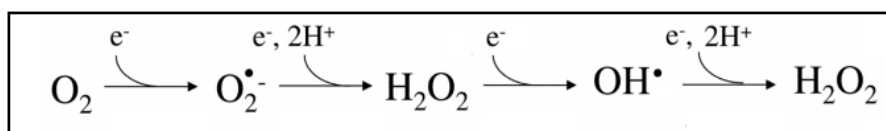


Figura 8. Redução univalente da molécula de oxigênio (adaptado Buonocore *et al.*, 2010).

Há geração de ERO através da auto-oxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reduzidas), as quais produzem ânion superóxido. As ERO também podem ser geradas por determinadas espécies químicas, tais como certos metais de transição (ferro, cobre, chumbo, e outros) e o H_2O_2 , embora não se constituam radicais livres, pois não possuem elétrons desemparelhados, podem participar de reações que levam à produção de radicais livres, chamados de pró-oxidantes. Além dos radicais derivados do oxigênio, existem os derivados do nitrogênio (espécies reativas do nitrogênio – ERN), como o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) e do cloro, como o ácido hipocloroso (HOCL) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Buonocore *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011).

A produção excessiva de ERO ou a diminuição das defesas antioxidantes provoca um desequilíbrio no estado redox celular conhecido como estresse oxidativo. Este distúrbio pode causar danos a todos os tipos de biomoléculas, como lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA e RNA), comprometendo, desta forma, a integridade celular. No DNA, as ERO produzem uma série de lesões, danificando bases, desoxiriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítios AP e ligações cruzadas entre DNA e proteínas. As ERO são responsáveis por originar processos fisiopatológicos, como envelhecimento, aterosclerose, inflamação, doenças hepáticas, mal

de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outros (Wang *et al.*, 1998; Laval *et al.*, 1998; Henriques *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2011).

Para manter a integridade dos sistemas biológicos aos danos provocados pelas ERO, os organismos possuem normalmente sistemas de defesa antioxidante que compreendem três etapas: prevenção (evita a formação de ERO), interceptação (através de sistemas antioxidantes que interceptam as ERO) e reparação (aos danos causados pelas ERO) (Halliwell e Gutteridge, 2007). A proteção antioxidante pode ser enzimática e não enzimática. Os mecanismos enzimáticos são representados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), e como os não enzimáticos pode-se citar a glutathiona (GSH), vitaminas e compostos fenólicos (Henriques *et al.*, 2001; Halliwell, 2006; Murray *et al.*, 2011).

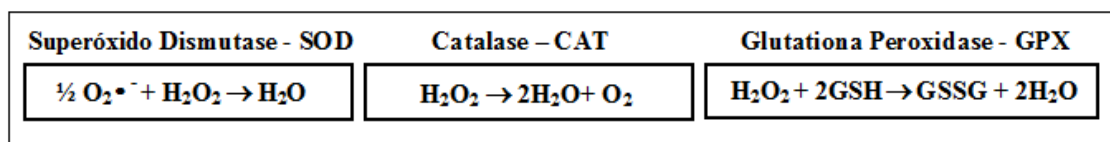


Figura 9. Detoxificação de ERO pelas enzimas SOD, CAT e GPX (adaptado Halliwell, 2006).

4. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *S. cerevisiae* vem sendo utilizada há muito tempo como um excelente modelo para compreensão de diferentes processos celulares. Com a seqüência completa do seu genoma, sua similaridade genética e bioquímica com os mamíferos mostrou-se extremamente importante como referência para seqüenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores, passando a ser um modelo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas, principalmente na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas (Goffeau *et al.*, 1996).

A *S. cerevisiae* é um organismo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. Pertence ao grupo das leveduras anaeróbicas facultativas, isto significa que irá fermentar hexoses como a glicose e a frutose, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas de crescimento. A glicose é a fonte preferencial de carbono, e é mediada por um processo de repressão e ativação de genes e proteínas, usualmente conhecido como “repressão da glicose” ou “repressão catabólica” (De Wind *et al.*, 1997;

Gancedo, 1998). Na presença de concentrações acima de um valor chamado de concentração típica, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais. A via a ser seguida pelo piruvato, neste caso, é a anaeróbica com formação de etanol, encontrando-se reduzida a atividade mitocondrial na levedura. Em concentrações de glicose abaixo da concentração crítica (0,2% no meio) e em presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbica, a *S. cerevisiae* possuirá alta atividade mitocondrial, pois os genes em questão não estarão reprimidos (Halliwell e Gutteridge, 2000; Martí *et al.*, 2011; Castrillo e Oliver, 2011).

A *S. cerevisiae* possui um perfil de crescimento característico. A fase “lag” corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual foram introduzidas. Nesta fase o metabolismo das células está ativo, sintetizando enzimas e coenzimas, criando condições necessárias para que elas possam se dividir, embora as células ainda não estejam se dividindo. Após a fase de adaptação a levedura entra na fase exponencial, na qual o número de células aumenta exponencialmente com o tempo com energia proveniente da fermentação. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a depressão catabólica (transição diáuxica), com uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, reassume a divisão celular em ritmo mais lento, utilizando etanol como fonte de carbono, produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono foram exauridas, as células entram na fase estacionária, fase na qual as células podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Pringle e Hartwell, 1982; Maris *et al.*, 2001; Castrillo e Oliver, 2011).

É um organismo que apresenta uma facilidade para a obtenção de mutantes, fazendo deste um dos modelos eucarióticos melhor caracterizados geneticamente quanto à resposta celular aos danos provocados no DNA, especialmente nos estudos de mutagenicidade.

4.1. Avaliação da Atividade Mutagênica

As mutações são detectáveis através da expressão fenotípica, causadas por mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares

aos danos do DNA, podendo assim ser dividida em dois grupos: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA, e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (Dearfield *et al.*, 2002). Os ensaios com a levedura *S. cerevisiae* têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (Henriques *et al.*, 1987; Terziyska *et al.*, 2000).

Experimentos de mutações reversas são mais comumente utilizados. Estes se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional. A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense* – mutação que resulta na alteração de um códon que codifica um aminoácido para um códon de terminação) (Hawthorne e Leupold 1974). Reversão de auxotrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda uma mutação induzida por supressor do gene mutante original (Henriques *et al.*, 1987). Para que seja identificada a mutação reversa é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14c, isolada por Von Borstel (Parry e Parry 1984). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações lócus específico: reversões do alelo *lys1-1* (alteração para o códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificados no lócus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “*background*” de crescimento (Soares *et al.*, 2005)

Alterações gênicas, resultantes de um tratamento mutagênico, também podem ser facilmente quantificadas usando-se um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Muitas linhagens expressam um transportador de arginina chamado Can1p, codificado pelo gene *CAN1*. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina. O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina dos ambientes levando as células à morte. Neste sentido, alterações no gene *CAN1*, induzidas por drogas mutagênicas podem aumentar a sobrevivência das células em

presença de canavanina quando comparados a tratamentos não mutagênicos (Brendel e Henriques, 2001; Grogan e Robertson, 2012). A linhagem N123 de *S. cerevisiae* permite a detecção deste tipo de mutação, chamada mutação “forward” ou mutação para frente. As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo na presença de canavanina (Revers *et al.*, 2002).

4.2. Estudo de mecanismos de reparação de DNA envolvidos na resposta citotóxica

Os estudos em levedura foram muito úteis para a elucidação funcional de genes e proteínas, uma vez que existe uma facilidade imensa na construção de linhagens mutantes por meio de interrupção gênica, e em estudos de complementação fenotípica por meio de genética reversa. A levedura também possui um sistema de transformação de DNA altamente versátil, sendo viáveis com numerosos marcadores genéticos; plasmídeos podem ser introduzidos nas células tanto como moléculas replicativas, quanto para integração no genoma (Ouyang *et al.*, 2009).

A fim de se estudar os mecanismos de ação de compostos e as vias de reparação de DNA envolvidas após tratamento com mutagênicos, podem ser empregadas linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em determinada via de reparação. Para determinar a natureza das lesões geradas por um determinado agente, compara-se a sensibilidade da droga em mutantes deficientes em uma via de reparo de DNA com a respectiva linhagem isogênica proficiente na via. Caso a linhagem mutante seja mais sensível que a selvagem, pode-se inferir que o agente induz o tipo de lesão incapaz de ser reparado pelo mutante (Boeira *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2005).

4.3. Defesas antioxidantes e ensaio de atividade antioxidante em *S. cerevisiae*

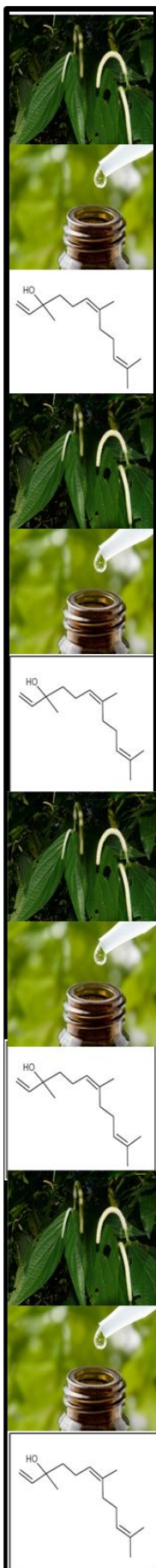
A resposta ao estresse celular é evolutivamente conservada em todos os organismos vivos e a levedura *S. cerevisiae* tem tido um papel importante nesses estudos de como as células podem responder ao estresse oxidativo. *S. cerevisiae* tem esclarecido informações quanto ao papel de enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo e na regulação do metabolismo redox, bem como a modulação de proteínas pelo estado redox das mesmas e reparo de danos oxidativos nas moléculas (Toledano *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2008).

S. cerevisiae apresenta diversos mecanismos de defesas antioxidantes. Possui duas enzimas superóxido dismutases, que fazem a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . A SodCuZn, codificada pelo gene *SOD1*, está localizada no citoplasma, enquanto a SodMn, codificada pelo gene *SOD2*, está localizada na mitocôndria. As linhagens mutantes *sod1Δ* apresentam problemas de crescimento em condições aeróbias, são muito sensíveis à hiperóxia, perda de viabilidade em fase estacionária e têm importante papel na defesa contra oxidantes externos, como paraquat e menadiona, além disso, são auxotróficas para metionina e lisina em presença de oxigênio. As linhagens mutantes *sod2Δ* são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não fermentáveis. A enzima Sod2 demonstra ser fundamental na defesa contra $O_2^{\bullet-}$ gerado pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Toda via Sod2 não parece ter um papel importante na proteção a oxidantes externos (Gralla e Kosman, 1992; Halliwell e Gutteridge, 2007; Herrero *et al.*, 2008; Buettner, *et al.*, 2011).

A levedura apresenta duas catalases, uma citosólica, codificada pelo gene *CTT1*, e outra perioxossomal, codificada pelo gene *CTA*. A *CTT1* possui um papel não muito claro, já que os mutantes não apresentam defeitos no crescimento nem sensibilidade aumentada a peróxidos. A *CTA1* está envolvida na detoxificação do H_2O_2 gerado pela acil-CoA oxidase durante a beta-oxidação de ácidos graxos dos peroxissomos. No entanto, o duplo mutante é hipersensível ao peróxido em fase estacionária (Hiltunen *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2008)

Outra forma de neutralizar o peróxido de hidrogênio é através de peroxidases. Em levedura, a resistência a peróxido tem sido associada aos níveis intracelulares de glutathiona. A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo que desempenha papel fundamental na proteção das células contra danos oxidativos. O gene *GSH1* codifica para a γ -glutamyl-cisteinil sintetase, a enzima responsável pelo primeiro passo e ponto limitante da síntese do tripeptídeo glutathiona (Brendel *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2007; Al-Gubory *et al.*, 2010).

Linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox da célula. Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de defesa antioxidante (Henriques *et al.*, 2001).



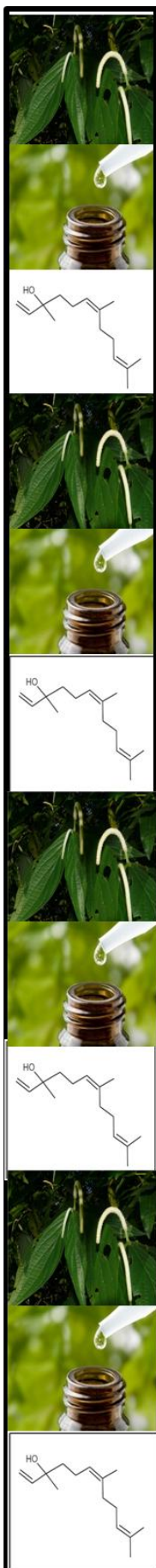
OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Determinar a citotoxicidade e mutagênese do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* e do seu componente majoritário, (E)-nerolidol, em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, buscando o entendimento do mecanismo de ação.

1.1. Objetivos Específicos

- Determinar a atividade citotóxica e mutagênica do óleo essencial e do nerolidol nas linhagens XV185-14c e N123 de *S. cerevisiae*.
- Verificar os mecanismos de reparação de DNA envolvidos na resposta citotóxica do óleo essencial e do nerolidol em linhagens deficientes em vias de reparo de DNA.
- Avaliar o efeito citotóxico do óleo essencial e do nerolidol em linhagens deficientes em enzimas de defesa antioxidante.



CAPÍTULO I

Piper gaudichaudianum essential oil and its major compound
nerolidol induce cytotoxic effects by generating ROS

Artigo submetido ao periódico Toxicology in Vitro

***Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol
induce cytotoxic effects by generating ROS**

Angelo Regis de Moura Sperotto^{1,2}, Dinara Jaqueline Moura³, Valéria Flores Pères³,
Flaviana C. Damasceno⁴, Elina Bastos Caramão⁴, João Antonio Pêgas Henriques¹,
Jenifer Saffi^{1,2,3*}

¹ Department of Biophysics, Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, zip code 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

² National Institute for Translational Research on Health and Environment in the Amazon Region, CNPq/MCT, Brazil

³ Department of Basic Health Sciences – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, zip code 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Department of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, zip code 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Jenifer Saffi, Rua Sarmento Leite, 245 / Lab. 29 – zip code 90050-170. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3303 8752; fax: +55 51 3303 8810. E-mail address: jenifers@ufcspa.edu.br (J. Saffi)

Abstract

We have recently shown that *Piper gaudichaudianum* essential oil possesses strong cytotoxic and genotoxic effects in mammalian V79 cells that can be related to its oxidative potential. Additionally, phytochemical analyses showed that the major compound present in this essential oil is (*E*)-nerolidol. The aim of this study was to analyze the cytotoxicity of *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol in different *Saccharomyces cerevisiae* strains defective in base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end-joining (NHEJ), translesion synthesis (TLS) and post-replication repair (PRR). The influence of these compounds on the redox systems of *S. cerevisiae* was also evaluated. Treatment of the XV185-14c and N123 strains with essential oil and nerolidol led to cytotoxicity; however, only *P. gaudichaudianum* essential oil was able to induce mutagenic effects at higher concentrations. Our results revealed an important role of BER as the *ntg1*, *ntg2*, *apn1* and *apn2* mutants showed pronounced sensitivity to essential oil and nerolidol. Deficiencies in NER, NHEJ and HR had only a minor influence on the sensitivity to the essential oil and nerolidol. Interestingly, deletion of the genes that encode the TLS and PRR proteins had no influence on sensitivity to *P. gaudichaudianum* essential oil, but the *rev1* Δ , *rad30* Δ and *rad18* Δ mutants showed remarkable resistance to nerolidol. To confirm that *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol have the ability to generate reactive oxygen species (ROS), we determined that the absence of superoxide dismutase enzyme increases the sensitivity to the essential oil and nerolidol. In addition, our results showed that essential oil and nerolidol are capable of generating ROS. Considering the response of Sod-deficient and repair-deficient strains together with our previous data, we can conclude that the observed cytotoxicity to *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol is mainly related to single-strand breaks generated by the presence of oxidative lesions.

Keywords: *P. gaudichaudianum* essential oil; nerolidol; *Saccharomyces cerevisiae*, DNA repair, ROS, cytotoxicity.

Introduction

Piper gaudichaudianum Kunth is a plant that belongs to the Piperaceae family. This family is composed of 7 genera and approximately 1100 species. The genus *Piper* (Piperaceae) is well known for its aromatic herbs, which are largely distributed in tropical and subtropical regions of the world. Some *Piper* species are also employed in folk medicine as analgesics for pain management, toothaches and wound treatment (Guerrini et al., 2009). *P. gaudichaudianum* Kunth is widely distributed in the Brazilian Atlantic forest, from the Northeast to southern of Brazil, and reaching Argentina and Paraguay. This plant is popularly known by the names “Iaborandi”, “Jaborandi”, “Paripaioaba” and “Pariparoba” (Di Stasi and Hiruma-Lima, 2002).

According to popular medicine, chewing *P. gaudichaudianum* leaves alleviates toothaches (Di Stasi and Hiruma-Lima, 2002). Other previously described biological activities using different plant material from this species include fungicidal and larvicidal effects (Lago et al., 2004; Morais et al., 2007) as well as anti-inflammatory and analgesic activities of leaf extracts (Di Stasi and Hiruma-Lima, 2002; Moreira et al., 2001). Furthermore, the essential oil of *P. gaudichaudianum* leaves has anti-inflammatory and larvicidal activity (Morais et al., 2007). We have recently demonstrated that this essential oil has strong cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects against mammalian V79 cells, and these effects are likely related to its oxidative potential (Péres et al., 2009).

The previously published studies on *P. gaudichaudianum* have presented analyses of its leaves and its essential oil phytochemical profile, reporting triterpenes, flavonoids and alkaloids as the major constituent compounds. Among the terpenes identified were nerolidol, d-limonene, linalool, β -caryophyllene, α -humulene and cymene (Andrade et al., 1998; Péres et al., 2009; Poser et al., 1995; Rorig and Poser, 1991).

Nerolidol, one of the major sesquiterpenes present in the essential oil of *P. gaudichaudianum* that was identified previously by our research group (Péres et al., 2009), is used to enhance flavor and aroma, is approved by the U.S. Food and Drug Administration, and has been studied as a topical skin penetration enhancer for the transdermal delivery of therapeutic drugs (Lapczynski et al., 2008; Williams and Barry, 2004). Studies related to the biological activity of nerolidol showed an antifungal effect against *Microsporum gypseum* (Lee et al., 2007), activity against L3 larvae of *Anisakis* type I (Navarro-Moll et al., 2011), and antimalarial (Lopes et al., 1999), antileishmanial

and antiulcer activities (Arruda et al., 2005; Klopell et al., 2007). In addition, (E)-nerolidol and α -humulene have been shown to be active against renal cell adenocarcinoma ACHN, the hormone-dependent prostate carcinoma LNCaP, the amelanotic melanoma C32 and the MCF-7 breast cancer cell line (Legault et al., 2003 ; Loizzo, et al., 2007a, 2007b ; Sylvestre et al., 2007).

In view of the absence of knowledge about the exact cytotoxic mechanisms of *P. gaudichaudianum* essential oil, the aim of the present study was to investigate the cytotoxic effects of the essential oil and its major compound nerolidol using *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the major DNA repair proteins and in antioxidant defense. Induced mutagenesis was also tested in the haploid XV185-14c and N123 *S. cerevisiae* strains. Also evaluate, intracellular ROS generation was estimated using the 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescent assay. In addition we performed a new phytochemical analysis of *P. gaudichaudianum* essential oil by two dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometer analyses (GC \times GC-TOFMS).

Materials and Methods

Chemicals

Nerolidol (a mixture of *cis*- and *trans*-nerolidol), 4 nitroquinoline-oxide (4-NQO), hydrogen peroxide (H₂O₂), amino acids (L-histidine, L- threonine, L-methionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine, L-arginine), L-canavanine, nitrogen bases (adenine and uracil), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Yeast extract, bacto-peptone, bacto-agar, yeast nitrogen base with no amino acids and glucose were acquired from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).

Sample

The leaves of *Piper gaudichaudianum* were air-dried and the oil was obtained by hydrodistillation process for 4 h, using a Clevenger type apparatus, in accordance with the method recommended by British Pharmacopoeia (2011), producing 0.55% (w/v) of essential oil. The distilled oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in closed dark vials at 4°C until use. The oil was green and had a distinct sharp odor. The essential oil and the standard nerolidol were diluted (1:100 v/v) in hexane prior to GC x GC-TOFMS. The voucher specimen was identified and deposited at the Herbarium of

the Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (Voucher No.: ICN 128412).

Analysis by GC×GC-TOFMS

The GC x GCTOFMS analyses were performed using an Agilent 6890GC system with an egasus III TOFMS analyzer (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). The primary GC column was DB-5 (methyl silicon wit 5 % of phenyl substituted groups) (60 m x 0.25 mm x 0.1 µm) and secondary column used was DB-17MS (methyl silicon wit 50 % of phenyl substituted groups) (2,15 m x 0.18 mm x 0.18 µm), both from J&W-Agilent (Folsom, CA, USA). The primary oven temperature program was 105 °C (0.2 min) – 2 °C/min – 200 °C, the secondary oven with 10 °C offset. Modulation time was 4 s, with a 1,6 s hot pulse and 0.4 s cold pulse in each stage. The carrier gas used was Helium (from White Martins, 99.999% purity) with constant flow rate of 1.0 mL/min, injector with split rate of 1:50, temperature for the injector, the transfer line and the ion source were set at 250 °C, 250 °C and 250°C, respectively. The acquisition rate 100 s/s and mass range of m/z 50-450. The components can be quantified by LECO Corp ChromaTOFTM version 3.1. All peaks with signal-to-noise ratio higher than 100 were found in the raw GCXGC chromatogram. The workstation can automatically give the parameters such as similarity and reverse of peaks through comparing them with the compounds in the library. The results were combined in a peak table. The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0 was used in this work.

Yeast strains and media

The relevant genotypes of the *S. cerevisiae* strains used in this work are indicated in Table I. Complete liquid medium (YPD) containing 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto-peptone and 2% (w/v) glucose was employed for routine growth. Medium containing 2% (w/v) bacto-agar was used for plates. The minimal medium (MM) contained 0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) bacto-agar. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, 2 mg tryptophan, and 24 mg threonine per 100 mL MM. For mutagenesis of the XV185-14c strain, the omission media, lacking lysine (SC-lys), histidine (C-his) or homoserine (SC-hom), was supplemented with 0.1 mg lysine,

histidine, or methionine, respectively, per 100 mL of MM. The use of a MM containing the relevant nutritional requirements at a limiting concentration allowed (i) the restriction of cell growth at a titer below the plate's saturation level and (ii) the study of the number of yeast revertant colonies from a determined amino acid auxotrophy to its respective prototrophy; these colonies arose due to mutagenic treatment (Von Borstel et al., 1971). For the determination of forward mutagenesis in strain N123, plates lacking arginine were supplemented with 60 µg/mL canavanine (SC + can).

→ **Insert Table I here**

Yeast growth conditions and treatment

Stationary-phase cultures were obtained by inoculation of liquid YPD with an isolated colony. After the 48 h incubation at 30°C with aeration by shaking, the cultures contained 1-2 x 10⁸ cells/mL. Exponential phase cultures (1-2 x 10⁷ cell/mL) were obtained by inoculating 5 x 10⁵ cells/mL of the stationary-phase YPD culture in fresh YPD medium at 30°C for 3–4 h. Cells were harvested and washed twice with saline solution (NaCl 0.9%). Cell concentration and budding percentage were determined by microscopic counts using a Neubauer chamber.

For all treatments, DMSO stock solutions of *P. gaudichaudianum* and nerolidol were prepared immediately prior to use so that the DMSO concentration in the treatment never exceeded 0.2%. The appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solutions in distilled water. The solvent controls included in the tests were found to be negative; 4-NQO and H₂O₂ were used as positive control.

Detection of reverse and frameshift mutations in the XV185-14c haploid strain

Suspensions of 2 x 10⁸ cells/mL in stationary or exponential growth phases were incubated in phosphate-buffered saline solution (PBS; Na₂HPO₄, KH₂PO₄ and KCl; 20 mM; pH 7.4) for mutagenic evaluation under non-growth conditions, or in fresh synthetic media for mutagenic evaluation under growth conditions, with different concentrations of *P. gaudichaudianum* essential oil or nerolidol at 30°C for 18 h. The 4-NQO was used as positive control. Survival was determined on SC (3-5 days, 30°C) and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) on the appropriate omission media (7-10 days, 30°C). Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele and reversions

result from mutation at the locus itself (Snow, 1978), *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele (Hawthorne, 1969) that can be reverted either by a locus-specific mutation or by a forward mutation in a suppressor gene (Von Borstel et al., 1971). The two mutation types at the *lys1-1* locus were differentiated according to Schuller and von Borstel (1974). It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens (Von Borstel et al., 1971).

Detection of forward mutations in the N123 strain

Yeast cells in stationary or exponential growth phase (2×10^8 cells/mL) were treated for 18 h at 30°C with *P. gaudichaudianum* essential oil or nerolidol at increased concentrations. The 4-NQO was used as positive control. After treatment, appropriate dilutions of cells were plated onto SC plates to determine cell survival and were then plated onto SC media supplemented with canavanine (60 µg/mL) in order to determine the presence of a forward mutation in the *CAN1* locus. Plates were incubated in the dark at 30°C for 3-5 days before assaying survival and counting the revertant colonies.

Survival assays

The relative sensitivity of the DNA repair pathway-defective strains was assayed by treating 1×10^8 cells/mL exponential cultures in PBS with various concentrations of *P. gaudichaudianum* essential oil or nerolidol, followed by incubation with aeration by rotary shaking at 30°C for 18 h. The strains deficient in superoxide dismutase and/or catalase were treated with *P. gaudichaudianum* essential oil or nerolidol in PBS at 30°C for 1 h with agitation. To determine colony-forming ability, suitable aliquots were plated on YPD. Plates were incubated at 30°C for 2–4 days before the surviving colonies were counted.

Determination of reactive oxygen species (ROS) generation

The DCFH-DA assay was used to estimate the intracellular generation of ROS. This assay is a reliable method for measuring intracellular ROS such as H₂O₂, hydroxyl radical (OH[•]), and hydroperoxides (ROOH). The dye is a non-polar compound that readily penetrates into cells. Intracellular peroxides oxidize DCFH-DA to a highly fluorescent compound (2',7'-dichlorofluorescein; DCF). After treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil or nerolidol for 1 h at 30°C, SOD-WT, *sod1Δ* and *sod2Δ*

yeast cells were washed and incubated with 10 μ M DCFH-DA for 30 min at 37 °C in the dark. The H₂O₂ (5 mM) was used as positive control. After incubation, the cells were washed with PBS and analyzed within 30 min using FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, United States). The DCFH-oxidation was measured using 488 nm excitation and 530/30 nm band pass emission filters. As a rule, 10,000 cells were counted in each experiment. The Cell Quest software (Becton Dickinson) was used to calculate the mean fluorescence. Data were expressed as percentages of control values.

Statistics

All experiments were independently repeated at least three times, with triplicate samples for each treatment. Data were expressed as means \pm standard deviation (S.D.) values. Statistical analyses of the data were performed using ANOVA One-Way, and the means were compared using Dunnett's multiple comparison test. *P*-values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Analysis of P. gaudichaudianum essential oil and nerolidol by GC×GC-TOFMS

In the GC x GC system, compounds are separated by volatility difference on the first dimension non-polar column, and by polarity on the second medium-polar column. The composition of the volatile fraction obtained from *P. gaudichaudianum* leaves using the GC x GC-TOFMS technique is summarized in Table II. Identification based on NIST/EPA/NIH library mass spectra search using similarity and reverse factors was above 731 and 769, respectively. This technique is based on the application of two GC columns coated with different stationary phases connected in series through a special interface called modulator. The modulator is the heart of the instrument because it ensures that the separation is both comprehensive and multidimensional (Welke et al., 2012). The addition of the TOFMS provides a sensitive detector with full-scan MS capability and a high data density in the 2D separation space. The combination of GC x GC-TOFMS has been shown to be very useful for many complex samples (Von Muhlen et al., 2008). Fifty six volatile compounds from the essential oil of *P. gaudichaudianum* leaves were identified. The essential oil is characterized by high percentages of sesquiterpenes. In this study, the percentages of (*E*)-nerolidol and α -humulene found in the essential oil were 22.06% and 21.32 %, respectively.

→ **Insert Table II here**

A typical two-dimensional separation/total ion chromatogram (TIC) of the essential oil is shown in Figure 1 and the nerolidol chromatogram (a mixture of *cis*- and *trans*-nerolidol from Sigma–Aldrich) is shown in Figure 2A. The chromatographic peak data consist of first dimension retention times, second dimension retention times and peak volume (TIC). The GC x GC chromatogram is constructed as a rasterized image of the TIC computed from each secondary chromatogram. Figure 2B compares the mass spectrum of the blend (peak) at 24.03 min in the sample of essential oil, the sample of standard and the mass spectrum of (*E*)-nerolidol from the NIST/EPA/NIH library mass spectra and showed that in *P. gaudichaudianum* essential oil has only *trans*-nerolidol, and not a racemic mixture of this terpene, by comparing of the retention time.

→ **Insert Figure 1 here**

→ **Insert Figure 2 here**

Cytotoxicity and detection of induced mutations

As shown in Table III, *P. gaudichaudianum* essential oil induced dose-dependent cytotoxic effects both in stationary and in exponential phase cultures in the XV185-14c strain, with a significant effect at concentrations of 50 and 100 µg/mL. The essential oil induced a significant increase in mutation frequencies only at the *lysI* locus at the highest concentration and in cultures treated at the exponential phase of growth. Nerolidol, the major component of the essential oil, was cytotoxic in XV185-14c at concentration of 25, 50 and 100 µg/mL and did not demonstrate any induction of mutagenicity at the three evaluated loci (Table IV). To complement this study, we used the N123 strain to evaluate the cytotoxicity as well as the induction of forward mutations. In this strain, we did not observe any mutagenic effect for either the essential oil (Table V) or nerolidol (Table VI), but the cytotoxic effects were pronounced after nerolidol treatment. The treatments under growth conditions were always more cytotoxic for both samples, independent of the tested strain. At the highest concentration (100 µg/mL) used, nerolidol induced cytotoxicity that was at least five times higher than that induced by the essential oil of *P. gaudichaudianum*, regardless of the strain or growth phase tested.

→ **Insert Table III here**

→ **Insert Table IV here**

→ **Insert Table V here**

→ **Insert Table VI here**

Cytotoxicity effects in S. cerevisiae DNA repair-defective strains

Due to the high toxicity that we observed, we decided to evaluate the interaction of DNA repair pathways in response to the *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol-induced DNA damage. Therefore, we performed survival assays to compare the sensitivities of single, double, triple and quadruple mutants defective in BER, NER, HR, NHEJ, PRR and TLS. Among the BER-deficient strains, *P. gaudichaudianum* essential oil displayed increased cytotoxicity in the single mutant *ntg2Δ* and the double mutant *ntg1Δntg2Δ* when compared to the isogenic wild-type SJR751 strain (Figure 3A). Nerolidol-induced cytotoxicity to *ntg1Δ*, *ntg1Δntg2Δ*, and *ntg1Δntg2Δapn1Δ* mutants increased compared to the isogenic SJR751 (Figure 3B), as did the cytotoxicity in the single mutant *apn1Δ* in relation to the isogenic wild-type BY4741 strain (Figure 3B and Figure 3C). The Ntg1 and Ntg2 proteins are DNA N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic (AP) lyase, respectively, and the Apn1 protein is a major apurinic/apyrimidinic endonuclease with 3'-repair diesterase action (Boiteux and Guillet, 2004; Doetsch et al., 2001). The *rad1Δ* and *rad10Δ* strains, which lack the 5'- and 3'-endonucleases of NER (Prakash and Prakash, 2000), showed an intermediate sensitivity to *P. gaudichaudianum* essential oil (Figure 4A). These single mutants had the same nerolidol sensitivity as the wild-type BY4741 strain (Figure 4B).

→ **Insert Figure 3 here**

→ **Insert Figure 4 here**

Among the double-strand repair defective strains, the essential oil induced a moderate sensitivity in the *rad50Δ* mutant (Rad50 protein is a subunit of the MRX complex involved in both HR and NHEJ) and did not induce sensitivity in *rad52Δ* (HR) or *ku70Δ* (NHEJ) mutants (Figure 5A). The *rad50Δ*, *rad52Δ* and *ku70Δ* mutants as well

as the isogenic BY4741 strain showed dose-dependent sensitivity to nerolidol (Figure 5B and Figure 5C).

→ **Insert Figure 5 here**

Deletion of the TLS and PRR proteins had no influence on the sensitivity to *P. gaudichaudianum* essential oil (Figure 6A). Interestingly, nerolidol exhibited a remarkable resistance in several of these mutants, as observed in Figure 6B: *rev1Δ*, which is deficient in the deoxycytidyl transferase that forms a complex with DNA polymerase ζ in TLS (Lawrence, 2004); *rad30Δ*, which lacks polymerase eta, which is involved in TLS during post-replication repair, catalyzing the synthesis of DNA opposite cyclobutane pyrimidine dimers and other lesions (Ai et al., 2011); and *rad18Δ*, which is deficient in the E3 ubiquitin ligase that forms a heterodimer with Rad6p to monoubiquitinate PCNA in PRR (Prakash et al., 2005). The absence of Rev3, the catalytic subunit of polymerase ζ (Lawrence, 2004), also had a small effect on the sensitivity to nerolidol (Figure 6B and Figure 6C).

→ **Insert Figure 6 here**

To evaluate the overlap of different DNA repair pathways, the mutants without DNA repair proteins from BER, NER, HR or TLS were used. *P. gaudichaudianum* essential oil induced slight cytotoxic effects in the quadruple mutants *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*, while the nerolidol induced slight cytotoxic effects in *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* and pronounced effects on the *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* strain (Figure 7).

→ **Insert Figure 7 here**

Cytotoxicity in strains deficient in superoxide dismutase and/or catalase

To analyze possible interactions of the essential oil and nerolidol with the formation of ROS, we used the strains deficient in superoxide dismutase and/or catalase. The essential oil exhibited a small amount of cytotoxicity in the *sod1Δ* single mutant (lacks

cytoplasmic superoxide dismutase) (Figure 8A), and nerolidol exhibited cytotoxicity in the *sod1Δ* and *sod2Δ* single mutants (lacks mitochondrial superoxide dismutase) as well as the double mutant *sod1Δsod2Δ* (Figure 8B).

→ **Insert Figure 8 here**

Effects of P. gaudichaudianum essential oil and nerolidol on ROS generation

The results of the DCF assay indicated that *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol caused an increase in the intracellular levels of ROS. The relative DCF fluorescence intensities measured after treatment showed that at 100 μg/mL, *P. gaudichaudianum* essential oil induces an ROS increase in SOD-WT and *sod1Δ* strains (Table VII). The nerolidol was also able to significantly increase the ROS level in all tested strains (SOD-WT, *sod1Δ* and *sod2Δ*) at the highest concentration (Table VII).

→ **Insert Table VII here**

Discussion

Nerolidol is one of the major sesquiterpenes present in the essential oil of *P. gaudichaudianum* that was identified previously by our research group. When GC-MS was used, 47 compounds were tentatively identified and the major compounds were (*E*)-nerolidol (22.4 %), α-humulene (16.5 %), (*E*)-caryophyllene (8.9 %) and bicyclogermacrene (7.4 %) (Péres et al., 2009). Now, we identified 56 volatile compounds (Table 2) with the same major compounds, however, in different concentrations as showed in Table 2. The analysis of GC-MS has some widely known limitations, such as cases in which coelutions are unavoidable and frequent in complex samples, which renders the spectra unsuitable for qualitative purposes, or for species in very low concentrations. In addition, positive identification may not be achieved even with good quality spectra, notably for compounds having several highly similar structural isomers, presenting comparable fragmentation patterns (Pedroso et al., 2011). Such problems can be addressed by using comprehensive two-dimensional GC (GC x GC) (Tranchida et al., 2010). In this sense, our results showed that the *trans*-nerolidol is

the major compound present in *P. gaudichaudianum* essential oil and not the racemic mixture (*cis*- and *trans*-nerolidol) (Figure 2 B).

To gain insight into the biological properties of *P. gaudichaudianum* essential oil and its major compound nerolidol, we evaluated the response of strains defective in DNA repair as well as the mutagenic and oxidative properties of these components using the yeast *S. cerevisiae* as a model organism.

P. gaudichaudianum essential oil showed cytotoxic effects in the XV185-14c and N123 strains and induced mutagenesis only at the *lys1* locus at the highest concentration. The nerolidol cytotoxic effects were more pronounced compared to those of the essential oil in these strains, and it did not induce any type of mutagenesis. In previous work, we have shown that *P. gaudichaudianum* essential oil induces significant DNA strand breaks using a comet assay and presented mutagenic effects using a micronucleus assay in V79 cultured mammalian cells. However, these effects appeared to be indirect, occurring as a result of ROS generation, because lipid peroxidation increase was detected in these cells after treatment with the essential oil (Péres et al., 2009). The absence of nerolidol mutagenic effects are in accordance with Gonçalves *et al.* (2011), who demonstrated that nerolidol does not have a mutagenic effect using the *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98 strains in the presence or absence of metabolic activation systems, although nerolidol did induce cytotoxicity in these strains. Additionally, in mouse cells, nerolidol induces clastogenicity but very weak genotoxicity (Pículo et al., 2011).

To determine whether the essential oil and nerolidol exert direct or indirect effects on DNA, we evaluated the sensitivity of DNA repair defective *S. cerevisiae* strains to these compounds. Our results indicate that the *ntg2* Δ single mutant and *ntg1* Δ *ntg2* Δ double mutant display sensitivity after the *P. gaudichaudianum* essential oil treatment, the *ntg1* Δ and *apn1* Δ single mutants, the *ntg1* Δ *ntg2* Δ double mutant and the *ntg1* Δ *ntg2* Δ *apn1* Δ triple mutant showed increased sensitivity to nerolidol (Figure 3); the proteins that are absent in these strains belong to BER pathway. The BER primarily involves the repair of oxidative DNA damage, which encompasses the small helix non-distorting base lesion and abasic sites (Lindahl and Wood, 1999; You et al., 1999). Our data indicate that BER enzymes involved in DNA lesion repair are induced, most likely indirectly, by *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol.

There is an overlap between BER and NER with respect to DNA damage processing, such as during the repair of thymine glycol and 8-oxoguanine oxidative lesions (Boiteux and Guillet, 2004). Our results indicate that the NER-deficient strains *rad1Δ* and *rad10Δ* have an intermediary sensitivity to *P. gaudichaudianum* essential oil (Figure 4A), which could indicate the involvement of these pathways in the lesion induced by the essential oil. Nerolidol did not induce increased sensitivity in strains lacking some of the NER proteins (Figure 4B). Although a previous study reported that nerolidol showed pro-oxidant activity (Ruberto et al., 2000), in support of the sensitivity of the BER strains, the repair pathway induced by this sesquiterpene seems to be slightly different from that induced by *P. gaudichaudianum* essential oil. The complex composition of the essential oil can explain this difference because in addition to nerolidol (the major component of the oil, representing 22.06%), it also contains other sesquiterpenes, such as α -humulene (21.32%), bicyclogermacrene (13.16%) and (E)-caryophyllene (7.51%). Alfa-humulene, e.g., showed cytotoxic activity on the human prostate carcinoma LNCaP, human prostate cancer PC-3, adenocarcinomic human alveolar basal epithelial A-549, colorectal adenocarcinoma DLD-1 and melanoma M4BEU tumor cells and its mechanism of action appears to be associated with glutathione (GSH) depletion and reactive oxygen species (ROS) production (Legault et al., 2003; Loizzo et al., 2007).

Interestingly, the double-strand repair defective strains did not demonstrate pronounced sensitivity to either *P. gaudichaudianum* essential oil or nerolidol (Figure 5), confirming that the essential oil and nerolidol do not induce double-strand break formation. In Péres et al. (2009), we used the neutral version of the comet assay to demonstrate that the essential oil did not induce any significant increase in the damage index, and this seems to also be true for nerolidol.

While the deletion of TLS and PRR proteins had no influence on sensitivity to *P. gaudichaudianum* essential oil, the *rev1Δ*, *rad30Δ* and *rad18Δ* single mutants exhibited remarkable resistance to nerolidol (Figure 6), suggesting that these pathways can participate in the cytotoxic potential of nerolidol. Because Rad30 (Pol η) can promote error-free replication and the Rev1 protein, which functions in TLS together with Pol ζ , can act in error-free or error-prone pathways (Prakash et al., 2005; Andersen et al., 2008), these results could explain the absence of mutagenesis in the XV185-14c and

N123 strains treated with nerolidol (Table IV and VI); however, more research is needed to affirm that nerolidol enables error-free TLS.

The sensitivity showed by the *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* mutants to *P. gaudichaudianum* essential oil (Figure 7A) is likely due to the absence of Ntg2 because when Ntg2 is absent, the sensitivity increases, which is what occurred with the single *ntg2Δ* and double *ntg1Δntg2Δ* mutants. These data support the involvement of this enzyme in the repair of damage induced by *P. gaudichaudianum* essential oil. Likewise, the Ntg1 and Apn1 enzymes appear to be necessary to remove the lesions induced by nerolidol, as the *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* quadruple mutants showed sensitivity to nerolidol (Figure 7B), as did the *ntg1Δ* and *apn1Δ* single mutants, the *ntg1Δntg2Δ* double mutant and the *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutant.

From our assay of the abilities of *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol to generate ROS, we found that the absence of the superoxide dismutase enzyme increases the sensitivity to the essential oil and nerolidol (Figure 8). This effect was more significant in the *sod1Δ* strain after nerolidol treatment (Figure 8A). The Sod1, copper- and zinc-containing superoxide dismutases provide the primary defense against superoxide damage by catalytically removing it through a disproportionation reaction, and this reaction involves redox cycling at the active copper site (Longo et al., 2008). Additionally, using the DCF assay, we confirmed that *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol are able to produce ROS (Table VII), but the type of ROS produced remains to be determined. An interesting finding indicates that nerolidol could affect mitochondrial function: it decreases HepG2 viability by interfering with the membrane, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP levels (Ferreira et al., 2011).

In conclusion, we showed that *P. gaudichaudianum* essential oil and its major constituent compound nerolidol are not mutagenic but do induce significant cytotoxic effects in *S. cerevisiae* that might be related to ROS generation. Considering the response of Sod-deficient and repair-deficient strains, together with our previous data (Péres et al., 2009), we can also conclude that the cytotoxicity observed is mainly related to the formation of single-strand breaks generated by the presence of oxidative lesions. Moreover, nerolidol is the major compound responsible for the biological effects induced by *P. gaudichaudianum* essential oil.

Conflict of Interest Statement

There are no conflicts of interest involved in this study.

Acknowledgments

Research was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), National Institute for Translational Research on Health and Environment in the Amazon Region (CNPq/MCT, Brazil) and FAPERGS (Fundação e Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul). A.R.M. Sperotto, D.J. Moura and V.F. Péres received fellowships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Ai, Y., Wang, J., Johnson, R. E., Haracska, L., Prakash, L., Zhuang, Z., 2011. A novel ubiquitin binding mode in the *S. cerevisiae* translesion synthesis DNA polymerase η . *Mol. Biosyst.* 6, 1974-1982.
- Andersen, P. L., Xu, F., Xiao, W., 2008. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* 1, 162-173.
- Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. G. B., Santos, A. S. Maia, J. G. S., 1998. Essential oils of *P. gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. DC. *J. Essent. Oil Res.* 10, 465-467.
- Arruda, D. C., D’Alexandri, F. L., Katzin, A. M., Uliana, S. R. B., 2005. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1679-1687.
- Boiteux, S., Guillet, M., 2004. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Armst.)*. 3, 1-12.
- Di Stasi, L. C., Hiruma-Lima, C. A., 2002. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo, pp 604.
- Doetsch, P. W., Morey, N. J., Swanson, R. L., Jinks-Robertson, S., 2001. Yeast base excision repair: interconnections and networks. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 68, 29-39.

- Ferreira, F. M., Palmeira, C. M., Oliveira, M. M., Santos, D., Simões, A. M., Rocha, S. M., Coimbra, M. A., Peixoto, F., 2011. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicol. In Vitro.* 26(2), 189-196.
- Gao, X., Yang, X., Mitrevski, B.S., Marriot, P. J., 2011. Headspace solid-phase microextraction combined with GC x GC-TOFMS for the analysis of volatile compounds of *Coptis* species rhizomes. *J. Sep. Sci.* 34, 1157-1166.
- Gonçalves, O., Pereira, R., Gonçalves, F., Mendo, S., Coimbra, M. A., Rocha, M. R., 2011. Evaluation of the genotoxicity of sesquiterpenic compounds and of their influence on antibiotic susceptibility of two clinically relevant bacteria. *Mutat. Res.* 723, 18-25.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M.E., Bruni, R., 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oil from Easter Ecuador. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 39-48.
- Hawthorne, D. C., 1969. Identification of nonsense codons in yeast. *J. Mol. Biol.* 43, 71-75.
- Klopell, F. C., Lemos, M., Sousa, J. P., Comunello, E., Maistro, E. L., Bastos, J. K., Andrade, S. F., 2007. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculidolia* DC (Asteraceae). *Z. Naturforsch.* 62, 537-542.
- Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D. C. C., Morandim, A. A., Bergamo, D. C. B., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Furlan, M., Guimarães, E. F., Young, M. C. M., Kato, M. J., 2004. Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 67, 1783-1788.
- Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Letizia, C. S., Api, A. M., 2008. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food Chem. Toxicol.* 46, S247-S250.
- Lawrence, C. W., 2004. Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv. Protein Chem.* 69, 167-203.

Lee, S. J., Han, J. I., Lee, G. S., Park, M. J., Ghoi, I. G., Na, K. J., Jeung, E. B., 2007. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a Guinea pig model. Biol. Pharm. Bull. 30, 184-188.

Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Maldemont, J.C., 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as a possible mechanism of action. Planta Med. 69, 402-407.

Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Madelmont, J. C., 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. Planta Med. 69, 402-407.

Lindahl, T., Wood, R. D., 1999. Quality control by DNA repair. Science, 5446, 897-905.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., Menichini, F., 2007a. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. Anticancer Res. 27, 3293-3300.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Statti, G. A., Menichini, F., 2007b. Jacaranone: a cytotoxic constituent from *Senecio ambiguus* subsp. *ambiguus* (biv.) dc. against renal adenocarcinoma ACHN and prostate carcinoma LNCaP cells. Arch. Pharm. Res. 30, 701-707.

Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F., 2007. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. Anticancer Res. 27(5A), 3293-3299.

Longo, V. D., Gralla, E. B., Valentine, J. S., 2008. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. J. Biol. Chem. 21, 12275-12280.

Lopes, N. P., Massuo, M. J., Andrade, E. H. A., Maia, J. G. S., Yoshida, M., Planchart, A. R., Katzin, A. M., 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.)Warb. by Waiãpi Amazon Indians. J. Ethnopharmacol., 67, 313-319.

- Morais, S. M., Facundo, V. A., Bertini, L. M., Cavalcanti, E. S. B., Júnior, J. F. A., Ferreira, S. A., Brito, E. S., Neto, M. A. S., 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 670-675.
- Moreira, D. L., Santos, P. O., Kaplan, M. A. C., Guimarães, E. F., Cardoso, G. L. C., Pereira, N. A., 2001. Estudos fitoquímicos e farmacológico de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). *Rev. Bras. Farm.* 82, 29-32.
- Navarro-Moll, M. C., Romero, M. C., Montilla, M. P., Valero, A., 2011. *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L₃ larvae of *Anisakis* type I. *Exp. Parasitol.* 127, 405-408.
- Pedroso, M.P., Ferreira, E.C., Hantao, L.W., Bogusz Jr., S., Augusto, F., 2011. Identification of volatiles from pineapple (*Ananas comosus* L.) pulp by comprehensive two-dimension gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J.Sep. Sci.* 34, 1547-1554.
- Péres, V. F., Moura, D. J., Sperotto, A. R. M., Damasceno, F. C., Caramão, E. B., Zini, C. A., a Saffi, J., 2009. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2389-2395.
- Pículo, F., Macedo, C. G., Andrade, S. F., Maistro, E. L., 2011. *In vivo* genotoxicity assessment of nerolidol. *J. Appl. Toxicol.* 7, 633-639.
- Poser, G. L. V., Rorig, L. R., Henriques, A. T., Lamaty, G., Menut, C., 1994. Aromatic plants from Brazil. III. The chemical composition of *P. gaudichaudianum* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 6, 337-40.
- Prakash, S., Johnson, R. E., Prakash, L., 2005. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 317-353.
- Prakash, S., Prakash, L., 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.*, 451, 13-24.
- Rorig, L. R., Poser, G. L. V., 1991. Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae. *Rev. Bras. Farm.* 72, 15-17.

Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. G., Dorman, H. J., 2000. Antioxidant and Antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Med.* 8, 687-93.

Schuller, R. C., Von Borstel, R. C., 1974. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation adenine concentration. *Mutat. Res.* 24, 17-23.

Snow, S., 1978. Absence of suppressible alleles at the *his1* locus of yeast. *Mol. Gen. Genet.* 64, 341-342.

Sylvestre, M., Pichette, A., Lavoie, S., Longtin, A., Legault, J., 2007. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. *Phytother. Res.* 21, 536-540.

Tranchida, P.Q., Shellie, R.A., Purcaro, G., Conte, L.S., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., 2010. Analysis of Fresh and aged tea tree essential oils by using GCxGC-qMS. *J. Chrom. Sci.* 48, 262-266.

Von Borstel, R. C., Cain, K. T., Steinberg, C. M., 1971. Inheritance of spontaneous mutability in yeast. *Genetics*, 69, 17-27.

Von Muhlen, C., Zini, C. A., Caramão, E. B., Marriot, P. J., 2008. Comparative study of *Eucalyptus dunnii* volatile oil composition using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight and quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatography A.* 1200, 34-42.

Welke, J.E., Manfroi, V., Zanús, M., Lazarotto, M., Zini, C.A., 2012. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *J. of Chromatography A.* 1226, 124-139.

Williams, A. C., Barry, B. W., 2004. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 56, 603-618.

You, H. J., Swanson, R. L., Harrington, C., Corbett, A. H. Jinks-Robertson, S., Sentürker, S., Wallace, S. S., Boiteux, S., Dizdaroglu, M., Doetsch, P. W., 1999. *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: broad specificity N-glycosylases for the

repair of oxidative DNA damage in the nucleus and mitochondria. *Biochemistry*, 35, 11298-306.

Figure Legends

Fig. 1. GC x GC-TOFMS total ion current chromatogram (TIC) data colour plot of *P. gaudichaudianum* essential oil. Detail of a 2D-GC chromatogram from 6.5 to 45 min.

Fig. 2. Expansion of a part of the GC x GC contour plot of standard nerolidol. (A) Detail of a 2D-GC chromatogram from 23.5 to 25 min. (B) Spectra of a majority peak in the sample, spectra of an identification peak in the standard and in the NIST library, respectively. The experimental conditions are given in the text.

Fig 3. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in BER after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). In detail, the BY4741 and *apn1* Δ strains after nerolidol treatment (C). The survival of the parental strain (BY4741 and SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ntg1 and Ntg2.

Fig. 4. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in NER after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). The survival of the parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the NER endonucleases Rad1 and Rad10.

Fig 5. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in HR and NHEJ after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). In detail, the BY4741, *rad50* Δ and *ku70* Δ strains after nerolidol treatment (C). The survival of the parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the HR protein Rad52 and NHEJ proteins Rad50 and Ku70.

Fig 6. Survival of *S. cerevisiae* strains deficient in TLS after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). In detail, the BY4741 and *rev3* Δ strains after nerolidol treatment (C). The survival of the parental strain (BY4741) is compared to that of variants defective for the TLS proteins Rev1, Rev3, Rad18 and Rad30.

Fig 7. Survival of *S. cerevisiae* quadruple mutant strains deficient in BER, HR, NER and TLS after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). The survival of the parental strain (SJR751) is compared to that of variants defective for the BER proteins Apn1, Ntg1 and Ntg2, the NER protein Rad1, the HR protein Rad52, the NER endonuclease Rad1 and the TLS protein Rev3.

Fig 8. Survival of *S. cerevisiae* single and double mutant strains deficient in superoxide dismutase and/or catalase after treatment with *P. gaudichaudianum* essential oil (A) and nerolidol (B). The survival of the parental strain (SOD) is compared to that of variants defective for the superoxide dismutase proteins Sod1 and Sod2 and the catalase protein Ctt1.

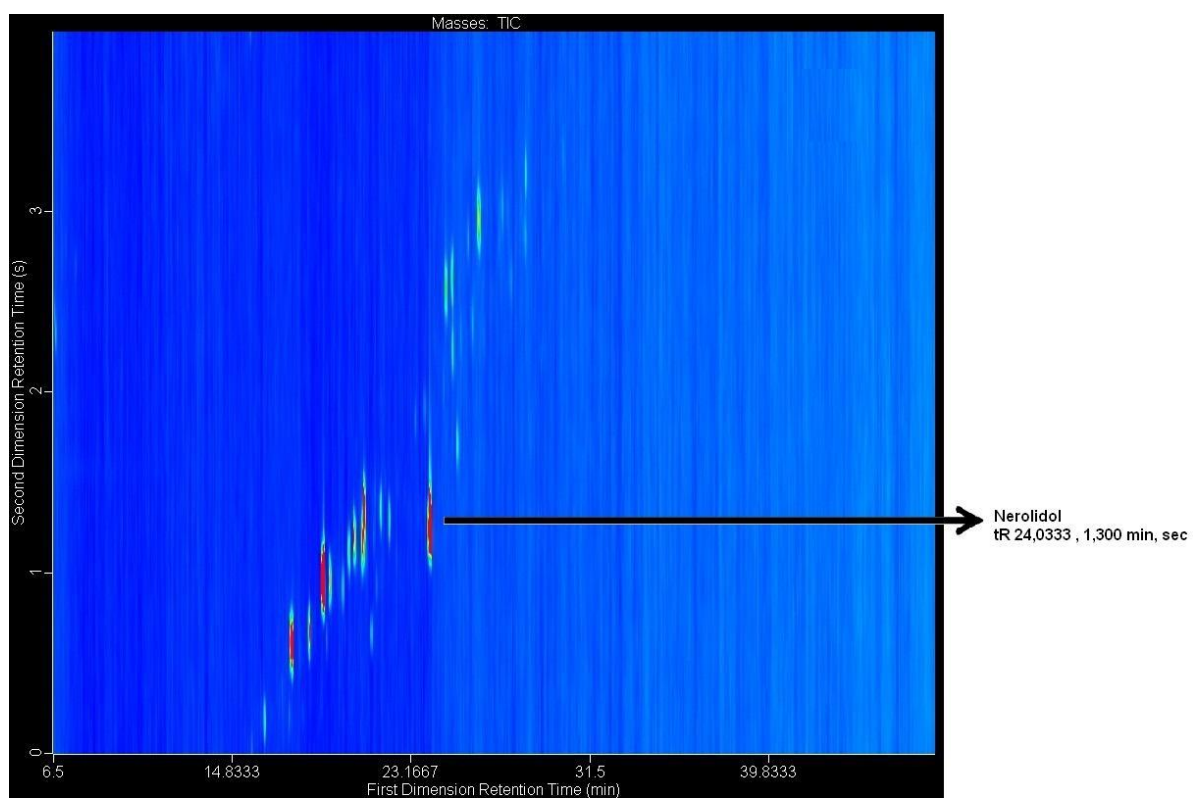
Figure 1.

Figure 2.

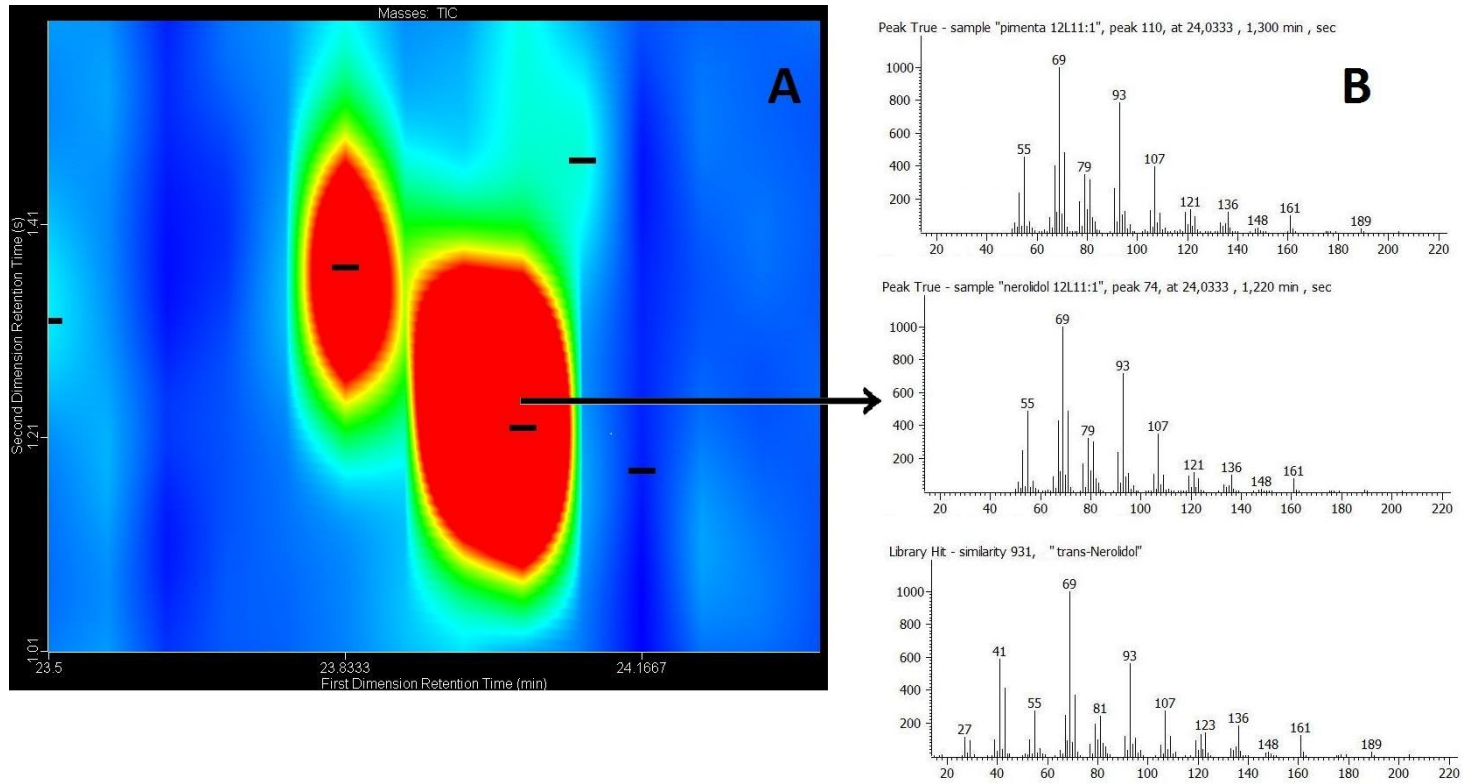


Figure 3.

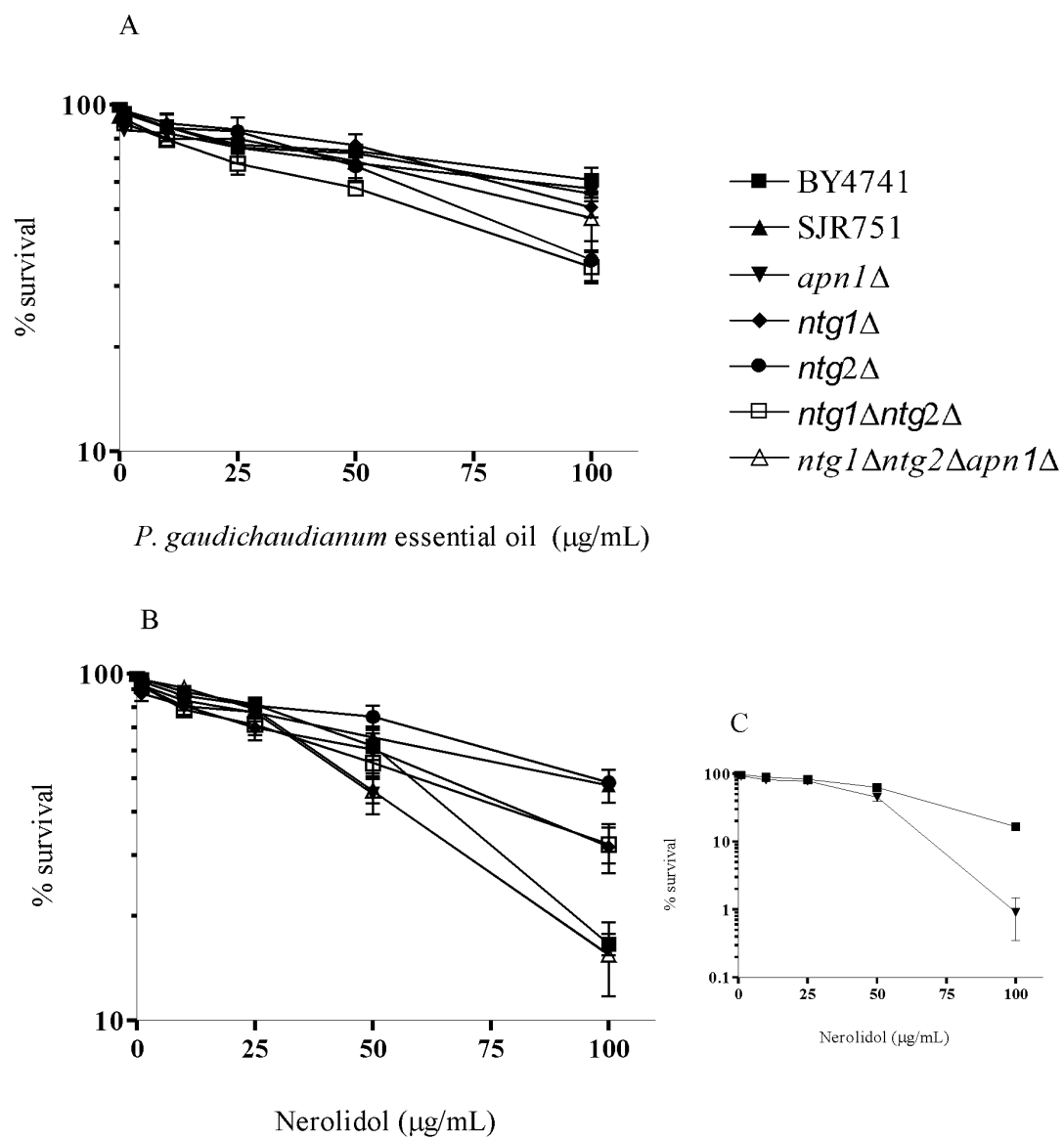


Figure 4.

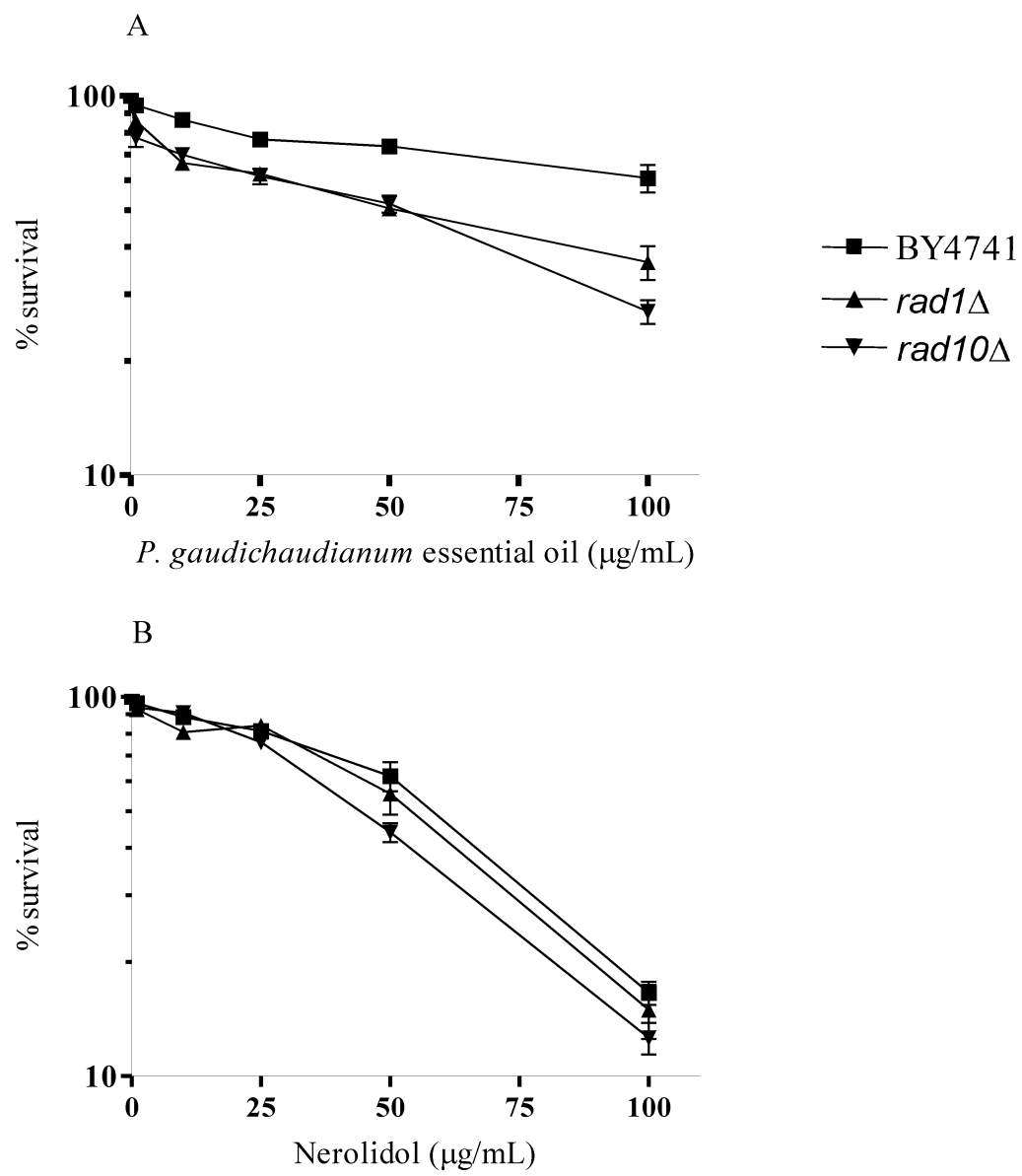


Figure 5.

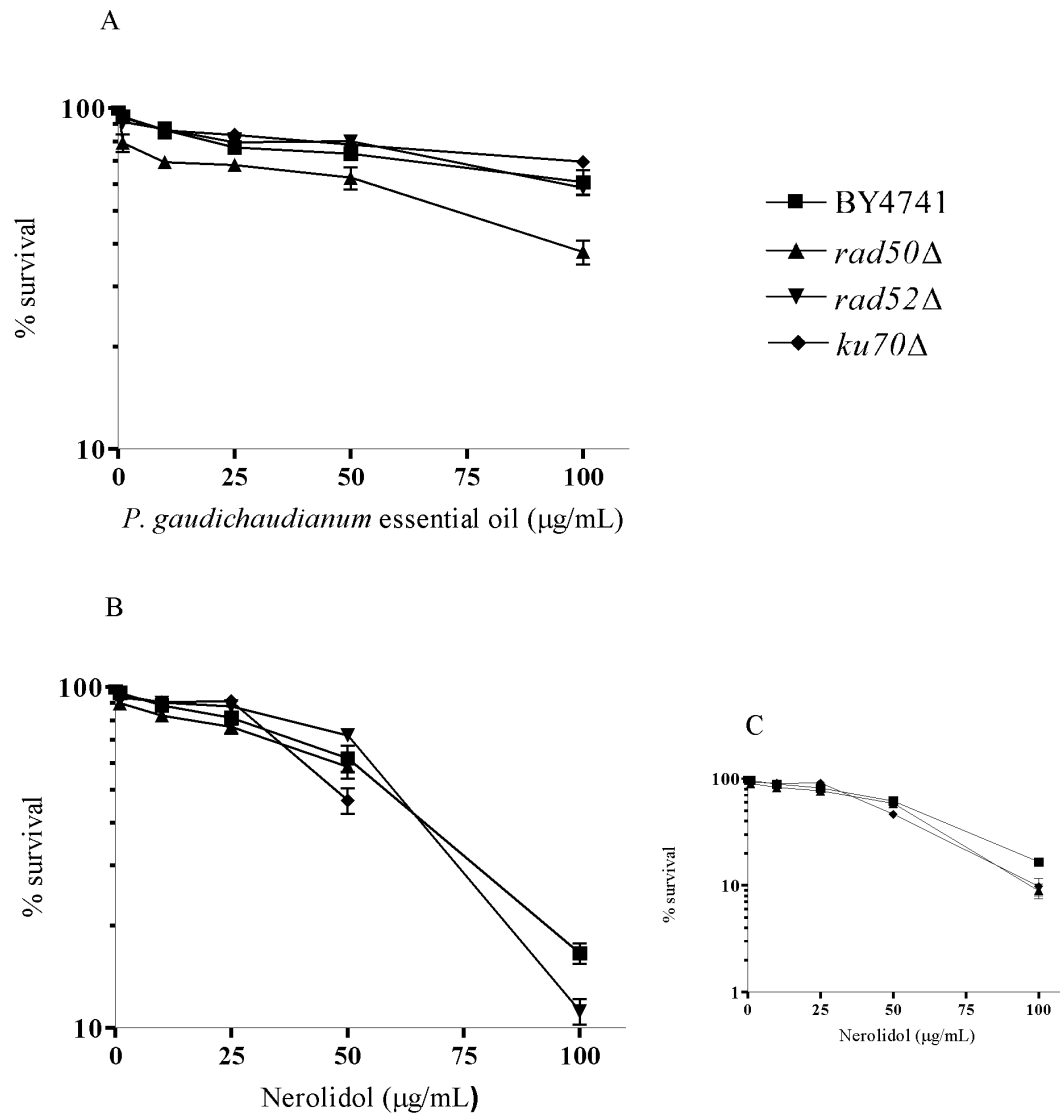


Figure 6.

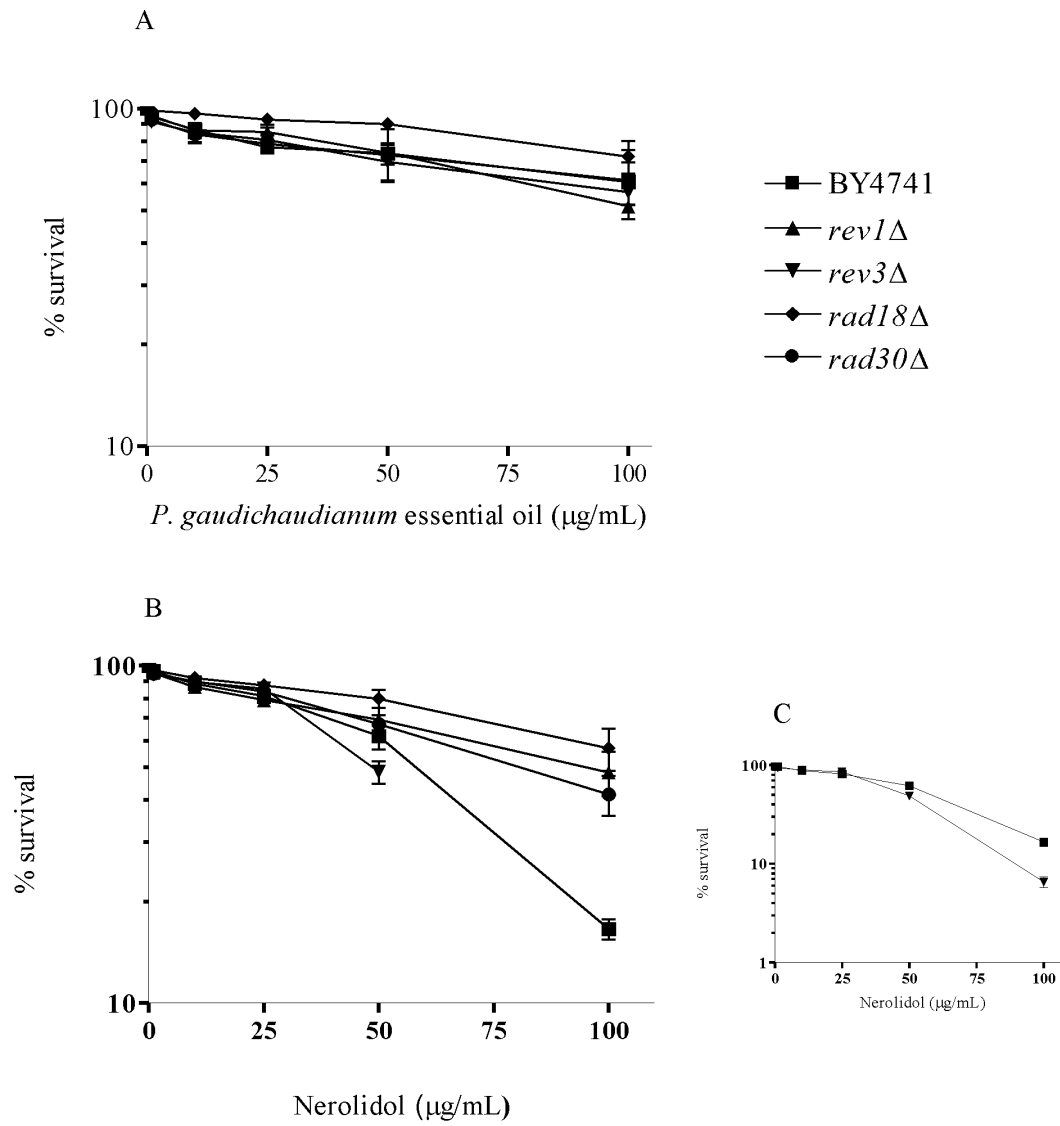


Figure 7.

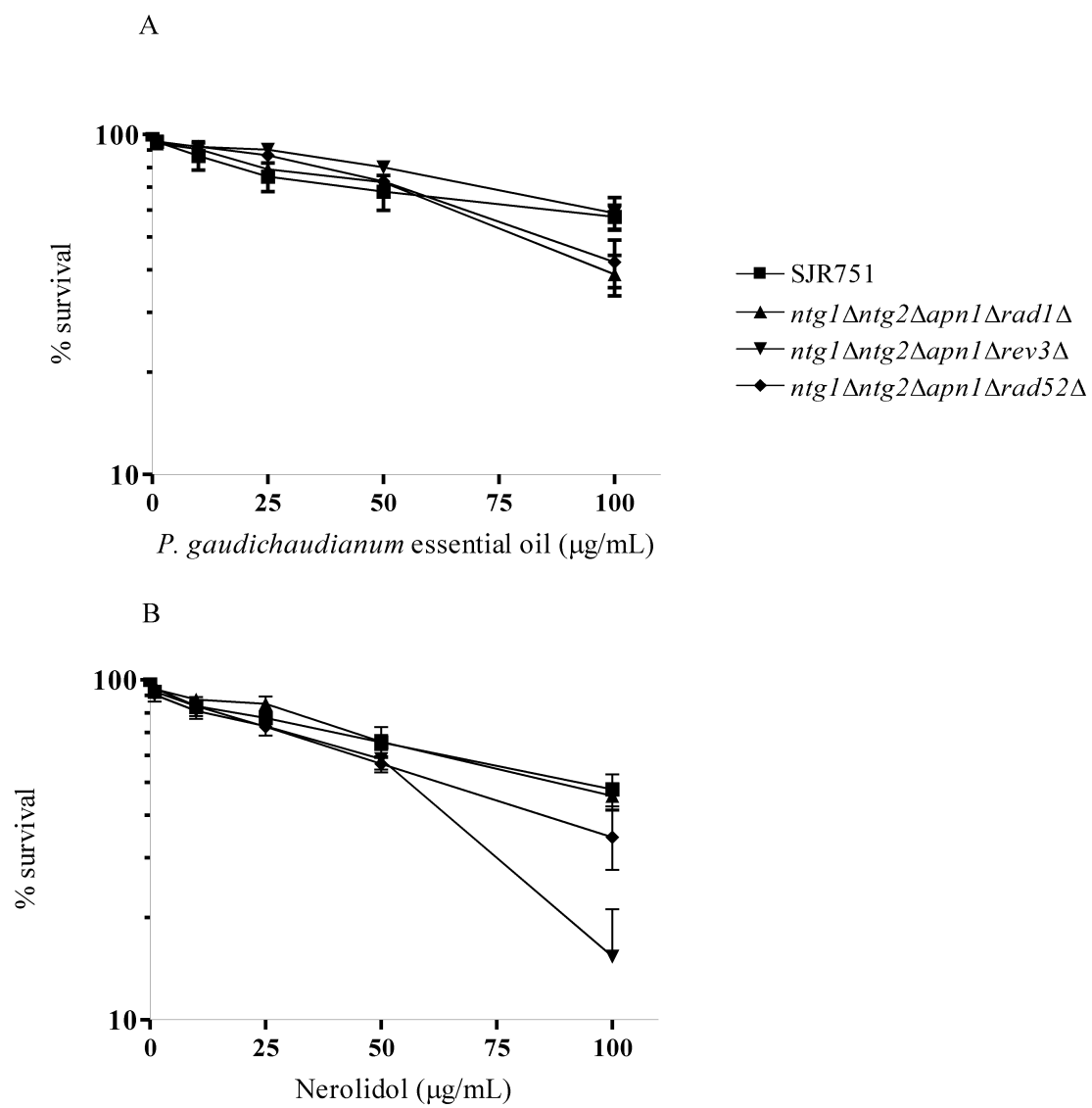


Figure 8.

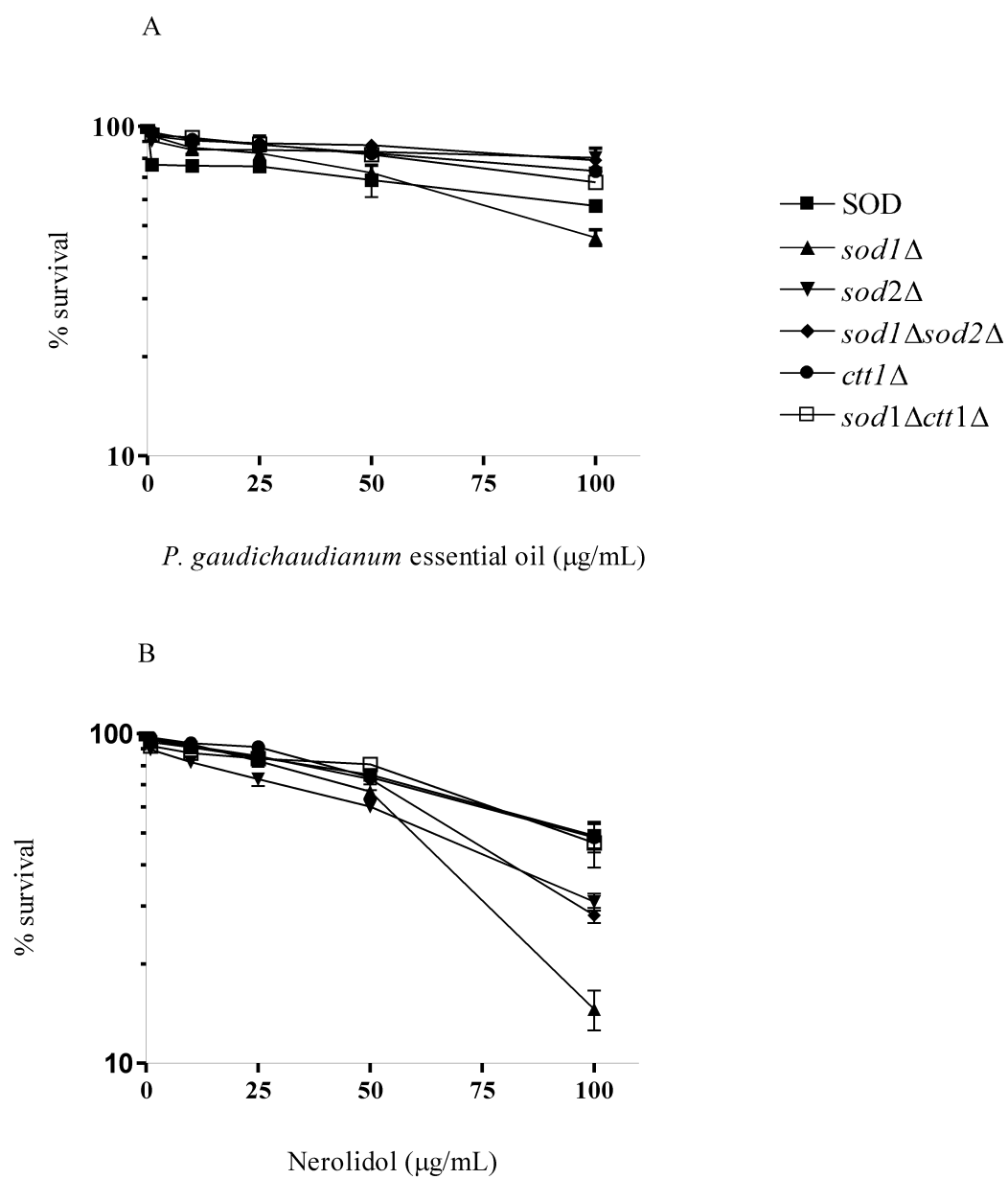


Table I. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study. BER: base excision repair; NER: nucleotide excision repair; HR: homologous recombination; NHEJ: non-homologous end-joining; TLS: translesion synthesis.

Strain	Genotype	DNA repair pathway affected	Source
BY4741 (WT)	<i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	-	Euroscarf ^a
<i>apn1Δ</i>	BY4741; with <i>apn1::kanMX4</i>	BER	Euroscarf
<i>rad1Δ</i>	BY4741; with <i>rad1::kanMX4</i>	NER	Euroscarf
<i>rad10Δ</i>	BY4741; with <i>rad10::kanMX4</i>	NER	Euroscarf
<i>rad18Δ</i>	BY4741; with <i>rad18::kanMX4</i>	PRR	Euroscarf
<i>rad30Δ</i>	BY4741; with <i>rad30::kanMX4</i>	TLS	Euroscarf
<i>rad50Δ</i>	BY4741; with <i>rad50::kanMX4</i>	NHEJ	Euroscarf
<i>rad52Δ</i>	BY4741; with <i>rad52::kanMX4</i>	HR	Euroscarf
<i>rev1Δ</i>	BY4741; with <i>rev1::kanMX4</i>	TLS	Euroscarf
<i>rev3Δ</i>	BY4741; with <i>rev3::kanMX4</i>	TLS	Euroscarf
<i>ku70Δ</i>	BY4741; with <i>ku70::kanMX4</i>	NHEJ	Euroscarf
SJR751 (WT)	<i>MATα</i> ; <i>ade2-101_{oc}</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>ura3ΔNco</i> ; <i>lys2ΔBgl</i> ; <i>leu2-R</i>	-	RL Swanson ^b
<i>ntg1Δ</i>	SJ751; with <i>ntg1::LEU2</i>	BER	RL Swanson
<i>ntg2Δ</i>	SJ751; with <i>ntg2::hisG</i>	BER	RL Swanson
<i>ntg1Δ ntg2Δ</i>	SJ751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i>	BER	RL Swanson
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ</i>	SJ751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3</i>	BER	RL Swanson
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ</i>	SJ751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad1::hisG</i>	BER/NER	RL Swanson
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rev3Δ</i>	SJ751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rev3::kanMX4</i>	BER/TLS	RL Swanson
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad52Δ</i>	SJ751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad52::URA3</i>	BER/HR	RL Swanson
EG103 (SOD-WT)	<i>MATα</i> ; <i>leu2-3 112his3-Δ1 trp1-289 ura3-52</i>	-	E Gralla ^c
EG118 (<i>sod1Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i>	-	E Gralla
EG110 (<i>sod2Δ</i>)	like EG103, except <i>sod2::TRP1</i>	-	E Gralla
EG133 (<i>sod1Δ sod2Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3 e sod2::TRP1</i>	-	E Gralla
EG223 (<i>ctt1Δ</i>)	like EG103, except <i>ctt1::TRP1</i>	-	E Gralla
EG (<i>sod1Δ ctt1Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3 e ctt1::TRP1</i>	-	E Gralla
XV185-14c	<i>MATα</i> ; <i>ade2-2</i> ; <i>arg4-17</i> ; <i>his1-7</i> ; <i>lys1-1</i> ; <i>trp5-48</i> ; <i>hom3-10</i>	-	RC Von Borstel ^d
N123	<i>MATα</i> ; <i>his1-7</i>	-	JAP Henriques ^e

^a Strains obtained from Euroscarf, Frankfurt, Germany; ^b RL Swanson, Atlanta, Georgia, USA; ^c E Gralla, Los Angeles, California, USA; ^d RC Von Borstel, Edmonton, Alberta, Canada; ^e JAP Henriques, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Table II. 56 main volatile components identified in the essential oil of *Piper gaudichaudianum* leaves using GC x GC-TOFMS.

Peak	T _R 1st D* (min)	T _R 2nd D** (min)	Compound name	Library formula	Library CAS#	Library molecular weight	Library Similarity	Library reverse match factor	Precent Response
1	6,70	2,35	limonene	C ₁₀ H ₁₆	138-86-3	136	883	886	0,05
2	7,63	2,72	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	22564-99-4	154	874	876	0,04
3	9,63	3,72	terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	10482-56-1	154	857	882	0,01
4	15,90	0,04	α-copaene	C ₁₅ H ₂₄	3856-25-5	204	908	910	0,01
5	16,50	0,21	β-elemene	C ₁₅ H ₂₄	515-13-9	204	916	939	0,71
6	17,30	0,37	α-gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	489-40-7	204	887	890	0,14
7	17,63	0,23	α-santalene	C ₁₅ H ₂₄	512-61-8	204	882	883	0,33
8	17,63	0,58	aristolene	C ₁₅ H ₂₄	27862-07-3	204	841	850	0,02
9	17,77	0,66	<i>E</i> -caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5	204	966	966	7,51
10	18,10	0,60	β-copaene	C ₁₅ H ₂₄	18252-44-3	204	894	897	0,20
11	18,23	0,54	γ-elemene	C ₁₅ H ₂₄	339154-91-5	204	862	862	0,06
12	18,30	0,25	trans-α-bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	26560-14-5	204	893	901	0,23
13	18,57	0,69	aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	489-39-4	204	927	927	2,92
14	19,03	0,90	trans-muurolo-3,5-diene	C ₁₅ H ₂₄	189165-77-3	204	787	820	0,06
15	19,30	1,02	α-humulene	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	204	923	924	21,32
16	19,43	0,64	β-santalene	C ₁₅ H ₂₄	511-59-1	204	903	903	1,08
17	19,57	0,98	alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	25246-27-9	204	928	933	3,28
18	19,90	0,98	drima-7,9(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	0-00-0	204	899	899	0,34
19	20,10	0,94	γ-gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	22567-17-5	204	821	821	0,23
20	20,17	0,96	γ-muuroloene	C ₁₅ H ₂₄	30021-74-0	204	861	863	0,85
21	20,23	0,67	γ-curcumene	C ₁₅ H ₂₄	28976-68-3	204	799	800	0,12
22	20,37	2,35	germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	23986-74-5	204	827	914	0,03
23	20,70	1,22	β-selinene	C ₁₅ H ₂₄	17066-67-0	204	919	919	3,43
24	21,10	1,20	α-selinene	C ₁₅ H ₂₄	473-13-2	204	925	927	2,67
25	21,17	1,38	bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	24703-35-3	204	923	923	13,16
26	21,23	1,13	α-muuroloene	C ₁₅ H ₂₄	31983-22-9	204	853	855	0,73
27	21,50	0,68	<i>E,E</i> -α-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	502-61-4	204	928	930	1,31

28	21,57	1,21	δ -amorphene	C ₁₅ H ₂₄	189165-79-5	204	854	854	0,21
29	21,57	1,40	germacreno A	C ₁₅ H ₂₄	28387-44-2	204	835	837	0,12
30	21,70	0,95	β -curcumene	C ₁₅ H ₂₄	28976-67-2	204	818	820	0,52
31	21,90	1,37	γ -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	39029-41-9	204	893	893	1,27
32	22,10	1,52	7-epi- α -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	123123-37-5	204	812	812	0,16
33	22,30	1,32	δ -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	483-76-1	204	901	903	1,47
34	22,43	1,49	zonarene	C ₁₅ H ₂₄	95910-36-4	204	820	888	0,01
35	22,70	1,07	γ -E-bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	53585-13-0	204	851	851	0,21
36	22,97	1,45	α -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	82468-90-4	204	846	846	0,15
37	23,23	2,44	α -colacorene	C ₁₅ H ₂₀	21391-99-1	200	884	884	0,16
38	23,57	1,84	elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	639-99-6	222	839	840	0,27
39	23,97	1,93	germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	15423-57-1	204	882	886	0,37
40	24,03	1,30	<i>E</i> -nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	142-50-7	222	931	919	22,06
41	24,50	1,87	ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	577-27-5	222	824	850	0,04
42	25,03	2,55	spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	77171-55-2	220	867	879	1,97
43	25,23	2,69	caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	220	861	865	0,01
44	25,30	2,65	globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	51371-47-2	222	810	810	0,16
45	26,23	2,36	viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	552-02-3	222	822	833	0,18
46	26,50	2,97	humulene epoxide II	C ₁₅ H ₂₄ O	19888-34-7	220	835	836	2,27
47	26,77	2,30	1,10-di-epi-cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	73365-77-2	222	824	824	0,09
48	27,63	2,91	epoxy-allo alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄ O	85760-81-2	220	758	818	0,00
			caryophylla-4(14),8(15)-dien-5- α -						
49	27,77	3,04	ol	C ₁₅ H ₂₄ O	147235-15-2	220	867	870	0,15
50	28,03	3,22	α -muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	19912-62-0	222	732	903	0,02
51	28,63	2,87	α -cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	481-34-5	222	816	818	0,26
52	28,70	3,19	intermedeol	C ₁₅ H ₂₆ O	5945-72-2	222	862	862	0,45
53	29,37	2,23	α -bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	15352-77-9	222	827	827	0,18
54	29,90	3,30	Z- α -trans-bergamotol	C ₁₅ H ₂₄ O	88034-74-6	220	764	770	0,09
55	30,17	2,34	α -bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	515-69-5	222	734	874	0,02
56	30,43	3,30	Z,E-farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	3790-71-4	222	785	786	0,12
									93,86

* T_R 1st D – Retention times on the first dimension. ** T_R 2st D – Retention times on the second dimension

Table III. Reversion of point mutation for (*his1-7*), ochre allele (*lys1-1*), and frameshift mutations (*hom3-10*) in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after *P. gaudichaudianum* essential oil treatment at 30°C for 18 h.

Agent	Treatment	Survival (%)	LYS1/10 ⁷ survivors ^b	HIS1/10 ⁷ survivors ^a	HOM3/10 ⁷ survivors ^a
Treatment of stationary-phase cells under non-growth conditions					
NC ^c	0	100.00 (231)	1.66 ± 0.44 (37)	1.65 ± 0.167 (43)	0.94 ± 0.25 (21)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	59.46 ± 3.46 (137)***	22.84 ± 0.34 (311)***	35.12 ± 3.23 (426)***	21.56 ± 3.59 (287)***
Essential oil	1 µg/mL	96.81 ± 2.37 (221)	1.83 ± 0.76 (40)	2.13 ± 0.55 (43)	1.06 ± 0.34 (22)
	10 µg/mL	89.30 ± 2.10 (209)	1.82 ± 0.43 (37)	2.42 ± 0.31 (45)	1.32 ± 0.47 (26)
	25 µg/mL	73.07 ± 0.53 (169)	2.57 ± 0.72 (42)	2.61 ± 0.34 (45)	1.66 ± 0.34 (28)
	50 µg/mL	62.20 ± 1.67 (143)*	3.44 ± 1.02 (47)	2.99 ± 1.04 (45)	1.93 ± 0.19 (27)
	100 µg/mL	46.12 ± 5.83 (106)**	4.89 ± 0.93 (53)	3.85 ± 1.41 (38)	2.21 ± 0.20 (24)
Treatment of exponential-phase cells under non-growth conditions					
NC ^c	0	100.00 (191)	1.64 ± 0.15 (32)	1.46 ± 0.26 (25)	1.42 ± 0.53 (21)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	49.59 ± 2.60 (93)***	19.04 ± 5.76 (207)***	29.82 ± 3.31 (277)***	25.13 ± 5.15 (24)***
Essential oil	1 µg/mL	89.96 ± 1.43 (173)	2.17 ± 0.64 (35)	1.93 ± 0.34 (29)	1.77 ± 0.59 (23)
	10 µg/mL	78.60 ± 1.89 (149)	2.69 ± 0.166 (39)	2.40 ± 0.38 (32)	1.56 ± 0.16 (27)
	25 µg/mL	73.19 ± 0.98 (141)	3.05 ± 0.33 (40)	2.15 ± 0.65 (30)	2.08 ± 0.35 (27)
	50 µg/mL	56.91 ± 3.62 (105)*	4.27 ± 0.83 (40)	3.02 ± 0.76 (27)	2.17 ± 0.75 (24)
	100 µg/mL	22.15 ± 2.53 (43)***	6.97 ± 0.27 (31)*	4.75 ± 1.16 (19)	5.29 ± 0.69 (25)
Treatment under growth conditions					
NC ^c	0	100.00 (409)	1.76 ± 0.45 (70)	1.49 ± 0.32 (59)	1.21 ± 0.29 (47)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	36.88 ± 2.57 (149)***	39.9 ± 2.56 (454)***	25.32 ± 3.91 (386)***	27.86 ± 2.88 (245)***
Essential oil	1 µg/mL	83.41 ± 2.17 (342)	3.02 ± 1.10 (95)	1.74 ± 0.58 (65)	1.5 ± 0.68 (49)
	10 µg/mL	75.67 ± 3.28 (306)	4.02 ± 1.00 (117)	1.98 ± 0.94 (68)	1.68 ± 0.41 (51)
	25 µg/mL	64.61 ± 0.34 (264)	5.33 ± 1.65 (134)	2.43 ± 0.90 (71)	1.67 ± 0.44 (46)
	50 µg/mL	42.15 ± 2.59 (170)**	9.63 ± 1.68 (161)*	2.83 ± 1.00 (52)	2.25 ± 1.14 (42)
	100 µg/mL	12.20 ± 2.97 (48)***	22.34 ± 2.97 (105)**	5.42 ± 0.50 (26)	3.79 ± 0.78 (19)

Data represented as mean ± S.D. from three independent experiments (values in parentheses in columns 3–6 refers to number of colonies); Significantly different in relation to the negative control group at *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 by one-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test.

^a Locus-specific revertants. ^b Locus non-specific revertants (forward mutation). ^c Negative control (solvent; DMSO). ^d Positive control: 4-NQO treatment at 0.5 µg/ml.

Table IV. Reversion of point mutation for (*his1-7*), ochre allele (*lys1-1*), and frameshift mutations (*hom3-10*) in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after nerolidol treatment at 30°C for 18 h.

Agent	Treatment	Survival (%)	LYS1/10 ⁷ survivors ^b	HIS1/10 ⁷ survivors ^a	HOM3/10 ⁷ survivors ^a
Treatment of stationary-phase cells under non-growth conditions					
NC ^c	0	100.00 (269)	1.40 ± 0.59 (31)	2.35 ± 1.14 (55)	1.87 ± 1.00 (34)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	56.56 ± 2.36(153)***	16.87 ± 2.22 (247)***	20.30 ± 2.05 (305)***	14.18 ± 2.00 (209)***
Nerolidol	1 µg/mL	91.98 ± 2.09(246)	1.76 ± 0.74 (31)	2.87 ± 1.12(63)	14.18 ± 2.00 (33)
	10 µg/mL	79.26 ± 4.88 (210)	2.42 ± 0.84 (40)	3.92 ± 1.46 (75)	2.15 ± 0.91 (33)
	25 µg/mL	70.19 ± 4.33 (189) *	2.16 ± 0.53 (37)	4.34 ± 1.16 (79)	1.97 ± 0.47 (23)
	50 µg/mL	43.90 ± 4.52(121)***	1.16 ± 0.99 (14)	4.33 ± 0.91 (66)	1.77 ± 0.03 (12)
	100 µg/mL	8.98 ± 2.38 (106)***	0.24 ± 0.22 (5)	5.41 ± 0.99 (32)	0.42 ± 0.20 (2)
Treatment of exponential-phase cells under non-growth conditions					
NC ^c	0	100.00 (194)	1.63 ± 0.28 (32)	1.49 ± 0.29 (29)	1.33 ± 0.08 (26)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	54.40 ± 4.18 (106)***	16.06 ± 4.29 (164)***	20.04 ± 5.81(203)***	13.68 ± 2.12 (145)***
Nerolidol	1 µg/mL	86.59 ± 2.26 (169)	2.33 ± 0.14 (39)	2.23 ± 0.58 (37)	1.60 ± 0.30 (27)
	10 µg/mL	80.67 ± 2.13 (157)	2.59 ± 0.11 (41)	2.53 ± 0.76 (39)	1.17 ± 0.15 (18)
	25 µg/mL	64.71 ± 2.10 (126)*	2.66 ± 0.16 (34)	3.24 ± 0.57 (40)	0.94 ± 0.16 (11)
	50 µg/mL	35.33 ± 4.01 (69)***	3.59 ± 1.08 (24)	4.85 ± 1.03 (32)	0.96 ± 0.42 (6)
	100 µg/mL	5.22 ± 1.35 (11)***	4.23 ± 2.20 (5)	5.09 ± 0.95 (6)	0.64 ± 1.11 (1)
Treatment under growth conditions					
NC ^c	0	100.00 (309)	1.00 ± 0.33 (45)	1.62 ± 0.79 (59)	1.0 ± 0.42 (28)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	38.63 ± 2.38 (120) ***	17.76 ± 6.20 (239)***	20.11 ± 1.71 (386)***	14.72 ± 3.06 (170)***
Nerolidol	1 µg/mL	87.07 ± 0.923 (270)	1.59 ± 0.42 (49)	2.01 ± 0.87 (65)	1.14 ± 0.50 (28)
	10 µg/mL	76.56 ± 1.54 (237)*	1.78 ± 0.39 (51)	2.27 ± 0.59 (68)	1.46 ± 0.40 (33)
	25 µg/mL	58.30 ± 3.62 (180)**	2.07 ± 0.47 (46)	2.77 ± 1.01 (71)	1.85 ± 0.57 (20)
	50 µg/mL	34.01 ± 5.22 (102) ***	1.62 ± 0.74 (38)	3.68 ± 0.66 (52)	2.26 ± 1.17 (22)
	100 µg/mL	2.51 ± 1.99 (7) ***	1.11 ± 1.92 (3)	4.86 ± 1.59 (26)	4.05 ± 0.63 (3)

Data represented as mean ± S.D. from three independent experiments (values in parentheses in columns 3–6 refers to number of colonies); Significantly different in relation to the negative control group at *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 by one-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test.

^aLocus-specific revertants. ^bLocus non-specific revertants (forward mutation). ^cNegative control (solvent; DMSO). ^dPositive control: 4-NQO treatment at 0.5 µg/ml.

Table V. Induction of forward mutation (*CANI*) in N123 strain of *S. cerevisiae* after *P. gaudichaudianum* essential oil treatment at 30°C for 18 h.

Agent	Treatment	Survival (%)	Mutants (10 ⁷ survivors)
Treatment of stationary-phase cells under non-growth conditions			
NC ^c	0	100.00 ± (57)	5.22 ± 2.68 (30)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	39.91 ± 1.69 (26)***	78.50 ± 5.72 (169)***
Essential oil	1 µg/mL	98.35 ± 0.59 (56)	5.41 ± 3.36 (32)
	10 µg/mL	94.98 ± 3.57 (54)	5.59 ± 3.27 (28)
	25 µg/mL	91.78 ± 1.81 (52)	6.33 ± 3.87 (33)
	50 µg/mL	80.46 ± 5.33 (47)	7.17 ± 4.58 (32)
	100 µg/mL	68.52 ± 3.30 (39)**	8.79 ± 6.10 (34)
Treatment of exponential-phase cells under non-growth conditions			
NC ^c	0	100.00 (37)	5.32 ± 1.93 (21)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	30.08 ± 5.30 (12)***	81.79 ± 4.70 (94)***
Essential oil	1 µg/mL	95.91 ± 2.65 (36)	5.59 ± 2.04 (21)
	10 µg/mL	89.36 ± 3.33 (35)	5.94 ± 1.63 (20)
	25 µg/mL	84.70 ± 1.19 (32)	6.346 ± 2.36 (21)
	50 µg/mL	79.74 ± 2.96 (30)	6.49 ± 0.219 (20)
	100 µg/mL	59.53 ± 3.65 (23)**	6.29 ± 3.14 (15)
Treatment under growth conditions			
NC ^c	0	100.00 (45)	4.32 ± 1.84 (19)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	28.00 ± 2.37 (13)***	96.95 ± 1.10 (121)***
Essential oil	1 µg/mL	96.32 ± 2.97 (43)	4.63 ± 2.19 (20)
	10 µg/mL	93.86 ± 2.91 (42)	5.72 ± 2.70 (24)
	25 µg/mL	88.27 ± 3.38 (39)	5.51 ± 3.05 (21)
	50 µg/mL	69.36 ± 2.74 (31)	6.72 ± 2.43 (21)
	100 µg/mL	48.10 ± 1.27 (22)**	8.55 ± 2.09 (19)

Data represented as mean ± S.D. from three independent experiments (values in parentheses in columns 3 and 4 refers to number of colonies); Significantly different in relation to the negative control group at *P < 0.05; **P < 0.01/ ***P < 0.001 by one-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test. ^a Negative control (solvent; DMSO). ^b Positive control: 4-NQO treatment at 0.5 µg/ml.

Table VI. Induction of forward mutation (*CANI*) in N123 strain of *S. cerevisiae* after nerolidol treatment at 30°C for 18 h.

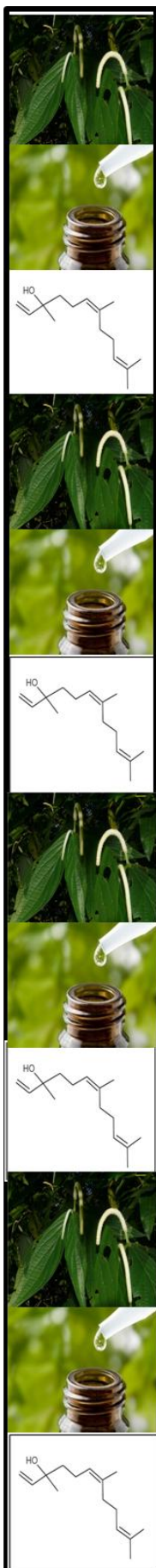
Agent	Treatment	Survival (%)	Mutants (10 ⁷ survivors)
Treatment of stationary-phase cells under non-growth conditions			
NC ^c	0	100.00 (91)	2.22 ± 0.70 (27)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	33.48 ± 3.02 (31)***	64.74 ± 3.20 (198)***
Nerolidol	1 µg/mL	89.16 ± 2.29 (82)	2.46 ± 0.93 (25)
	10 µg/mL	77.12 ± 3.30 (71)	3.18 ± 1.04 (24)
	25 µg/mL	64.34 ± 2.92 (58)*	3.22 ± 1.28 (22)
	50 µg/mL	39.94 ± 3.39 (38)***	3.63 ± 1.37 (13)
	100 µg/mL	11.41 ± 3.64 (12)***	3.62 ± 1.79 (4)
Treatment of exponential-phase cells under non-growth conditions			
NC ^c	0	100.00 (64)	3.00 ± 0.58 (19)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	26.83 ± 2.71 (18)***	60.33 ± 1.59 (105)***
Nerolidol	1 µg/mL	87.77 ± 1.63 (57)	2.89 ± 0.64 (17)
	10 µg/mL	75.39 ± 2.75 (49)	3.35 ± 1.03 (16)
	25 µg/mL	57.49 ± 0.17 (37)**	4.07 ± 0.88 (14)
	50 µg/mL	38.09 ± 2.52 (25)***	5.13 ± 0.83 (13)
	100 µg/mL	7.03 ± 0.89 (5)***	4.84 ± 0.26 (2)
Treatment under growth conditions			
NC ^c	0	100.00 (107)	2.90 ± 0.48 (30)
4-NQO ^d	0.5 µg/mL	20.49 ± 1.45 (22)***	80.55 ± 4.95 (175)***
Nerolidol	1 µg/mL	86.08 ± 2.25 (92)	3.29 ± 0.65 (29)
	10 µg/mL	73.14 ± 4.17 (79)	3.80 ± 0.68 (29)
	25 µg/mL	64.21 ± 4.12 (69)*	3.75 ± 1.12 (24)
	50 µg/mL	34.41 ± 3.74 (37)***	3.90 ± 0.78 (13)
	100 µg/mL	6.62 ± 1.39 (8)***	4.84 ± 1.24 (3)

Data represented as mean ± S.D. from three independent experiments (values in parentheses in columns 3 and 4 refers to number of colonies); Significantly different in relation to the negative control group at *P < 0.05; **P < 0.01/ ***P < 0.001 by one-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test. ^a Negative control (solvent; DMSO). ^b Positive control: 4-NQO treatment at 0.5 µg/ml.

Table VII. Effects of *P. gaudichaudianum* essential oil and nerolidol on the ROS production in SOD strains.

Treatment	Concentration	DCF fluorescence (% of control) in SOD-WT strain ^c	DCF fluorescence (% of control) in <i>sod1Δ</i> strain ^c	DCF fluorescence (% of control) in <i>sod2Δ</i> strain ^c
NC ^a		100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
H ₂ O ₂ ^b	4 mM	141.35 ± 2.83*	185.95 ± 9.93**	197.55 ± 19.43**
<i>P. gaudichaudianum</i> essential oil	1 µg/mL	105.53 ± 9.58	108.26 ± 16.30	107.21 ± 10.20
	10 µg/mL	111.52 ± 12.14	122.81 ± 18.89	110.01 ± 7.62
	25 µg/mL	112.88 ± 5.56	124.64 ± 14.24	112.86 ± 0.79
	50 µg/mL	115.01 ± 8.01	127.35 ± 1.91	108.45 ± 15.37
	100 µg/mL	128.63 ± 5.51*	130.74 ± 0.34*	119.98 ± 14.94
Nerolidol	1 µg/mL	115.47 ± 10.34	122.56 ± 16.31	109.46 ± 7.01
	10 µg/mL	114.45 ± 10.28	137.91 ± 14.23	110.97 ± 6.26
	25 µg/mL	123.90 ± 27.27	130.47 ± 11.07	112.95 ± 6.48
	50 µg/mL	125.95 ± 2.308	131.51 ± 7.79	125.40 ± 12.09
	100 µg/mL	140.21 ± 12.79*	173.20 ± 12.59**	147.69 ± 7.43*

^a Negative control (solvent; DMSO); ^b Positive control: H₂O₂ treatment at 5 mM; ^c Mean and standard deviation of three independent experiments. Data are expressed as percentages of control values.* Data significant in relation to negative control at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ by One Way Anova followed by Dunnett's Multiple comparison Test.



DISCUSSÃO

Discussão Geral

A utilização de plantas com propriedades medicinais e os conhecimentos com tais práticas são umas das mais antigas formas de terapia medicinal da humanidade. As plantas, atualmente, são uma das principais fontes para obtenção de novas moléculas com potencial terapêutico. Entretanto somente uma pequena parcela dessas plantas possui estudos científicos que comprovem sua utilização etnofarmacológica (Rodrigues *et al.*, 2011). As plantas produzem uma série de substâncias que podem ser apontados como potenciais agentes farmacológicos, entre estes, os óleos essenciais encontram-se em destaque.

Os óleos essenciais são hoje amplamente utilizados na indústria química e farmacêutica, como por exemplo, em cosméticos, produtos de higiene e detergentes, bem como em tratamentos fitoterápicos. No entanto, as informações sobre a toxicidade de óleos essenciais e seus componentes são freqüentemente ausentes (Lapczynski *et al.*, 2008). Com o objetivo de aprofundar o conhecimento biológico do óleo essencial da *P. gaudichaudianum*, espécie utilizada pelos povos da Mata Atlântica do Brasil como antiinflamatória, e seu composto majoritário nerolidol, avaliamos nesse estudo a resposta citotóxica e mutagênica utilizando diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Como demonstrado no Capítulo I o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* apresentou efeitos citotóxicos para as linhagens XV185-14c e N123, entretanto induziu efeito mutagênico somente no locus *lysI* (mutação locus específica com alteração para o códon UAA de término de cadeia), conforme verificado na linhagem XV185-14c, em altas concentrações (Tabela III - Capítulo I). Os efeitos citotóxicos do nerolidol foram mais pronunciados em comparação com o óleo essencial nessas linhagens, porém este sesquiterpeno não induziu qualquer tipo de efeito mutagênico (Tabela IV - Capítulo I). Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o nerolidol não apresenta efeitos mutagênicos, utilizando diferentes modelos biológicos (micronúcleos em mamíferos e teste de Ames utilizando as linhagens TA100 e TA98), entretanto, efeitos genotóxico e clastogênico foram descritos (Gonçalves *et al.*, 2011; Pículo *et al.*, 2011). Em relação ao óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, em um estudo prévio demonstrado a habilidade do mesmo de induzir aumento da frequência de micronúcleos em células V79, o que pode ser um indicativo de interação com o DNA, o

que justificaria a reversão da mutação do locus da *lys* observada neste estudo. Entretanto, é provável que esta interação com o DNA seja indireta.

Para testar estas hipóteses de efeito direto ou indireto no DNA, neste trabalho avaliamos a sensibilidade do óleo essencial e do nerolidol em cepas de *S. cerevisiae* deficientes em vias de reparo do DNA. Nossos resultados mostraram que o simples mutante *ntg2Δ* e o duplo mutante *ntg1Δntg2Δ* apresentaram sensibilidade após o tratamento com o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* (Figura 3A, Capítulo I), enquanto nos tratamentos com o nerolidol houve um aumento de sensibilidade nos simples mutantes *ntg1Δ* e *apn1Δ*, duplo mutante *ntg1Δntg2Δ* e triplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δ* (Figura 3B, Capítulo I). Ntg1 e Ntg2 possuem atividades de DNA glicosilase que remove purinas e pirimidinas danificadas, gerando sítios AP, e de liases, que processam os sítios AP, no entanto, Ntg1 e Ntg2 apresentam especificidades de substrato diferentes; diferenciam-se pela localização (Ntg1 é encontrada no núcleo e mitocôndria, enquanto que Ntg2 atua somente no núcleo). Apn1 é a principal endonuclease de *S. cerevisiae* responsável pelo processamento de sítios AP gerados pela remoção de bases danificadas ou errôneas, e na sua ausência, ocorre o acúmulo desses sítios, os quais são altamente tóxicos à célula, uma vez que podem ser convertidos em quebras de DNA (Meadows *et al.*, 2003 ; Boiteaux e Guiller, 2004). Em razão destes resultados, pode-se afirmar que os tratamentos, tanto com o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* quanto com o nerolidol, induzem algum tipo de lesão oxidativa às bases nitrogenadas do DNA, o qual necessita da participação de enzimas da via BER para a remoção dos produtos de oxidação e correção dos sítios abásicos (Matuo *et al.*, 2010; Boesch *et al.*, 2011).

Através de co-relação estatística dos resultados obtidos no trabalho publicado pelo grupo (Péres *et al.*, 2009), levantou-se a hipótese que a causa da citotoxicidade (avaliada utilizando três ensaios diferentes: sobrevivência clonogênica, MTT e azul de tripan), se deve a formação de quebras simples e quebras em sítios abásicos (alcalilábeis), assim como o aumento da frequência de micronúcleos eram consequência da geração de ERO, induzida pelo óleo, de forma que foi detectado em células de mamíferos um aumento da peroxidação lipídica após o tratamento com o óleo essencial. Estes dados juntamente com os dos mutantes da via BER corroboram com esta hipótese, pois estão envolvidos na reparação de bases oxidadas, conforme

mencionado no parágrafo anterior. O óleo essencial induziu sensibilidade nos mutantes da via NER (Figura 4, Capítulo I), o que pode indicar que esta via possa atuar em conjunto com o BER nas lesões induzidas pelo mesmo, como por exemplo, nos casos das lesões oxidativas do tipo timina glicol e 8-oxiguanina (Boitex e Guiller, 2004). De forma contrária, nenhuma sensibilidade nos mutantes NER foi observada para o nerolidol. Esta resposta diferente para o óleo essencial e nerolidol também foi observada nos mutantes das vias TLS e PRR (Figura 6, capítulo I). Enquanto nenhuma sensibilidade nos mutantes desta via foi observada ao óleo essencial de *P. Gaudichaudianum*, o nerolidol exibiu uma notável resistência para os simples mutantes *rev1Δ*, *rad30Δ* e *rad18Δ*, sugerindo que estas vias podem participar no potencial citotóxico do nerolidol. A complexa composição do óleo essencial certamente justifica esta diferença nas respostas, pois além do nerolidol, seu componente majoritário representando 22,06% da sua composição, o óleo ainda apresenta outros três outros sesquiterpenos em quantidades significativas (α -humuleno representando 21,32% da composição, biciclogermacreno representando 13,16% da composição e (E)-cariofileno representando 7,51%, conforme descrito na Tabela II, Capítulo I).

Ainda em relação a resposta observada nos mutantes das vias PPR e TLS ao nerolidol, estes dados podem explicar a ausência do efeito mutagênico nas linhagens XV185-14c e N123 tratadas com nerolidol (Tabelas IV e VI, Capítulo I), na qual a proteína Rad30 (Pol η) promove uma correção de lesão no DNA livre de erro, assim como a proteína Rev1, que atua juntamente com a Pol ζ , que também pode atuar em uma via sujeita a erro (Prakash *et al.*, 2005, Andersen *et al.*, 2008). São necessários mais estudos para afirmar que as lesões induzidas pelo nerolidol são reparadas por TLS em uma via livre de erro.

Nenhuma mudança no perfil de sensibilidade das linhagens mutantes nas vias recombinacionais foi observada, após o tratamento com o óleo essencial ou com o nerolidol, indicando ausência de formação de DSB. O que vai de encontro com estudos em células de mamíferos previamente publicados pelo grupo, onde foram verificadas ausência de indução deste tipo de quebras, através da utilização do ensaio cometa versão neutra (o qual detecta formação de DSB) (Péres *et al.*, 2009).

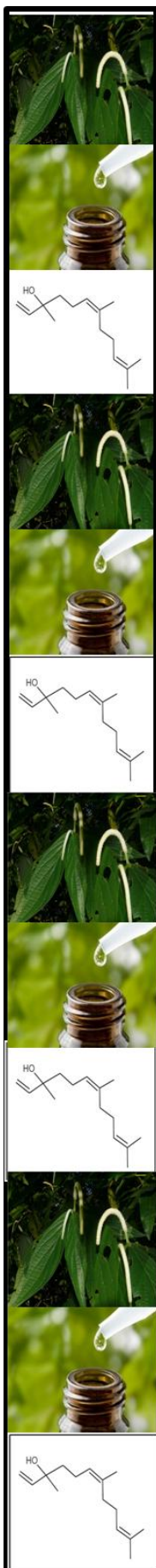
Estudos anteriores relatam que o nerolidol apresentou uma atividade pró-oxidante (Ruberto *et al.*, 2000), justificando a sensibilidade das linhagens deficientes em BER, indicando que a via de reparo deste sesquiterpeno parece ser um pouco diferente da do óleo essencial de *P. gaudichaudianum*.

Ao estudar a sobreposição das vias de reparação empregando quádruplos mutantes, verificou-se que nos tratamentos com o óleo essencial de *P. Gaudichaudianum* houve uma sensibilidade nos mutantes *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* (Figura 7A, Capítulo I), sugerindo que esses resultados sejam uma consequência da ausência de Ntg2, pois quando ausente a sensibilidade aumenta, como aconteceu nos resultados mostrados com o simples mutante *ntg2Δ* e duplo mutante *ntg1Δntg2Δ*. Estes dados sugerem que as lesões geradas pelo óleo essencial podem ser reconhecidas pela DNA glicosilase Ntg2, que remove as bases errôneas e gera sítios AP. Sítios esses que são removidos principalmente pela endonuclease *Apn1*, no entanto, quando ocorrem falhas no processamento destes sítios, são formadas quebras de fitas simples e duplas de DNA (Boiteux e Guillet, 2004). Já nos tratamentos com nerolidol os quádruplos mutantes *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* apresentaram sensibilidade significativa (Figura 7B, Capítulo I), sugerindo que para as lesões induzidas pelo nerolidol as enzimas Ntg1 e Apn1 parecem serem necessárias, assim como ocorreu nos testes com os simples mutantes *ntg1Δ* e *apn1Δ*, o duplo mutante *ntg1Δntg2Δ*, e o triplo mutante *ntg1Δntg2Δapn1Δ*.

Como os dados publicados anteriormente utilizando como modelo células de mamífero (Péres *et al.*, 2009) e os dados obtidos com os mutantes das vias de reparo de DNA de *S. cerevisiae*, especialmente os dados obtidos com os mutantes BER, apontam para a formação de lesão oxidativa no DNA e aumento da peroxidação lipídica, buscou-se a confirmação de que o óleo essencial e o nerolidol têm a capacidade de gerar ERO. Observou-se que a ausência das enzimas superóxido dismutase aumenta a sensibilidade ao óleo essencial e ao nerolidol (Figura 8, Capítulo I). O efeito foi mais pronunciado na linhagem *sod1Δ*, após o tratamento com nerolidol (Figura 8B, Capítulo I). Sod1 (SodCuZn) fornece a principal defesa contra danos exógenos, já que é uma enzima citoplasmática (Longo *et al.*, 2008). Para confirmação da produção de ERO realizamos o ensaio de oxidação da DCFH-DA nos mutantes nas enzimas SOD (CuZnSOD e

MnSOD) e observamos que o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e o nerolidol são capazes de produzir ERO (Tabela VII, Capítulo I), entretanto, o tipo de ERO permanece por esclarecer. Um estudo interessante demonstrou que o nerolidol pode afetar a função mitocondrial, diminuindo a viabilidade celular via interação com a membrana, aumentando a quantidade de ERO e diminuindo a quantidade de ATP (Ferreira *et al.*, 2011).

Resumidamente, neste trabalho, mostramos que o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e seu principal composto nerolidol não são mutagênicos, mas induzem significativos efeitos citotóxicos na levedura *S. cerevisiae*, que pode estar relacionados à geração de ERO. Considerando a resposta nas linhagens deficientes em SOD e nos mutantes da via BER juntamente com nossos dados anteriores (Péres *et al.*, 2009), podemos concluir que a citotoxicidade observada está relacionada principalmente com a geração de quebras simples decorrentes da geração de lesões oxidativas, sendo o nerolidol o principal responsável pelos efeitos biológicos induzidos pelo óleo essencial de *P. gaudichaudianum*.



CONCLUSÕES

Conclusões

Os resultados obtidos com esse trabalho indicam que o óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* e seu componente majoritário nerolidol apresentaram efeito citotóxico, sendo essa citotoxicidade mais pronunciada nos tratamentos com nerolidol, relacionado à consequência desse efeito com a geração de ERO.

➤ O óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* e seu componente majoritário nerolidol apresentaram efeito citotóxico nas linhagens XV185-14c e N123 de *S. cerevisiae*, com o efeito mais pronunciado após tratamento com o nerolidol.

➤ O óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* induziu efeito mutagênico na linhagem XV185-14c no locus *lys1* na concentração mais alta, e o nerolidol não induziu qualquer tipo de efeito mutagênico.

➤ A DNA glicosilase Ntg2 (proteína do BER) está envolvida no reconhecimento das lesões causadas pelo óleo essencial, enquanto os danos induzidos pelo nerolidol são reconhecidos pela glicosilase Ntg1 (proteína do BER).

➤ A endonuclease Apn1, envolvida na via BER, mostrou ser importante no reparo de lesões geradas pelo nerolidol, uma vez que os mutantes *apn1Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δ* foram sensíveis.

➤ Mutantes simples em NER (*rad1Δ* e *rad10Δ*) mostraram uma sensibilidade intermediária para o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, e não mostraram sensibilidade frente a tratamentos com nerolidol.

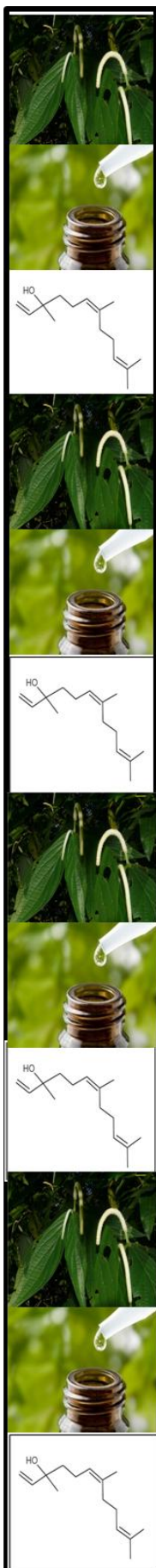
➤ Mutantes em TLS não apresentaram sensibilidade aos tratamentos com o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, entretanto os tratamentos com o nerolidol exibiram uma notável resistência para os simples mutantes *rev1Δ*, *rad30Δ* e *rad18Δ*, sugerindo que estas vias podem participar no potencial citotóxico do nerolidol.

➤ A sensibilidade dos quádruplos mutantes *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ*, após tratamento com o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, sugere que esses resultados sejam uma consequência da ausência de Ntg2.

➤ Os quádruplos mutantes *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* e *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* foram sensíveis ao nerolidol, podendo ser uma consequência da ausência das enzimas Ntg1 e Apn1.

➤ Mutantes deficientes na enzima superóxido dismutase aumentam a sensibilidade nos ensaios com óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e nerolidol, confirmando que ambos têm a capacidade de gerar ERO.

➤ Na análise por DCF confirmou-se que o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e o nerolidol são capazes de produzir ERO.

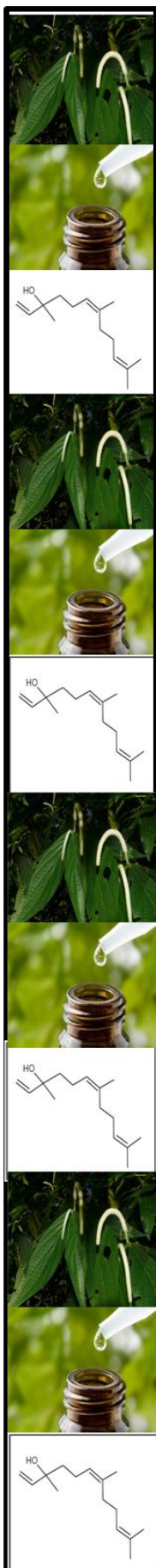


PERSPECTIVAS

Perspectivas

O conjunto de dados obtidos neste trabalho possibilitou determinar a citotoxicidade do óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e do seu componente majoritário nerolidol, bem como as vias de reparação de DNA envolvidas nas lesões geradas por estes agentes. Desta maneira, as perspectivas deste estudo podem ser apontadas:

- Repetir os mesmos ensaios, tanto em levedura como em células de mamífero, que foram realizados com o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e com o nerolidol, com os outros componentes do óleo (α -humuleno, biciclogermacreno e (E)-cariofileno).
- Determinar o tipo de ERO gerada pelo óleo essencial, assim como, pelo nerolidol.
- Verificar o efeito citotóxico do óleo essencial e do nerolidol em diferentes linhagens tumorais como a MCF-7 (adenocarcinoma mamário), HepG2 (hepatocarcinoma) e HCT-116 (câncer colo-retal).
- Dar continuidade na investigação dos danos oxidativos no DNA em células de mamíferos, utilizando o ensaio cometa modificado com enzimas de reparação de DNA que reconhecem bases oxidadas.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- Albiero, A.L.M., Souza, L.A., Mourão, K.S.M., Almeida, O.J.G. and Lopes, W..A.L., Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). *Acta Farmacêutica Bonaerense*, 24: 550-554, 2005.
- Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A. and Garrel, C., The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42:1634–1650, 2010.
- Almeida, K.H. and Sobol, R.W., A unified view of base excision repair: lesion dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*, 6: 695-711, 2007.
- Andersen, S., Heine, T., Sneve, R., König, I., Krokan, H.E., Epe, B. and Nilsen, H., Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 26: 547-555, 2004.
- Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B., Santos, A.S. and Maia, J.G.S. Essential oils of *P. gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. DC. *Journal of Essential Oil Research*, 10: 465-467, 1998.
- Angnes, S.I.A., Isolamento, caracterização química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de *Piper amplum* Kunth. Blumenau, Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blumenau, 88p, 2005.
- Arruda, D.C., D'alexandri, F.L., Katzin, A.M. and Uliana, S.R.B., Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 1679-1687, 2005.
- Aylon, Y. and Kupiec, M., New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res*, 566: 231-248, 2004.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475, 2008.

Bardelli, K.C., Kirizawa, M. and De Souza, A.V.G., O gênero *Piper L.* (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. *Hoehnea*, 35: 553-561, 2008.

Batista Jr., J.M., Lopes, A.A., Ambrósio, D.L., Regasini, L.O., Kato, M.J., Bolzani, V.S., Cicarelli, R.M.B. and Furlan, M., Natural chromenes and chromene derivatives as potential Anti-trypanosomal agents. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31: 538-540, 2008.

Bichara, M., Meier, M., Wagner, J., Cordonnier, A. and Lambert, I. B., Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in *Escherichia coli*. , 727: 104–122, 2011.

Boeira, J.M., Viana, A.F., Picada, J.N. and Henriques, J.A.P., Genotoxic and recombinogenic activities of the β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 500:39-48, 2002.

Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowers, R.N. and Dietrich, A., DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 186-200, 2011.

Bohanes, P., LaBonte, M.J. and Lenz, H.L., A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 10(3): 157-164, 2011.

Boiteux, S. and Guillet, M., Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3: 1-12, 2004.

Boveris, A., Biochemistry of free radicals: from electron to tissues. *Medicina* (Buenos Aires), 58: 350-356, 1998.

Brehm-Stecher, B.F. and Johnson, E.A., Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3357-3360, 2003.

Brendel, M. and Henriques, J.A.P., The PSO mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489: 79–96, 2001.

Brendel, M., Grey, M., Maris, A.F., Hietkamp, J., Fesus, Z., Pich, C.T., Dafré, A.L., Schmidt, M., Eckardt-Schupp, F. and Henriques, J.A., Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Curr Genet*, 33: 4-9, 1998.

Buettner, G.R., Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. 11(4): 341-346, 2011.

Buonocore, G., Perrone, S. and Tataranno, M.L., Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15: 186-190, 2010.

Cadet, J., Douki, T. and Ravanat, J.L., Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutation Research*, 711: 3-12, 2011.

Calixto, J.B., Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 131-134, 2005.

Castrillo, J.L. and Oliver, S.G., Yeast systems biology: the challenge of eukaryotic complexity. *Methods Mol Biol.*, 759: 3-28, 2011.

Costa, R.M., Chiganças, V., Galhardo, R.S., Carvalho, H. and Menck, C.F., The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, 85: 1083-1099, 2003.

Da Cunha, A.P., Cavaleiro, C., and Salgueiro, L., Fármacos aromáticos. In: Da Cunha, A.P. Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 339-401, 2005.

De Moraes, S.M., Facundo, V.A., Bertini, L.M., Cavalcanti, E.S.B., Júnior, J.F.A., Ferreira, S.A., Brito, E.S. and Neto, M.A.S., Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematic and Ecology*, 35: 670-675, 2007.

De Wind, J.H., Thevelein, J.M., and Winderrick, J., Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: Hohmann, S., Mager, W.H. *Yeast Stress Responses*. Springer, p.7-52, NY, 1997.

Dearfield, K.L., Cimino, M.C., Mccarroll, N.E., Mauer, I. and Valcovic, L.R., Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 521: 121135, 2002.

Di Stasi, L.C. and Hiruma-Lima, C.A., Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: São Paulo, p. 604, 2002.

Di Stasi, L.C., Triagem farmacológica de plantas medicinais com atividade analgésica. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 327p, 1987.

Fagbemi, A.F., Orelli, B. and Schärer, O.D., Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair*, 10: 722-729.

Ferreira, F.M., Palmeira, C.M., Oliveira, M.M., Santos, D., Simões, A.M., Rocha, S.M., Coimbra, M.A. and Peixoto, F. (2011) Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicol. In Vitro.*, 26(2): 189-196.

Friedberg, E.C., Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6(12): 943-953, 2005.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. and Ellenberger, T. *DNA repair and Mutagenesis*. 2nd ed. ASM Press, Washington DC, 2006.

Gancedo, J.M., Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62(2): 334-361, 1998.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G., Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287): 563-567, 1996.

Gonçalves, O., Pereira, R., Gonçalves, F., Mendo, S., Coimbra, M.A. and Rocha, S.M., Evaluation of the genotoxicity of sesquiterpenic compounds and of their influence on

antibiotic susceptibility of two clinically relevant bacteria. *Mutation Research*, 723: 18-25, 2011.

Goodman, M.F., Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, 71: 17-50, 2002.

Gralla, E.B. and Kosman, D.J., Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet*, 30: 251-319, 1992.

Grogan, D. and Robertson, S.J., Formaldehyde-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular properties and the roles of repair and bypass systems. *Mutation Research*, 731: 92-98, 2012.

Guimarães, E.F. and Valente M.C., *Piper* L. In: Flora Ilustrada Catarinense - Piperaceae. p.1-45, 2001.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. Free Radical in Biology and Medicine (4rd edn). Oxford: Oxford University Press, 2007.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, 3ed, 936p, 2000.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press, New York*, 3ed, 936p, 2000.

Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141: 312–322, 2006.

Hanawalt, P.C. and Spivak, G., Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature Reviews*, 9; 958:970, 2008.

Hawthorne, D. C. and Leupold, U., Current topics in microbiology and immunology. *Springler Verlag*, Berlin, 1974.

Hegde, M.L., Hazra, T.k., and Mitra, S., Functions of disordered regions in mammalian early base excision repair proteins. *Cell Mol Life Sci.*, 67(21): 3573-3587, 2010.

Henriques, J.A.P., Brozmanova, J. and Brendel, M., Role of PSO genes in the repair of photoinduced interstrand crosslinks and photooxidative damage in the DNA of the yeast

Saccharomyces cerevisiae. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 39: 185-196, 1997.

Henriques, J.A.P., Dafré, A.L., Picada, J.N., Maris, A.F. and Salvador, M., Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L.A., de Barros, N.M. and Azevedo J.L., (Eds.), *Biotecnologia na agricultura e na indústria*. Guaíba: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

Henriques, J.A.P., Valsa, J.O. and Gomes, R.A., Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: Pinto, S.O.C. (Ed), *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo, 1987.

Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. and Cabiscol, E., Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochem Biophys Acta*. 1780(11): 1217-1235, 2008.

Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J. and Gurvitz, A. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 35–64, 2003.

Hoeijmakers, J.H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374, 2001.

Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M.F. and Quetin-Leclercq, J., Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med*, 72: 480-482, 2006.

Inagaki, A., Van Cappellen, W.A., Vander Laan, R., Houtsmuller, A.B. Hoeijmakers, J.H.J., Grootegoed, J.A. and Baarends, W.M., Dynamic localization of human RAD18 during the cell cycle and a functional connection with DNA double-strand break repair. *DNA Repair*, 8: 190-201, 2009.

Inoue, Y., Sugiyama, K., Izawa, S. and Kimura, A., Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1395: 315-20, 1998.

Jeppesen, D.K., Bohr, V.A. and Stevnsner, T., DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 94(2): 166-200, 2011.

Jeyaprakas, K., Ayyanar, M. and Sekar, T., Traditional uses of medicinal plants among the tribal people in Theni District (Western Ghats). Southern India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S20-S25, 2011.

Klopell, F.C., Lemos, M., Sousa, J.P., Comunello, E., Maistro, E.I. and Bastos, J.k., Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculidolia* DC (Asteraceae). *Z. Naturforsch.* 62: 537-542, 2007.

Krogh, B.O. and Symington, L.S., Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Gene*, 38: 233-271, 2004.

Lago J.H.G., Ramos, C.S., Casanova, D.C.C., Morandim, A.A., Bergamo, D.C.B., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V. Da S., Furlan, M., Guimarães, E.F., Young, M.C.M. and Kato, M.J., Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaerospermum*. *Journal of Natural Products*, 67: 1783-1788, 2004.

Lapczynski, A., Bhatia, S.P., Letizia, C.S. and Api, A.M., Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food Chem. Toxicol.* 46: 247-250, 2008

Lee, S.J., Han, J.I., Lee, G.S., Park, M.J., Ghoi, I.G., Na, K.J. and Jeung, E.B., Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a Guinea pig model. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 184-188, 2007.

Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, L.P. and Green, C.M., Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair*, 6: 891-899, 2007.

Lehmann, A.R., Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett*, 579: 873-876, 2005.

Li, X. and Heyer, W.D., Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.*, 18(1): 99-113, 2008.

Licciardi, P.V. and Underwood, J.R., Plant-derived medicines: A novel class of immunological adjuvants. *Immunopharmacology of Synthetic Natural Products*, 11: 390-398, 2011.

- Lieber, M.R., The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 79: 181-211, 2010.
- Longo, V.D., Gralla, E.B. and Valentine, J.S., Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 21: 12275-12280, 2008.
- Lopes, N.P., Massuo, M.J., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., Yoshida, M., Planchart, A.R. and Katzin, A.M., Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. *J. Ethnopharmacol.* 67: 313-319, 1999.
- Mandal, P.K., Blanpain, C. and Rossi, D., DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nature Reviews*, 12: 198-202, 2011.
- Maris, A.F., Assunção, A.L.K., Bonatto, D., Brendel, M. and Henriques, J.A.P., Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet.*, 39(3): 137-149, 2001.
- Marques, F., Azevedo, F., Johansson, B. and Oliveira, R., Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by *Ginkgo biloba* leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1361-1366, 2011.
- Matuo, R., Sousa, F.G., Escargueil, A.E., Soares, D.G., Grivicich, I, Saffi, J., Larsen, A.K. and Henriques, J.A., DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochemical Pharmacology*, 79: 147-153, 2010.
- Meadows, K.L., Song, B. and Doetsch, P.W. Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. *Nucleic Acids Res* 31: 5560-5567, 2003.
- Mladenov, E. and Iliakis, G., Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research*, 711: 61-72, 2011.

Morandim-Giannetti, A.A., Pin, Ra.R., Pietro, N.A.S., Oliveira, H.C. Mendes-Giannini, M.J.S., Lecio, A.C., Kato, Jm.J., Oliveira, J.E. and Furlan, M., Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17): 1810-1814, 2010.

Moreira, D.L., Santos, P.O., Kaplan, M.A.C., Guimarães, E.F., Cardoso, G.L.C. and Pereira, N.A., Estudos fitoquímicos e farmacológico de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 82: 29-32, 2001.

Moreira, D.L., Santos, P.O., Kaplan, M.A.C., Guimarães, E.F., Cardoso, G.L.C. and Pereira, N.A., Estudos fitoquímicos e farmacológico de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*. 82: 29-32, 2001.

Murray, D.B., Haynes, K. and Tomita, M., Redox regulation in respiring *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810: 945-958, 2011.

Nadembega, P.N., Boussim, J.I., Nikiema, J.B., Poli, F., and Antognoni, F., Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 378-395, 2011.

Nardo, T., Oneda, R., spivak, G., Vaz, B., Mortier., L., Thomas, P., Orioli, D., Laugel, V., Stary, A., Hanawalt, P.C., Sarasin, A. and Stefanini, M., A UV-sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. *PNAS*, 106(15): 6209-6214, 2009.

Noorizadeh, H., Farmany, A. and Noorizadeh, M., Quantitative structure–retention relationships analysis of retention index of essential oils. *Quim. Nova*, 34(2): 242-249, 2011.

Ouyang, Y., Xu, Q., Mitsui, K., Motizuki, M. and Xu, Z., Human trehalase is a stress responsive protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 621-625, 2009.

Pan, Y., Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: A message from yeast. *Experimental Gerontology*, 46(11): 847-852, 2011.

Pardo, B., Gómez-Gonzalez, B. and Aquilera, A., DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand breaks repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci.*, 66(6): 1039-1056, 2009.

Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K., Jain, S. R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., and Boll, P. M., Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46: 597-673. 1997.

Parry, E. M. and Parry, J.M., The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mutagenicity testing: A practical approach, Venit, S.; Parry, S. M.; (Eds), Orl Press, Oxford, Washington DC, 1984.

Pastwa, E. and Blasiak, J., Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Polonica* 50: 891-908, 2003.

Péres, V.F., Moura, D.J., Sperotto, A.R.M., Damasceno, F.C., Caramão, E.B., Zini, C.A. and Saffi, J., Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food Chem. Toxicol*, 47: 2389-2395, 2009.

Péres, V.F., Saffi, J., Melecchi, M.I., Abad, F.C., Jacques, R.A., Martinez, M.M., Oliveira, E.C. and Caramão, E.B., Comparasion of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Journal of Chromatography A*, 1105: 115-118, 2006b.

Péres, V.F., Saffi, J., Melecchi, M.I., Abad, F.C., Martinez, M.M., Oliveira, E.C., Jacques, R.A. and Caramão, E.B., Optimization of pressurized liquid extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Journal of Chromatography A*, 1105: 148-153, 2006a.

Pículo, F., Macedo, C.G., Andrade, S.F. and Maistro, E.L., *In vivo* genotoxicity assessment of nerolidol. *Applied Toxicology*, 2010.

Poser, G.L.V., Rorig, L.R., Henriques, A.T., Lamaty, G. and Menut, C., Aromatic plants from Brazil. III. The chemical composition of *P. gaudichaudianum* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 6 (4): 337-40, 1994.

- Prakash, S. and Prakash, L., Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res*, 451: 13-24, 2000.
- Prakash, S., Johnson, R.E. and Prakash, L., Eukariotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Ann Rev Biochem.*, 74: 317-353, 2005.
- Prasad, R., Beard, W. A., Batra, V. K., Liu, Y., Shock, D. D. and Wilsona, S. H., A Review of recent experiments on step-to-step “hand-off” of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways¹. *Mol Biol (Mosk)*, 45(4): 586:600, 2011.
- Pringle, J.R., Broach, J.R. and Jones, E.W., The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Vol 3. *Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, NY, 1997.
- Prins, C.L., Vieira, I.J.C., and Freitas, S.P., Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Society of Plant Physiology*, 22(2): 91-102, 2010.
- Puhl, M.C.M.N., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V. and Filho, B.P.D., Antimicrobial Activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and Its Synergism with Different Antibiotics. *Molecules*, 16: 9925-9938, 2011.
- Putnam, C.D., Hayes, T.K. and Kolodner, R.D., Post-replication repair suppresses duplication-mediated genome instability. *PLoS Genetics*, 6(5)-1000933.
- Ray, P.D., Huan, B.W. and Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2012 (ainda não impresso).
- Reed, S.H., Nucleotide excision repair in chromatin: Damage removal at the drop of a HAT. *DNA Repair*, 10: 734-742, 2011.
- Revers, L.F., Cardone, J.M., Bonatto, D., Saffi, J., Grey, M., Feldmann, H., Brendel, M. and Henriques, JA., Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. *Nucleic Acids Res.* 30: 4993-5003, 2002.

Rodrigues, H.G., Meireles, C.G., Lima, J.T.S., Toledo, G.P., Cardoso, J.L. and Gomes, S.L., Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 13(3): 359-366, 2011.

Rorig, L.R. and Poser, G.L.V. Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae. *Revista Brasileira de Farmácia*, 72: 15- 17, 1991.

Rouillon, C. and White, M.F., The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Research in Microbiology*, 162: 19-26, 2011.

Ruberto, G., Baratta, M.T., Deans, S.G. and Dorman, H.J., Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Med.* 66(8): 687-93, 2000.

Saffi, J. and Henriques, J.A.P., Reparação de DNA em células eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann, B. and Henriques, J.A.P., *Genética Toxicológica*. 424p. 2003.

Shu, Y.Z., Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61: 1053-1071, 1998.

Silva, E.M.J. and Machado, S.R., Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii*(Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Rev Bras Bot*, 22: 117-124, 1999.

Silva, S.R.S., Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Andrede, N.J., Nascimento, E.A., and Pinheiro, A.L., Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, 6 (1): 63-70, 2003.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., De Mello, J.C.P., Mentz, L.A. and Petrovick, P.R. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 833p. 2003.

Smith, M.C., Sumner, E.R. and Avery, S.V., Glutathione and Gts1p drive beneficial variability in the cadmium resistances of individual yeast cells. *Mol Microbiol* 66: 699-712, 2007.

Soares, D.G., Poletto, N.P., Bonatto, D., Salvador, M., Schwartzmann, G. and Henriques, J.A.P. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochemical Pharmacology*, 70: 5969, 2005.

Soares, D.G., Poletto, N.P., Bonatto, D., Salvador, M., Schwartzmann, G. and Henriques, J.A.P., Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochem Pharmacol*, 70:59-69, 2005.

Stipp, E.J., Estudo farmacológico comparativo de *P. gaudichaudianum* Kunth; *Piper cernum* Vell. e *Piper cf. Ihotzkyanum* Kunt.. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 233p, 2000.

Sweder, K.S. and Hanawalt, P.C. Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10696-10700, 1992.

Teixeira, S.D., Estudo Fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua Interação com Morcegos Frugívoros. Curitiba. 105p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2003.

Terziyska, A., Waltschewa, L. and Venkov, P., A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, 109: 43-52, 2000.

Ting, L., Jun, H., and Junjie, C., RAD18 lives a double life: Its implication in DNA double-strand break repair. *DNA Repair*, 9: 1241-1248, 2010.

Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D. and Azevedo, D., Oxidative Stress Responses in Yeast. *Top Curr Gen*, 1: 241–303, 2003.

Tung, Y.T., Chua, M.T., Wang, S.Y. and Chang, S.T., Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technol*, 99: 3908-3913, 2008.

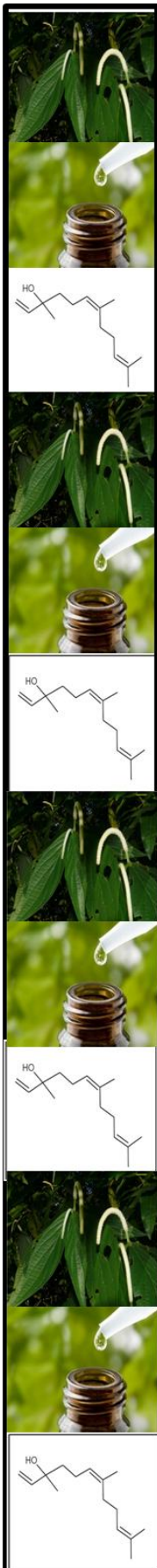
Viegas Jr, C. and Bolzani, V.S., Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29: 362-337, 2011.

Wang, D., Kreutzer, D.A. and Essigmann, J.M., Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research*, 400: 99-115, 1998.

Wangchuk, P., Keller, P.A, Pyne, S.G., Taweechotipatr, A.T., Rattanajak, R. and Kamchonwongpaisan, S., Evaluation of an ethnopharmacologically selected Bhutanese medicinal plants for their major classes of Phytochemicals and biological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 730-742, 2011.

Wilson III, D.M., Kim, D., Berquist, B.R. and Sigurdson, A. J., Variation in base excision repair capacity. *Mutation Research*, 711: 100-112.

Yunes, R.A. and Calixto, J.B., Plantas medicinais: sob a ótica da química moderna. Editora Argos, 2001.



ANEXOS

Ensaio Tóxico-genético com o Veneno de *Rhinella marina*

Estudo desenvolvido junto ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa Translacional em Saúde e Meio Ambiente na Região da Amazônia (INPeTAM/CNPq) para a obtenção de bolsa acadêmica.

1. Introdução

A espécie *Rhinella marina*, conhecida popularmente como sapo cururu, pertence à família Bufonidae. Esses anfíbios possuem ampla distribuição nativa, sendo encontrados nos Estados Unidos, México e por toda a América do Sul (Kwet and Di-Bernardo, 1999). Sapos da espécie *Rhinella marina* apresentam um tipo de glândula responsável pela síntese de uma grande diversidade de compostos químicos, os quais conferem proteção contra infecções por bactérias e fungos, bem como contra predadores (Sakate and Oliveira, 2000; Maciel, 2008). De acordo com a estrutura química os tipos moleculares, encontrados na pele de anfíbios, podem ser divididos em quatro categorias: aminas biogênicas, esteróides (bufogeninas e bufotoxinas), alcalóides e peptídeos (incluindo polipeptídeos e proteínas) (Maciel, 2008).

Desde a antiguidade, as populações fazem uso medicinal destas secreções, empregando-as para os mais diversos males (Kwan, *et al.*, 1992; Bernarde e Santos, 2009). Neste sentido, estudos que possam determinar a composição e a reação do corpo frente aos compostos presentes no veneno de *R. marina* poderiam definir um melhor uso do mesmo. Isso vem sendo demonstrado em diversas pesquisas com sapos do mesmo gênero, como nas averiguações de Tempone *et al.*, (2008) que sugeriu seu uso como antiparasitário leishmanicida. Freitas (2003) investigou a atividade antimicrobiana das substâncias extraídas de secreções de sapos; experimentos com cachorros demonstraram alterações cardíacas provocadas pelo veneno, evidenciando um outro tipo de atividade (Camplesi, 2006).

2. Objetivo

Considerando que o produto de síntese do anfíbio *Rhinella marina* (veneno) tem uma composição química diversificada, e é utilizada como defesa do anfíbio através de uma ação tóxica, este estudo teve como objetivo uma avaliação do efeito tóxico, mutagênico e genotóxico do veneno, utilizando células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79) e a linhagem haplóide da levedura *Saccharomyces cerevisiae* XV185-14c.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar o potencial citotóxico utilizando diferentes concentrações do veneno de *R. marina* em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79) através do ensaio de MTT.
- Investigar o potencial do veneno de *R. marina* em induzir danos ao DNA em células V79 por meio do ensaio cometa em condições de pH alcalino ;
- Determinar a atividade citotóxica e mutagênica do veneno de *R. marina* na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*.

3. Resultados e Discussão

O uso de cultura de células é de grande valia na investigação das características toxicológicas no que tange aos estudos farmacológicos e ambientais, propiciando uma ferramenta fundamental na avaliação dos parâmetros biológicos e/ou terapêuticos versus os efeitos toxicológicos. Dentre as numerosas possibilidades de linhagens celulares disponíveis, a linhagem de mamífero V79, de fibroblastos de Hamster Chinês, tem sido largamente utilizada em ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade de curta duração.

A utilização destas linhagens iniciou em 1968 (Bradley *et al.*, 1981). Algumas características desta linhagem são: alta velocidade de proliferação (12-16 horas, a 37⁰C com 5% de CO₂), alta eficiência de clonagem, estabilidade do cariótipo (22 ± 1 cromossomos, de fácil identificação através de microscópio óptico), baixa frequência de mutações e a manutenção das características após a crio-preservação (Bradley *et al.*, 1981).

Os elementos básicos de estrutura e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas. De tal maneira, as conseqüências da interação química de xenobióticos com o DNA sejam de células humanas, sejam de célula V79, são similares. Portanto, os resultados obtidos nessa linhagem são extremamente relevantes para humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procariotos (Bradley *et al.*, 1981).

Para avaliar o efeito citotóxico do veneno de *Rhinella marina* foi realizado o ensaio com MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium). O teste de MTT, outro ensaio de curta duração, tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. Descrito originalmente por Mosmann (1983) e modificado por Alley *et al.* (1988) é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O teste permite definir a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.

Como demonstrado na Figura 1, o veneno de *Rhinella marina* induz uma leve citotoxicidade dose-dependente.

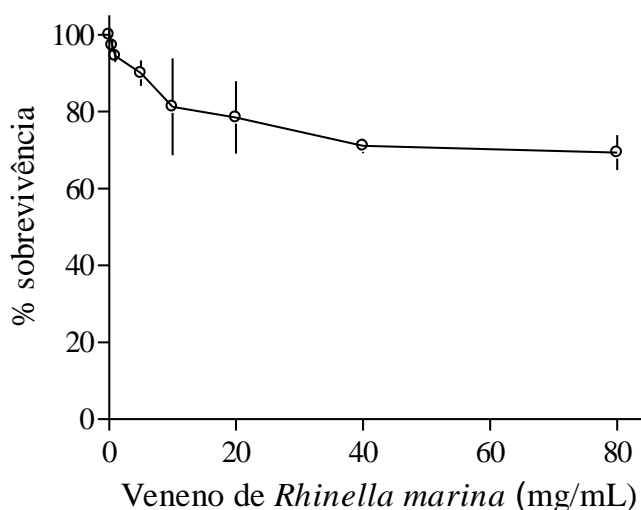


Figura 1. Ensaio de MTT para avaliação da citotoxicidade após tratamento de 24 horas com o veneno *Rhinella marina* em células de fibroblasto de pulmão de hãhamster chinês (células V79).

Para avaliação da genotoxicidade do veneno de *Rhinella marina* foi utilizado o ensaio cometa. O ensaio cometa é atualmente um dos principais métodos no estudo de

lesões no DNA. Utilizando-se a versão alcalina é possível mensurar quebras simples no DNA, quebras duplas no DNA, quebras em sítios álcali-lábeis e detectar sítios susceptíveis a ataques alcalinos. Como mostrado na Figura 2, o veneno de *Rhinella marina* induziu quebras significativas no DNA nas concentrações de 40 e 80 µg/mL.

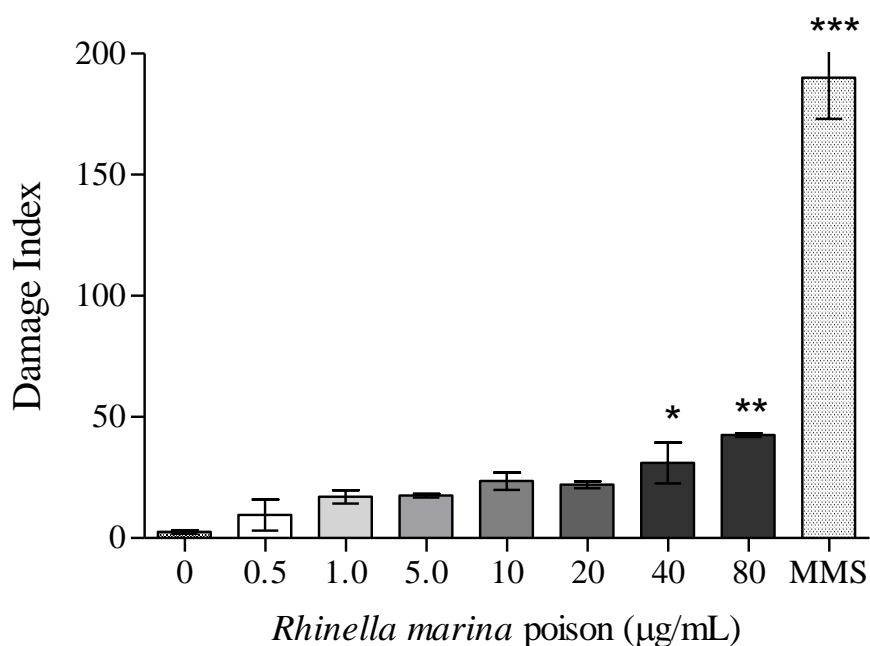


Figura 2. Ensaio cometa para avaliação da formação de quebras no DNA após tratamento com o veneno de *Rhinella marina* utilizando células V79.

Para os ensaios de mutagênese foi utilizada a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14C. A linhagem XV185-14C de *S. cerevisiae* permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas (reversão de *lys1-1* ocre ou *his1-7* missense) e uma mutação para frente ou frameshift (*hom3-10*). Suspensões celulares de 2×10^8 células mL^{-1} em fase exponencial crescimento foram incubadas em presença do veneno de *Rhinella marina*, durante 18 h em meio sintético completo. A sobrevivência foi determinada no meio completo SC e a indução de mutações (revertentes LYS, HIS ou HOM) nos meios de omissão.

Os ensaios de sobrevivência na linhagem XV185-14C demonstram que o veneno de *Rhinella marina* induziu uma citotoxicidade nas doses de 160 µg/mL e 320 µg/mL,

sendo essa citotoxicidade não significativa. Nas avaliações de mutagenicidade o veneno não apresentou efeito mutagênico nas doses testadas (Tabela1).

Desta forma, os resultados preliminares deste trabalho indicam que o composto não é citotóxico, nem mutagênico, mas induz genotoxicidade em células V79. Entretanto, outros ensaios são necessários para a comprovação destes resultados, como a realização de ensaios de citotoxicidade em outras linhagens celulares (tumoriais, por exemplo), bem como teste de micronúcleo, para complementação dos dados de mutagenicidade.

Tabela 1. Indução de mutações pontuais (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV185-14c de *S. cerevisiae* depois do tratamento com veneno de *Rhinella marina* por 18 horas com células em fase exponencial durante crescimento em meio sintético completo (SC).

Substância	Tratamento	Sobrevivência (%)	<i>LYS1</i> /10 ⁷ sobreviventes ^b	<i>HIS1</i> /10 ⁷ sobreviventes ^a	<i>HOM3</i> /10 ⁷ sobreviventes ^a
NC ^d	0	100,00	0,87 ± 0,69 ^c	0,62 ± 0,35 ^c	0,11 ± 0,08 ^c
4-NQO ^e	0.5 µg/mL	15,33***	125,92 ± 9,19***	151,88 ± 6,3 ***	41,22 ± 8,50***
Veneno de <i>Rhinella</i> <i>marina</i>	10 µg/mL	97,04	0,45 ± 0,32	0,627 ± 0,36	0,08 ± 0,02
	20µg/mL	92,12	0,72 ± 0,86	0,58 ± 0,43	0,14 ± 0,14
	40µg/mL	88,81	0,93 ± 0,69	0,56 ± 0,32	0,11 ± 0,10
	80µg/mL	85,24	1,54 ± 0,84	0,56 ± 0,50	0,18 ± 0,07
	160 µg/mL	81,60	2,06 ± 0,94	0,50 ± 0,44	0,09 ± 0,11
	320 µg/mL	74,96	2,06 ± 0,61	0,82 ± 0,35	0,02 ± 0,03

^a revertentes locus específico; ^b revertentes locus não-específico (*forward mutation*); ^c média e desvio padrão de três experimentos independentes;

^d controle negativo (solvente); ^e controle positivo; * dados significantes em relação ao controle negativo quando $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ / One-way ANOVA-Dunnett's Multiple Comparison Test.

Referências Bibliográficas

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48: 589-601, 1988.

Bernarde, P. S. and Santos, R. A. Utilização medicinal da secreção (“vacina-do-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. *Biotemas*, 22: 213-220, 2009.

Bradley, M.O., Bhuyan, B., Francis, M.C., Langenbach, R., Peterson, A. and Huberman, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutation Research*, 87: 81-142, 1981.

Camplesi, A. C. Avaliações clínicas e laboratoriais da intoxicação experimental por veneno de sapo em cães. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, 2006.

Freitas, C. I. A. Estudo sobre a atividade antimicrobiana de substâncias extraídas e purificadas de secreções da pele de anfíbios. 2003. Tese (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2003.

Kwan, T., Patusco, A. D. and Kohl, L. Digitalis toxicity caused by toad venom. *Chest*, v. 102: 949-950, 1992.

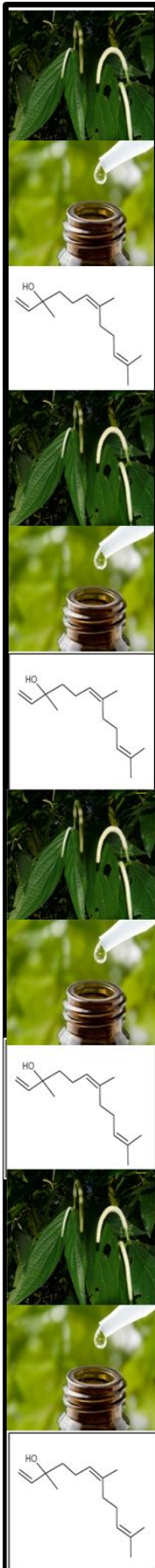
Kwet, A. and Di-Bernardo, M. Anfíbios = Amphibien = Amphibians. Porto Alegre, EDIPUCRS, 1999.

Maciel, N.M. Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae). Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasil, 2008.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63, 1983.

Sakate, M. and Oliveira, P. C. L.. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.6, 2000.

Tempone, A. G., Pimenta, D. C., Lebrun, I., Sartorelli, P., Taniwaki, N. N., Andrade, H. F., Antoniazzi, M. M. and Jared, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon*, 52: 13-21, 2008.



CURRICULUM VITAE

SPEROTTO, A. R. M.**1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Angelo Regis de Moura Sperotto

Nascimento: 28 de janeiro de 1984 – Santo Augusto, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço Profissional: Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Laboratório de Genética Toxicológica - Sala 029 - Anexo II
Avenida Sarmiento Leite, 245 – Porto Alegre – RS

Endereço eletrônico: amsperotto@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO

2004 – 2008: Graduação em Farmácia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

3. ESTÁGIOS

2005 – 2006: Estágio Voluntário
Setor de Bacteriologia da Fundação Estadual de Produção e
Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul

2006 – 2007: Estágio Voluntário
Serviço de Análises Clínicas do Laboratório RioLab
Santo Augusto – RS

2007 – 2008: Estágio extracurricular no Serviço de Imunologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil

2008 – 2008: Estágio Curricular no Setor de Análises Clínicas
Hospital São Lucas da PUCRS

2008 – 2009: Aluno de Iniciação Científica

Laboratório de Reparação de DNA de Eucariontes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientação: Jenifer Saffi

Projeto: Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Destaque de sessão no XX Salão de Iniciação Científica, UFRGS.

SPEROTTO, A. R. M., PÉRES, V.F., MOURA, D.J., SAFFI, J. Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth. UFRGS, 2008, Porto Alegre.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

PÉRES, V.F.; MOURA, D.J.; SPEROTTO, A.R.M.; DAMASCENO, F.C.; CARAMÃO, E.B.; ZINI, C.A. & SAFFI, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2389-2395, 2009.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SPEROTTO, A. R. M., PÉRES, V.F., MOURA, D.J., SAFFI, J. Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth In: XX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre – RS. Livro de Resumos, p. 420-420. , 2008.

IMMICH, B.F.; ROCHA, J.C.; MOURA, D.J.; CASTILHOS, B.; SPEROTTO, A.R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; LENZ, G.; SAFFI, J. Avaliação da interação do gene KIN3 com genes de sinalização e reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae*. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre, RS. Livros de Resumos do I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.

SPEROTTO, A.R.M., MOURA, D.J., PÉRES, V.F., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J. Estudo do potencial citotóxico e genotóxico do óleo essencial de *Piper*

gaudichaudianum Kunth em células V79. XIV Salão de Iniciação Científica e Tecnológica da ULBRA, 2008, Canoas – RS.

SPEROTTO, A.R.M.; MOURA, D.J.; PÉRES, V.F.; HENRIQUES, J.A.P. & SAFFI, J. Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* KUNTH e do seu componente majoritário nerolidol em *Saccharomyces cerevisiae*. In: X Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2009, Ouro Preto - MG. Resumos do X Congresso da SBMCTA, 2009.

SPEROTTO, A.R.M., MOURA, D.J., PÉRES, V.F., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J. Avaliação do Efeito Citotóxico e Mutagênico do Óleo Essencial de *Piper gaudichaudianum* kunth e do seu Componente Majoritário Nerolidol em *Saccharomyces cerevisiae* In: I Simpósio Dos Programas De Pós-Graduação da UFCSPA, 2010, Porto Alegre. Resumos Digitais, 2010.

BRAGHIROLI, D. I., FIN, M. C, SPEROTTO, A. R. M., MOURA, D.J., SAFFI, J., HENRIQUES, J. A. P., PILGER, D. A., PRANKE, P. Electrospraying: a safe technique for the incorporation of stem cells in nonofiber scaffolds for use in tissue engineering In: VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular., 2011, Salvador. Livro de Resumos do VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular. , 2011.

CASTILHOS, B., SPEROTTO, A. R. M., MOURA, D.J., STÁBELI, R.G., CALDERON, L.A., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J. Avaliação do Efeito Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico do Veneno de *Rhinella marina* In: XXIII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2011.

SPEROTTO, A. R. M., MOURA, D.J., STÁBELI, R.G., CALDERON, L.A., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J., Avaliação do Efeito Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico do Veneno de *Rhinella marina*. II workshop do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa Translacional em Saúde e Meio Ambiente na Região da Amazônia, 2011.