

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG

ALINE CRISTINA MONTEIRO ROQUE

MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*): ESTUDO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS E
DA MODULAÇÃO DE LESÕES DE DNA E PRÉ-NEOPLÁSICAS *in vivo*.

ALFENAS - MG

2014

ALINE CRISTINA MONTEIRO ROQUE

MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*): ESTUDO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS E
DA MODULAÇÃO DE LESÕES DE DNA E PRÉ-NEOPLÁSICAS *in vivo*.

Dissertação apresentada a Universidade Federal de
Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química; Área de concentração:
Química Analítica.

Orientadora: Dra. Luciana Azevedo

Coorientador: Dr. Marcelo Henrique dos Santos

ALFENAS - MG

2014

Roque, Aline Cristina Monteiro.

Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*): estudo dos compostos químicos e da modulação de lesões de DNA e pré-neoplásicas *in vivo* / Aline Cristina Monteiro Roque. - 2014.

69 f. -

Orientadora: Luciana Azevedo

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Ascomicetos. 2. Mutagênicos. 3. Análise química. 4. Doxorrubicina. I. Azevedo, Luciana. II. Título.

CDD: 543.1

ALINE CRISTINA MONTEIRO ROQUE

MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*): ESTUDO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS E
DA MODULAÇÃO DE LESÕES DE DNA E PRÉ-NEOPLÁSICAS *in vivo*.

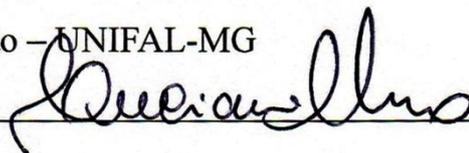
A Banca Examinadora abaixo assinada aprova o Exame de Defesa de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Aprovada em:

Prof^a Dra. Luciana Azevedo (Orientadora)

Faculdade Nutrição – UNIFAL-MG

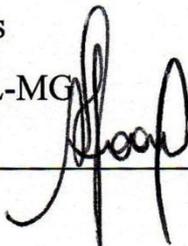
Assinatura: _____



Prof^a Dra. Marisi Gomes Soares

Instituto de Química – UNIFAL-MG

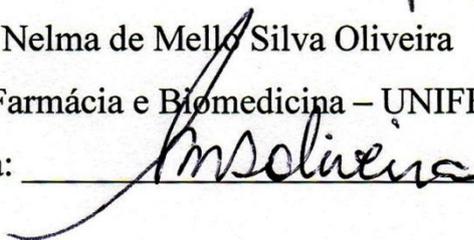
Assinatura: _____



Prof^a Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira

Curso de Farmácia e Biomedicina – UNIFENAS-MG

Assinatura: _____



Ao meu esposo que sempre me encorajou a enfrentar todos os momentos difíceis da vida. Com muito carinho aos meus pais pelo apoio e contribuição para minha formação enquanto pessoa. A minha irmã pelas palavras amigas nas horas tristes.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Pela dádiva da vida, pela tua grandeza, pelo seu amor incondicional. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Ao meu esposo,

As alegrias de hoje também são suas, pois seu amor, estímulo e carinho foram armas para essa minha conquista.

Aos meus pais,

Que me ensinaram a dar os primeiros passos, me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade.

À minha irmã,

Pessoa com quem amo partilhar a vida e que sempre me escutou nos momentos de frustrações.

À minha orientadora,

Por seus ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo, pelo incentivo constante, pela paciência, pela confiança, pela credibilidade e pela amizade, marcados durante esta jornada.

Ao meu coorientador,

Pela paciência e contribuição de seus conhecimentos para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha avó Terezinha,

Pelas orações e por sua capacidade de acreditar em mim.

À minha avó Quitita,

Que mesmo não estando mais neste plano terrestre, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Aos amigos do LANTin

Que ouviram os meus desabafos; que presenciaram e respeitaram o meu silêncio; que compartilharam estes anos, de páginas, de livros e cadernos; que tantas vezes machucamos; que fez meu mundo um mundo melhor; que me acompanharam, choraram, riram, sentiram, participaram, aconselharam, dividiram; as suas companhias, os seus sorrisos, as suas palavras e mesmo as ausências foram expressões de amor profundo.

Aos colegas da pós-graduação,

A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com vocês neste espaço foi a melhor experiência da minha formação acadêmica.

Aos colegas do João Lourenço e Pólo UAB/Cead-UFOP

Pelo apoio e por terem tornado a vida mais prazerosa durante esta vivência.

A todos,

Que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

“Às vezes, fico triste, mas graças a Deus, não sou um espírito triste. A alegria passa por cima de qualquer situação e o bom humor nos ensina a não dar aos acontecimentos infelizes maior importância que eles tenham.”

(Chico Xavier)

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da ingestão de *Sclerotinia sclerotiorum* através do experimento *in vivo* para analisar o potencial mutagênico, bem como realizar caracterização preliminar do extrato aquoso de *S. sclerotiorum*. Por meio dos resultados da Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear foi possível verificar a presença do manitol e da trealose (205,07; 365,11 e 381,08 m/z). No teste do micronúcleo o extrato foi capaz de induzir danos (243,48 a 439,13 % aumento de MNPCE) e potencializar os efeitos genotóxicos/citotóxicos da DXR (210,26 a 236,75 % aumento de MNPCE). Pela análise dos resultados do teste do cometa, percebeu-se que os extratos não exerceram efeito lesivo/protetor das atividades da DXR. Os resultados para estresse oxidativo mostraram que a DXR não elevou os níveis de MDA e GSH. Pelos resultados conclui-se que o extrato aquoso não causou quebras no DNA, porém pode ter exercido os efeitos lesivos observados pelo MNPCE por outros mecanismos, não associados à fragmentação de DNA.

Palavras-chave: Extrato aquoso de *Sclerotinia sclerotiorum*. Experimento *in vivo*. Efeito lesivo/protetor. DXR.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of intake of *Sclerotinia sclerotiorum* by in vivo experiment to examine the mutagenic potential, well as perform preliminary characterization of the aqueous extract of *S. sclerotiorum*. Through the results of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance was possible to verify the presence of mannitol and trehalose (205,07; 365,11 and 381,08 m/z). The extract was able to induce damage when was analyzed by micronucleus test (from 243.48 to 439.13 % increase MNPCE) and increase the genotoxic / cytotoxic DXR from (210.26 to 236.75 % increase MNPCE). The comet assay results showed that the extracts didn't cause harmful effect/protective of DXR activities. The results for oxidative stress showed that DXR didn't increase the levels of MDA and GSH. From the results it is concluded that the aqueous extract didn't cause break in DNA, but may have had detrimental effects that was observed by MNPCE by other mechanisms, not associated with DNA fragmentation.

Keywords: Aqueous extract of *Sclerotinia sclerotiorum*. In vivo experiment. Harmful effect/protective. DXR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Descarte no beneficiamento de sementes de soja.....	17
Figura 2 - Ciclo da vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
Figura 3 - Crescimento celular de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20
Figura 4 - Sintomas do mofo-branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>).....	21
Figura 5 - Representação estrutural do ácido oxálico.....	22
Figura 6 - Estrutura dos constituintes químicos obtidos de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i>	22
Figura 7 - Mecanismos de Formação de MN.....	25
Figura 8 - Células sem ou com dano no DNA.....	27
Figura 9 - Estrutura da Doxorubicina.....	28
Figura 10 - Intercalação da DXR com o DNA.....	29
Figura 11 - Estrutura química de um aduto de DNA formado pela DXR.....	30
Figura 12 - Equação de dismutação de H ₂ O ₂ pela catalase.....	32
Figura 13 - Mecanismos mediadores da morte celular e estresse oxidativo.....	33
Figura 14 - Reação de Fenton.....	34
Figura 15 - Obtenção e Isolamento de <i>S.sclerotiorum</i>	35
Figura 16 - Espectros obtidos por ESI (+) – MS (LTQ FT) dos compostos provenientes do extrato aquoso <i>S. sclerotiorum</i> . Faixa de aquisição entre m/z 100-1000 (destacando os íons m/z 205,07; 365,11 e 381,08).....	44
Figura 17 - Representação estrutural da α, α – trealose.....	45
Figura 18 - Representação estrutural do manitol.....	46
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H da amostra do extrato aquoso <i>S.s</i> – ACMR (300 MHz, MSO d ₆) ampliado de 3,0 – 5,0 ppm.....	47
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H da amostra do extrato aquoso <i>S.s</i> – ACMR (300 MHz, DMSO d ₆) ampliado de 3,2 – 3,7 ppm.....	48
Figura 21- Espectro de RMN de ¹³ C da amostra do extrato aquoso <i>S.s</i> – ACMR (75 MHz, DMSO d ₆) ampliado de 59 – 94 ppm.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento Experimental.....	39
Tabela 2 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para Trealose e Manitol presentes no extrato aquoso de <i>S. sclerotiorum</i>	46
Tabela 3 - Média (X) e desvio padrão (DP) dos parâmetros da evolução nutricional dos animais durante o período experimental.....	51
Tabela 4 - Efeitos do Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em frequências de PCE.....	54
Tabela 5 - Resultados do ensaio do cometa alcalino de ratos tratados por 14 dias com extrato aquoso de <i>S. sclerotiorum</i> e doxorubicina (DXR).....	56
Tabela 6 - Efeitos do Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em níveis de GSH e MDA.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata-Dextrose-Agar
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DMH	1,2 - dimetilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DXR	Doxorrubicina
EAS	Extrato Aquoso de <i>S. sclerotiorum</i>
ESI	Ionização por Eletrospray
ESI-MS	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
LANTIN	Laboratório de Avaliação Nutricional e Toxicológica <i>in vivo</i>
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malonaldeído
MGE	Eletroforese em microgel
MS	Espectrometria de Massas
MN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrócito Policromático Micronucleado
Na₂EDTA	Sal dissódico do Ácido Etilenodiaminotetracético
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCE	Normocromático

•NO	óxido nítrico
O₂•-	superóxido
OH•	radical hidroxil
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
p.c	Peso Corpóreo
PCE	Eritrócito Policromático
PGs	Poligalacturonases
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RO•	alcoxil
ROO•	peroxil
SCG	Ensaio de gel de célula única
SF	Solução Fisiológica
SOD	Superóxido dismutase
S.s	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
TRIS-HCl	Tris (hidroximetil) hidrocloreidrato aminometano
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	<i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS	18
3	MUTAGÊNESE E CÂNCER	23
3.1	TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA.....	24
3.2	TESTE DO COMETA.....	25
3.3	DOXORRUBICINA.....	27
3.4	ESTRESSE OXIDATIVO E SUA RELAÇÃO COM EVENTOS MUTACIONAIS.....	31
4	OBJETIVO GERAL	35
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5	PARTE EXPERIMENTAL	36
5.1	ISOLAMENTO DOS ESCLERÓDIOS E OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>S. SCLEROTIORUM</i>	36
5.2	CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE <i>S. SCLEROTIORUM</i>	38
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
5.4	TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE TESTE DO COMETA.....	40
5.5	ESTRESSE OXIDATIVO.....	41
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1	CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE <i>S. SCLEROTIORUM</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	43
6.2	CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE <i>S. SCLEROTIORUM</i> POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	45
6.2.1	Trealose	46
6.2.2	Manitol	47
6.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	50
6.4	TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA E TESTE DO COMETA.....	52
6.5	ESTRESSE OXIDATIVO.....	56
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Culturas de feijão, soja, algodão, batata, girassol, canola, ervilha, alfafa, fumo e tomate representam para o Brasil uma das mais importantes atividades agrícolas, por gerar recursos aos mais diversos segmentos da economia. Alguns deles como o feijão são consumidos como alimento diário da maioria da população do país. O Brasil é o maior produtor mundial de feijões respondendo em 2010/2011 por 16% da produção mundial e o consumo de feijão no país é de aproximadamente 16 Kg/hab/ano (CONAB, 2011; SALVADOR, 2011). Entretanto, um dos grandes desafios para essas produções tem sido o mofo-branco, também conhecido como Podridão de Sclerotinia, causado pelo fungo de solo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, (LEITE, 2005), o qual chega causar perdas de até 70% dessas culturas agrícolas (PERES; MELO, 1995).

Quando nos lotes, o fungo pode sobreviver nas sementes por 7 anos (NEERGAARD,1979), podendo estar misturado com as sementes na forma de escleródio (estrutura de resistência), ou localizar-se no interior das sementes, na forma de micélio dormente (LUCCA FILHO, 1985). A contaminação dos lotes de sementes dos produtos relacionados anteriormente é preocupante, uma vez que frequentemente os escleródios têm o mesmo tamanho, forma e peso específico dos produtos, como o feijão e a soja, o que dificulta ou impede sua remoção na operação de limpeza (LEITE, 2005).

Frequentemente, estes lotes chegam ao mercado contaminados com escleródios de *S. sclerotiorum* que são consumidos despercebidos devido a inadequações nos procedimentos de limpeza das sementes, de rotação de cultura, de práticas de manejo, controle químico do campo e até mesmo máquinas agrícolas procedentes de áreas contaminadas, devido o uso de sementes de má qualidade sanitária (MACHADO et al., 2008).

Mesmo com a retirada dos escleródios dos lotes de sementes, aquelas já infectadas com o micélio dormente dificilmente serão detectadas sem a ajuda de um laboratório especializado, seguindo para a plantação ou consumo (NASSER; NAPOLEÃO; CARVAJAL, 1999). Devido à relevância das sementes na disseminação da patogenicidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA implantou a Portaria 47 de 26 de Fevereiro de 2009 que retrata o padrão de tolerância zero para *S. sclerotiorum* em 500 g de sementes de algodão, feijão, girassol e soja da classe básica e certificada com o propósito de evitar a comercialização de lotes de sementes contaminados com escleródios e restringir assim sua disseminação para outras áreas de cultivo (BRASIL; MAPA, 2009).

Apesar dessa vigilância no controle de escleródios do fungo *S. sclerotiorum* para a agricultura, na prática ainda observa-se que em alguns lotes de soja e feijão chega-se a encontrar misturas com sementes contendo até 50% de escleródios como parte da fração impura do lote (Manual de Análises Sanitária de Sementes/MAPA, 2009). Mesmo com esse nível de infestação chegando ao consumidor, ainda não existem dados sobre as consequências da ingestão deste fungo nos alimentos que são base da alimentação humana.

Diante disso, há uma crescente preocupação nos possíveis efeitos da ingestão de alimentos contaminados com *S. sclerotiorum*. Para essa verificação, neste trabalho foram realizados testes toxicológicos *in vivo* (teste do micronúcleo de medula óssea e eletroforese de DNA) e análise do estresse oxidativo (MDA e GSH) com a finalidade de fornecer dados que possam ser utilizados para avaliação do consumo de *S. sclerotiorum* para a saúde humana. Uma vez que, a experimentação *in vivo* busca comprovar atividades específicas das substâncias de forma eficaz além de oferecer segurança ao consumidor por meio do controle de qualidade dos produtos.

Para essa finalidade, foi realizada caracterização preliminar do fungo através da Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear do extrato aquoso de *S. sclerotiorum* e da avaliação do potencial mutagênico *in vivo*.

Figura 1- Descarte no beneficiamento de sementes de soja.



Fonte: Prof. J.C. Machado (UFLA-MG).

2 SCLEROTINIA SCLEROTIORUM E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS

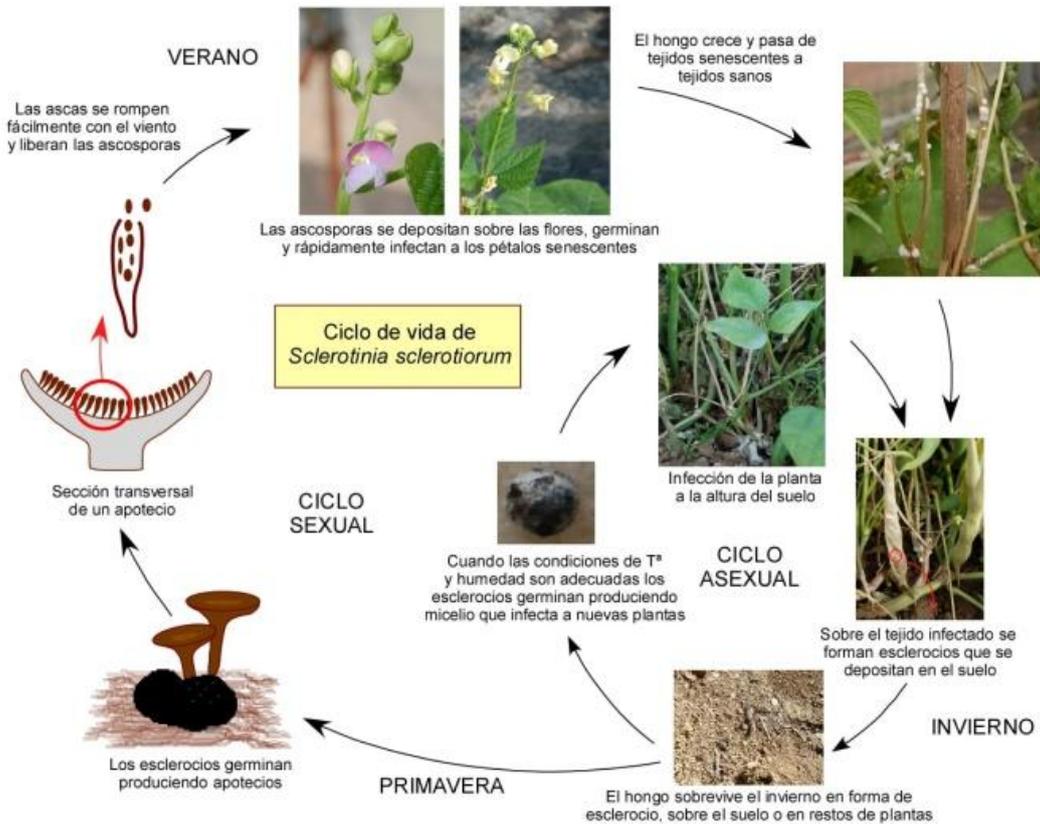
O agente causal em foco pertence ao reino fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero Sclerotinia. Anamorfo: Fungos mitospóricos, grupo dos hifomicetos (JULIATTI e JULIATI, 2010; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2005).

No Brasil, o fungo *S. Sclerotiorum* foi visto pela primeira vez em 1921, na batata (*Solanum tuberosum L.*), no estado de São Paulo (CHAVES, 1964). O patógeno pode ocorrer em solos infestados e em condições de temperaturas de 15 a 25°C, bem como alta umidade e pH entre 4,5 – 5,0 (COSTA, 1997).

É um fungo polífago que tem como hospedeiros plantas de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies e produz estruturas de resistência responsáveis por sua sobrevivência denominadas escleródios (LEITE, 2005) inicialmente brancos, passando a negros quando maduros (STEADMAN, 1983). Segundo Tokeshi (2002), este fungo pode ficar no estado de dormência por vários anos. Assim, o excesso de esterco, o uso de agrotóxicos, solo compactado, umidade excessiva realizada em certas épocas do ano, proporciona ao fungo condições favoráveis para seu desenvolvimento, uma vez que a instabilidade química, física ou biológica do solo contribui para que pequenos apotécios ou cogumelos liberem esporos (ascóporos).

O processo de disseminação de *S. Sclerotiorum* pode ocorrer através da germinação miceliogênica ou carpogênica (LEITE, 2005). Na germinação miceliogênica ocorre a produção de hifas diretamente dos escleródios que são encontrados no solo ou em restos de culturas contaminada, que ao germinar, suas hifas colonizam matéria orgânica morta e continuam crescendo, formando um micélio vigoroso. Ao entrar em contato com a planta hospedeira, este micélio coloniza todos os tecidos senescentes ou mortos e posteriormente invade rapidamente as partes sadias (PURDY, 1979). A germinação carpogênica, consiste no desenvolvimento de apotécio e produção de ascóporos que são lançados ao ar (MOURA, 2008), iniciando a infecção através do contato com o tecido suscetível. Após a invasão do tecido hospedeiro por micélio, são formados escleródios que frequentemente retornam ao solo (PURDY, 1979) sobrevivendo por até 11 anos a espera de culturas vulneráveis (LEITE, 2005).

Figura 2 - Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: www.potatodias.es

Figura 3 - Crescimento celular de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultura. (1). Observação das hifas em microscopia óptica comum. (2). Escleródios em placa Petri.



Fonte: www.whitemoldresearch.com (acesso em Abril de 2011)

Toda a parte aérea da planta é atacada no início da floração ou após a polinização das flores. O aspecto murcho da planta é o primeiro indício da patogenicidade. São encontradas lesões encharcadas nos órgãos infectados com coloração parda de consistência mole, com micélio branco de aspecto cotonoso (mofo branco), cobrindo os tecidos da planta. Com a

evolução da doença, as folhas e caules infectados tornam-se marrons e permanecem eretos mesmo com a morte da planta (RIBAS, 2010).

A figura abaixo mostra os sintomas do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). (1) Formação de apotécios em feijoeiro; (2) Contaminação concomitante com sementes; (3) Micélio branco em feijoeiro; (4) Escleródio formado na haste da batata

Figura 4 - Sintomas do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*).



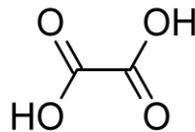
Fonte: MOURA, 2008; RIBAS, 2008.

O início do processo patogênico se deve a síntese e secreção de ácido oxálico pelo fungo (DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2005) que exerce efeito tóxico atacando e degradando a complexa estrutura da parede celular da planta hospedeira (MOURA, 2008). Em *S. sclerotiorum*, o ácido oxálico é produzido a partir de oxaloacetato em uma reação catalisada pela enzima oxaloacetato acetil-hidrolase, e a sua atividade enzimática aumenta de forma proporcional à diminuição de pH do meio. Sua catálise é mediada pela ação da enzima oxalato descarboxilase, presente em altas concentrações intracelulares neste fungo (ROLLINS e DICKMAN, 2001) favorecendo o desenvolvimento de escleródios (estrutura de resistência). Desta forma, o potencial patogênico está diretamente relacionado com a produção do oxalato e a alteração do pH do meio (MOURA, 2008), visto que, cultivares isolados de *S.sclerotiorum*

analisados que não secretavam oxalato não eram capazes de infectar seus hospedeiros, não sendo desta forma, patogênicos (GODOY; COSTAMILAN; MEYER, 2005).

O ácido oxálico secretado além de degradar a célula hospedeira exercendo efeito tóxico à planta age como quelante de íons cálcio (Ca^{2+}), desestabilizando o sistema bioquímico funcional do hospedeiro, sequestrando o cálcio da parede celular e suprimindo o estresse oxidativo gerado pela planta (FAVARON; SELLA; D'OVIDIO, 2004). A capacidade que o fungo *S. Sclerotiorum* tem em secretar ácido oxálico promove ambiente propício para que enzimas ajam sobre a parede celular da planta hospedeira, destruindo a parede, invadindo e parasitando a célula (COTTON; RASCALE; FEVRE, 2002). Estas enzimas aumentam suas atividades em condições ácidas devido a ação quelante do ácido oxálico e mudanças de pH (ROLLINS e DICKMAN, 2001). A ação de enzimas como proteases, pectinases, em especial endo-polygalacturonases e outras enzimas hidrolíticas sobre o hospedeiro contribuem para a extração de compostos e nutrientes essenciais ao crescimento, propagação e sobrevivência do fungo (MOURA, 2008).

Figura 5 - Representação estrutural do ácido oxálico.



Fonte: FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002.

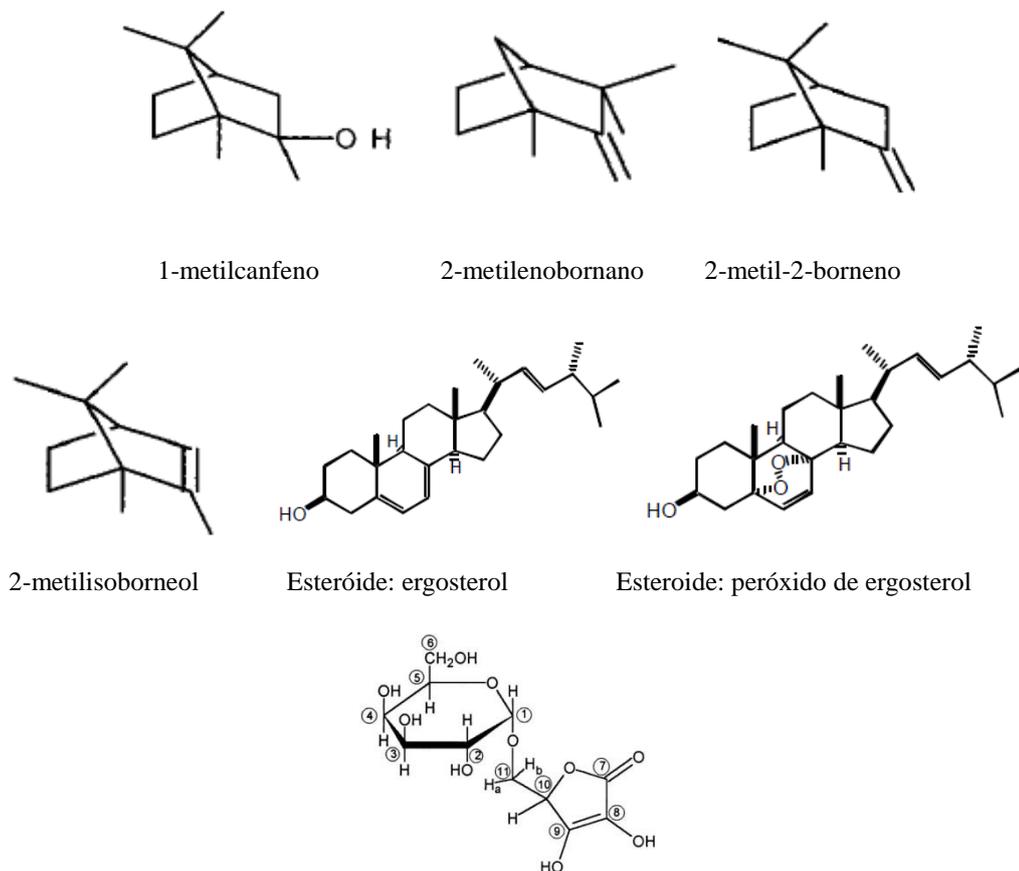
Dentre as várias enzimas secretadas por *S. sclerotiorum* estão as poligalacturonases (PGs) e as β – glucanas. As poligalacturonases são um grupo composto por isoformas que atuam em conjunto sobre as ligações endo e exo dos polímeros de ácido poligalacturônico da pectina presente na parede celular da planta hospedeira, cuja ação é a maceração tecidual, quebra do talo e morte do hospedeiro (FAVARON; SELLA; D'OVIDIO, 2004). A atividade das β – glucanas ocorre em todos os estágios do ciclo da vida do fungo e está associada à ação saprofítica e micoparasitária, degradação de polissacarídeos e patogenicidade (PITSON; SERVIOR; MCDOUGALL, 1993).

Além de estudos para compreender as ações e atividades das enzimas fúngicas durante todos os estágios do ciclo da vida fúngica, o interesse no estudo e obtenção dessas enzimas por métodos de caracterização e purificação vêm crescendo muito por apresentarem potencial de

aplicação industrial nas áreas de alimentos, rações animais, cosméticos, como agentes imunomoduladores e para fins terapêuticos (GIESE, 2008).

A literatura relata alguns compostos químicos voláteis emitidos por escleródios de *S. sclerotiorum*, como: 2-metil-2-borneno, 1-metilcanfeno, 2-metilenobornano, 2-metilisoborneol e diterpeno MW 272. O odor característico terroso e mofado que o fungo *S. sclerotiorum* exala é proveniente do composto 2-metilisoborneol (FRAVEL et al., 2002). Outro composto identificado como parte da composição química deste fungo é 5-O-(α -D-Galactopiranosil)-D-Glicero-Pent-2-Enono-1,4-Lactona, que auxilia na produção do ácido oxálico (KEATES et al., 1998). Além desses compostos, esteróides como ergosterol e peróxido de ergosterol, triglicerídeos e ácidos graxos foram identificados por GARCEZ et al., (2005) através de cromatografia em coluna Sephadex LH-20, seguida por cromatografia em coluna delgada preparativa em sílica gel. Porém, ainda pouco se conhece sobre a constituição química do fungo *S. sclerotiorum*.

Figura 6 - Estrutura dos constituintes químicos obtidos de escleródios de *S. sclerotiorum*.



5-O-(α -D-Galactopiranosil)-D-Glicero-Pent-2-Enono-1,4-Lactona

Fonte: GARCEZ et al., 2005; KEATES et al., 1998.

3 MUTAGÊNESE E CÂNCER

Frequentemente, o DNA sofre agressões por substâncias exógenas e endógenas. No entanto, as células possuem sistemas enzimáticos capazes de reparar a grande maioria desses danos. Embora esses sistemas sejam eficientes, algumas lesões, ou mesmo erros espontâneos durante a replicação do DNA, não são reparados, podendo resultar em evento mutagênico. Esse evento pode corresponder à etapa de iniciação de um processo carcinogênico (TUCKER e PRESTON, 1996; RAMEL, 1984).

Três tipos principais de alterações genéticas podem ocorrer: (1) alterações no DNA conhecidas como mutação de ponto, (2) alterações da estrutura de cromossomos, tais como quebras e rearranjos e (3) separação desigual dos cromossomos durante a divisão celular. Tais alterações são conhecidas como iniciação, esta é seguida das etapas de promoção, progressão e manifestação (TAO et al. 2008; PITOT, 1993).

A iniciação corresponde à interação do agente químico com o DNA da célula-alvo, levando à mutação; a promoção caracteriza-se pela proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, como os focos de células alteradas (PITOT et al., 1987; BANNASCH, 1986); a progressão, por sua vez, é caracterizada, morfológicamente, por anaplasia e, biologicamente, por crescimento autônomo (PITOT, 1989). Quando as células adquirem a capacidade de invadir e metastatizar e todas essas alterações forem evidenciadas clinicamente, ter-se-á a última etapa, a manifestação. A correlação observada entre a mutagenicidade e a carcinogenicidade é consistente com a teoria de que o câncer é causado por mutações somáticas (ZAKRZEWSKI, 1997).

Um grande número de substâncias do meio ambiente pode interagir com o sistema genético do homem e de outros animais, levando às mutações, outras substâncias já exercem efeitos contrários, sendo estas conhecidas como quimiopreventivos (CAVIN et al., 2002).

Os testes toxicológicos têm o intuito de fornecer dados que possam ser utilizados para o estudo dos riscos do uso de substâncias químicas para o homem e, ao mesmo tempo, estabelecer limites de segurança na exposição aos agentes químicos (BRITO, 1994). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que regulamenta tais testes, incluindo o de carcinogenicidade/mutagenicidade (ANVISA, 2011).

3.1 TESTE DE MICRONÚCLEO DE MEDULA ÓSSEA

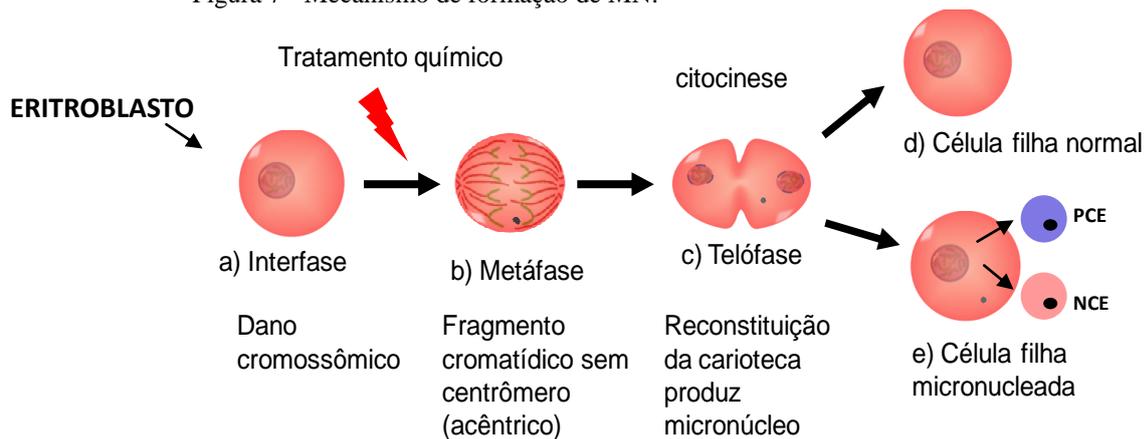
O teste do micronúcleo é um método citogenético, utilizado para avaliação de danos cromossômicos *in vivo*, o que permite a consideração de mecanismos de absorção, acumulação e eliminação de xenobióticos e interações com compostos que podem levar a efeitos sinérgicos ou antagônicos (FENECH, 1997; MACGREGOR et al., 1987).

É um ensaio, *in vivo*, baseado na contagem de núcleos diminuídos no citoplasma de células recém-formadas. Os micronúcleos (MN) são estruturas originadas de fragmentos cromatídeos, cromossômicos e até mesmo de cromossomos inteiros, não incorporados às células-filhas durante o processo de divisão celular (Figura 7). Uma das possíveis causas da sua formação é o atraso que ocorre durante a anáfase, em que ocorre a migração do material genético para os pólos da célula. As estruturas são arredondadas, com cor e textura semelhantes ao núcleo principal, mas são menores do que o núcleo principal da célula, daí o termo micronúcleo (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; FENECH, 2000). Deste modo, a ocorrência de micronúcleos reflete a ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células-mãe (HAYASHI et al., 1994; CARRANO e NATARAJAN, 1988).

Os micronúcleos são avaliados em eritrócitos imaturos (eritrócitos policromáticos - PCE) e em eritrócitos normocromáticos (NCE). Os PCE são células que permanecem na medula óssea cerca de 12 a 24 h e, posteriormente, passam para a circulação, onde ficam por um período de tempo semelhante, e vão gradualmente amadurecendo até se transformarem em eritrócitos normocromáticos, os quais permanecem na circulação por aproximadamente um mês (MAVOURNIN; BLAKEY; CIMINO, 1990).

Os resultados positivos obtidos com o Teste de Micronúcleo fornecem fortes evidências de mutagenicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, isto é, quando ocorre exposição dos eritroblastos de medula óssea a agente indutor reconhecido, como doxorubicina, os resultados da contagem de micronúcleos nesse tecido apresentam com clareza os seus efeitos lesivos que repercutem em genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* (AZEVEDO et al, 2010; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; MOOLENBEEK e RUITENBERG, 1981).

Figura 7 - Mecanismo de formação de MN.



Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/sobremn.html>, acesso em Maio de 2012.

3.2 TESTE DO COMETA

O teste do cometa também conhecido como SCG (“*single cell gel assay*”) ou MGE (“*microgel electrophoresis*”) foi primeiro introduzido por RYDBERG e JOHANSON (1978), para quantificar diretamente danos no DNA de uma célula individualizada. Com a finalidade de aumentar a sensibilidade do teste para a detecção desses danos, ÓSTLING e JOHANSON (1984), desenvolveram uma técnica utilizando eletroforese de microgel, hoje conhecida como teste do cometa que era sensível apenas para a detecção de quebras de fita dupla do DNA (KLAUDE et al., 1996).

É uma técnica bastante sensível para a detecção de agentes genotóxicos, quer *in vivo* ou *in vitro* (HARTMANN e SPEIT, 1997). Essa técnica apresenta uma série de vantagens que inclui a possibilidade de utilização tanto de células sanguíneas como de outros tecidos (SASAKI et al., 1997); sensibilidade e reprodutibilidade (FAIRBAIRN; OLIVE; O’NEILL, 1995; TICE, 1995); além de utilizar amostras celulares extremamente pequenas, permitindo a verificação de danos em células individuais. Dessa forma, situações adversas de exposição, resultantes do uso inadequado de agentes nocivos, podem ser facilmente monitoradas no ambiente (KLAUDE et al., 1996, e FAIRBAIRN; OLIVE; O’NEILL, 1995).

Em estudos *in vivo* o Teste Cometa indica os agentes que mudam a sequência do DNA, os chamados genotóxicos. É uma técnica simples, rápida, sensível e de baixo custo que apresenta como principal diferença envolver microeletroforese em condições alcalinas

(pH>13) (SINGH et al., 1988). Nesse pH, o aumento de migração do DNA está associado a quebras de fita simples e duplas, sítios alcali-lábeis e à expressão de sítios com reparo incompleto. Devido à maioria dos agentes genotóxicos induzirem mais quebras de fitas simples e sítios alcali-lábeis do que quebras de fita dupla, a versão alcalina do ensaio oferece maior sensibilidade para detecção de agentes genotóxicos. Esse teste, por se tratar de uma técnica que pode ser utilizada em estudos de toxicogenética, reparo de DNA, monitoramento ocupacional e ambiental e epidemiologia humana, tem sido amplamente empregado em estudos de mecanismos de mutagênese e carcinogênese (HARTMANN e SPEIT, 1999).

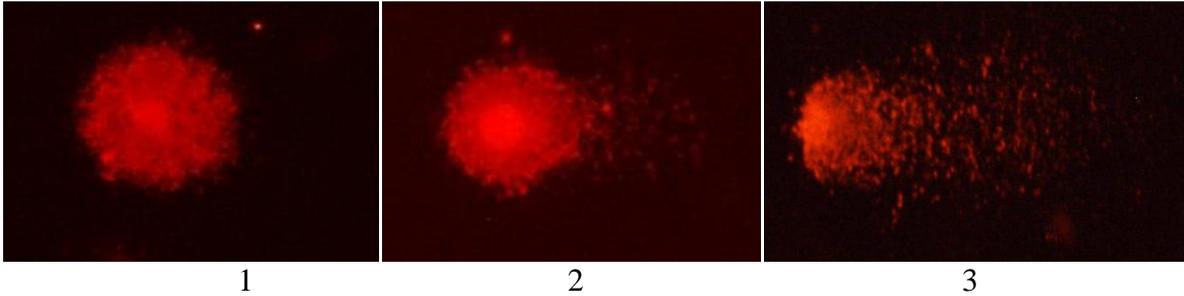
Em pH neutro, a continuidade da molécula de fita dupla não é afetada por ocasionais quebras de fita única. Entretanto, quando submetidas a pH alcalino, as quebras influenciam profundamente o comportamento do DNA (MCKELVEY et al., 1993). O pH acima de 12,3 permite o desenrolamento, a desnaturação e a expressão das quebras de fita única, bem como das lesões álcali-lábeis, que somente são detectadas após exposição a agentes alcalinos. Um dos princípios básicos é o de que as quebras de fita única só são detectadas se o pareamento de bases for rompido (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

O ensaio do cometa baseia-se, portanto, na lise, eletroforese e marcação fluorescente do DNA de pequena quantidade de células suspensas numa fina camada de agarose e colocadas sobre uma lâmina de microscópio. A corrente elétrica faz com que fragmentos de DNA do núcleo da célula migrem mais rapidamente em direção ao pólo positivo, resultando em imagens com aparência de “cometas”, as quais são medidas a fim de determinar a extensão do dano. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam cauda, enquanto que células com mais danos, apresentam caudas maiores (Figura 8) (SPEIT et al. 1996).

A técnica mais utilizada para quantificar os danos detectados pelo teste do cometa envolve a utilização de *softwares* específicos para análise de imagem de células individuais, permitindo a avaliação da proporção de DNA que migra para formar a cauda do cometa (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

O teste do cometa é uma técnica que detecta danos recentes, ainda passíveis de reparo, enquanto que o teste do MN detecta danos já consolidados, por isso, o uso de ambos os métodos em um mesmo delineamento atuam como biomarcadores que permitem sugerir características de exposição na avaliação do potencial mutagênico, nos estudos de reparo de DNA e apoptose (MOLLER, 2006; MALUF, 2004; KOPJAR; GARAJ-VRHOVAC; MILAS, 2002).

Figura 8 - Células sem ou com dano no DNA: Célula sem dano no DNA (1); Célula com pouco dano no DNA (2); Célula com dano no DNA (3).

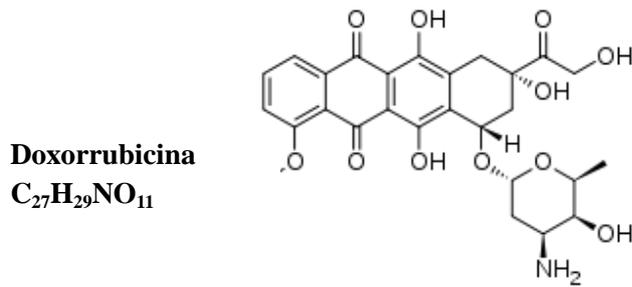


Figuras obtidas do microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i.
Fonte: Galeria de fotos do grupo LANTIN.

3.3 DOXORRUBICINA

A droga doxorubicina (DXR), é utilizada como indutora de lesões genotóxicas/mutagênica, pois a droga em questão é capaz de induzir lesões no DNA e em células em divisão. Ela é originalmente isolada do fungo *Streptomyces peucetius* (ARCAMONE; CASSINELLI; FRANCESCHI, 1972) e está entre os mais efetivos agentes antineoplásicos utilizados na quimioterapia de câncer de mama, fígado e pulmão. Tem a constituição básica de uma antraciclina, a qual possui quatro anéis aromáticos, assim como um açúcar ligado na posição sete do primeiro anel (Figura 9). Entretanto, uma cardiotoxicidade, aguda e crônica, está entre suas complicações de uso (TOKARSKA-SCHLATTNER; WALLIMANN; SCHLATTNER, 2006), sendo esta possivelmente causada pelo aumento de estresse oxidativo e apoptose (SPALLAROSSA et al., 2004). Sua estrutura é formada por um anel de quinona e de hidroquinona, que funcionam como doador e acceptor de elétrons, sendo um potente gerador de radicais livres, que contém um ou mais elétrons não pareados, e espécies reativas do oxigênio (DAVIES e DOROSHOW, 1986). Sua interação com o ferro, leva à formação de radicais tóxicos para o organismo (MYERS, 1998).

Figura 9 - Estrutura da Doxorrubicina.

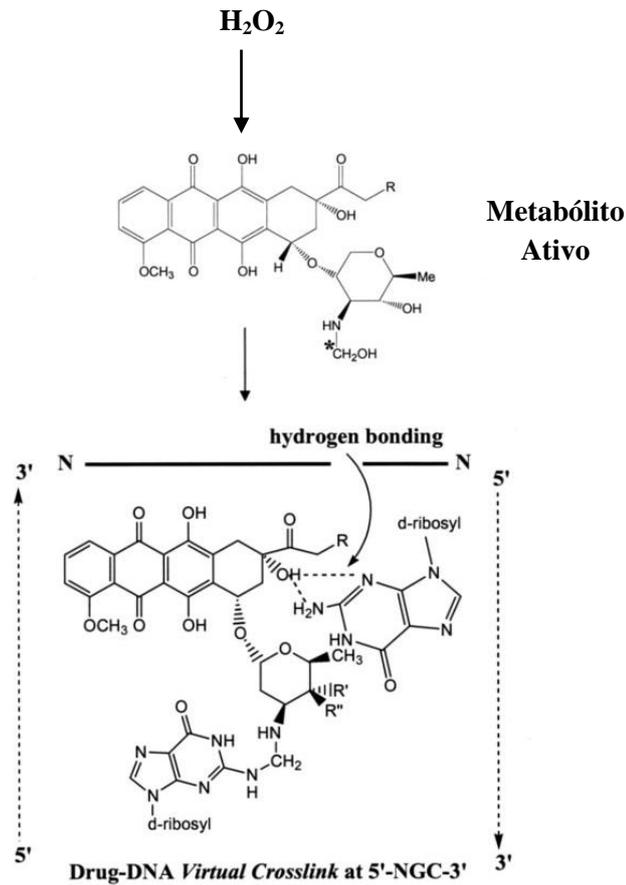


Fonte: MINOTTI et al., 2004.

Os radicais formados pela DXR geram danos induzidos nas macromoléculas celulares durante uma situação de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, comumente chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993). Além de formar radicais livres, a DXR tem capacidade de alquilar diretamente o DNA, induzindo a formação de ligações entre as duas fitas de DNA. (MINOTTI et al., 2004). Tendo como consequência a indução de aberrações cromossômicas (RUEFF et al., 1993; SHAMBERGER et al., 1973), desenvolvimento de tumores (DUTHIE et al., 1996; CERUTTI, 1994;) e degeneração celular que leva ao processo de envelhecimento (ROY e KULKARNI, 1996; WITZUM, 1994; AMES, 1993). É um antibiótico antineoplásico do tipo intercalante (Figura 10), pertencente ao grupo das antraciclinas, sendo que o anel antraciclínico é lipofílico e possui uma série de hidroxilas na porção saturada juntamente com grupos aminoaçúcares, conferindo-lhe caráter hidrofílico, ou seja, a DXR possui anfotericidade, uma vez que tem características ácidas na porção fenólica e características básicas na porção dos aminoaçúcares. Com isso, sua passagem através das membranas fica facilitada e sua permanência no organismo é relativamente longa (SINGAL et al., 2000).

A Figura 10 ilustra a DXR reagindo com HCHO liberado a partir de fontes de carbono por meio de reações catalisadas pelo radical livre Fe(II) e forma o radical superóxido. Este radical é desmutado para H_2O_2 e introduz a reação catalisada de Haber-Weiss pelo radical livre Fe(II) pra formar o radical hidroxila. Assim, a DXR se liga covalentemente nas fitas de DNA através de um grupo metileno e ligação de hidrogênio (*crosslinking*), intercalando-se entre as bases Citosina-Guanina

Figura 10 - Intercalação da DXR com o DNA

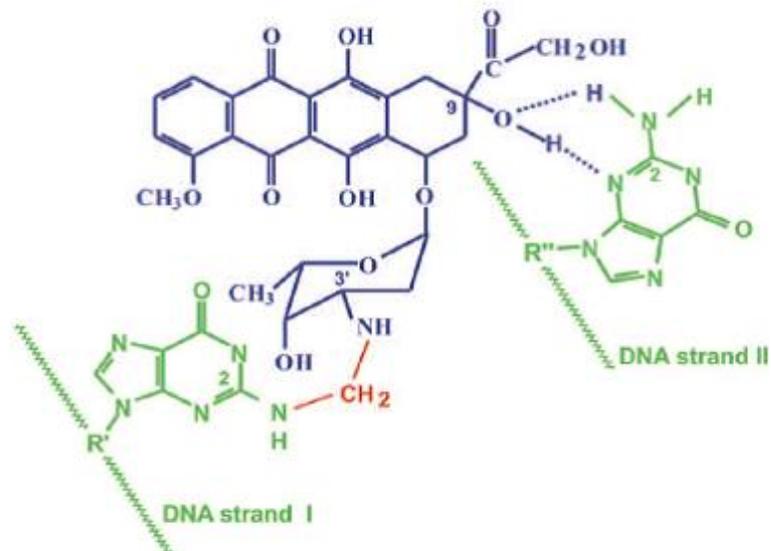


Fone: MINOTTI et al., 2004.

Outra ação da DXR é a formação de adutos com o DNA, quando é produzido aldeído (formaldeído) provido da oxidação da própria droga. O aldeído formado estabelece uma ligação covalente entre uma das fitas do DNA com o açúcar da DXR, enquanto que com a outra fita, há interação da droga através de ligações de hidrogênio. (SWIFT et. al., 2006).

Na Figura 11 mostra a ligação covalente da DXR com uma das fitas de DNA, a qual utiliza o carbono proveniente do formaldeído (vermelho), e as ligações de hidrogênio com a outra fita de DNA, as quais estabilizam a formação do aduto (CUTTTS et al., 2005).

Figura 11 - Estrutura química de um aduto de DNA formado pela DXR



Fonte: CUTTS et al., 2005.

A doxorubicina tem capacidade em formar complexo ternário com o DNA e com a topoisomerase II (enzima que promove reparo na estrutura do DNA), induzindo a formação de quebras nas fitas duplas do DNA, podendo levar a uma parada do ciclo celular (permite à célula, recrutar enzimas de reparo) ou morte por apoptose (MINOTTI et. al., 2004). Testes realizados em *Drosophila melanogaster* por Lehmann e colaboradores (2003) mostraram que os danos induzidos pela DXR são reparados preferencialmente pelo processo de recombinação homóloga (rearranjo físico que ocorre nas cadeias de DNA).

A utilização de DXR na indução de mutagenese é uma possibilidade, devido seu uso regular na terapia antineoplásica (SIMEONI et al., 2008). Portanto, considerando que a maioria dos fármacos antineoplásicos atua em células com rápida divisão celular e tem baixa toxicidade seletiva (não específicos), afetam também células normais que têm alta taxa de divisão, gerando os efeitos indesejados, o que agrega resultado para verificar o caráter mutagênico/antimutagênico de determinadas substâncias.

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO E SUA RELAÇÃO COM EVENTOS MUTACIONAIS

O início da formação do tumor geralmente consiste numa alteração do DNA por metabólitos eletrofílicos ou oxidantes e, portanto, com alta capacidade de lesionar as moléculas de ácidos nucléicos, que podem ser combatidos por anticarcinogênicos/antioxidantes. Estes são agentes de bloqueio, inibem a ação dos metabólitos e protegem o DNA contra possíveis alterações (TAO et al., 2008).

Há na literatura uma grande relação de estresse oxidativo e das fases de iniciação e promoção do processo de carcinogênese. Estudos clínicos indicam que diversas doenças inflamatórias são, mediadas em parte, pelo desequilíbrio entre espécies oxidante e antioxidante. Dessa forma, o estresse oxidativo no tecido inflamado pode estar relacionado às fases de iniciação e promoção do processo de carcinogênese. As enzimas antioxidantes, dependentes de zinco e cobre que antagonizam este processo estão em baixos níveis nas células tumorais. Tem sido demonstrado que os tumores apresentam menores concentrações da enzima superóxido dismutase dependente de zinco e cobre em comparação aos tecidos normais (GRIGOLO et al., 1998). Além do selênio, o zinco é frequentemente mencionado na literatura como um mineral "antioxidante" envolvido nos mecanismos celulares de defesa contra os radicais livres. Esses metais intracelulares (Cu, Fe, Se e Zn) contribuem para a atividade proteica quando presente no centro das moléculas longas (metaloenzimas) com atividades enzimáticas (SPUNAR, 2004).

O Cu e Fe, por exemplo, são transportados, utilizados e estocados ligados a proteínas específicas como ceruloplasmina, ferritina e transferrina, as quais previnem ou minimizam as reações catalisadas por estes minerais. O Se e Zn também estão envolvidos em mecanismos celulares de defesa e tem sido demonstrado que as enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, dependentes de minerais antagonizam processos de carcinogênese (WELCH; DAVIS; VAN EDEN, 2002; ALFIERI; LEUNG; GRACE, 1998; GRIGOLO et al., 1998). Entretanto, segundo Birt (1986), estudos mostraram que a suplementação desses minerais "antioxidantes" pode aumentar os 30 processos de carcinogênese, sendo assim recomenda-se cautela na administração para os seres humanos.

De modo geral, a participação de metais, ao contrário dos compostos bioativos, pode ter efeitos negativos nas reações celulares, pois os metais possuem fatores bioacumulativos, que provocam alterações significativas no fígado de animais. Por recomendações nutricionais

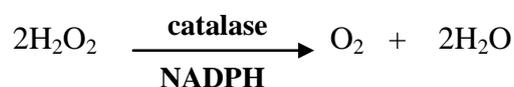
é necessária ingestão moderada de alguns metais como Co, Fe, Zn e Mo para o bom desenvolvimento e manutenção do organismo, sendo que uma longa ingestão de alimentos que contem esses metais pode causar distúrbios no metabolismo (REGLERO et al., 2009).

Ainda, estudos estão sendo realizados com o intuito de melhor compreender os efeitos das substâncias antioxidantes na saúde humana, dessa forma o estudo de estresse oxidativo produzido por radicais livres, tem sido tema de diversos trabalhos. O termo radical livre refere-se a todo átomo ou molécula que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica e dentre eles destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}), peroxil (ROO^{\bullet}), alcóxil (RO^{\bullet}) e o óxido nítrico ($\bullet NO$) (CAROCHO; FERREIRA, 2013; FANG et al., 2002).

Os radicais livres são espécies orgânicas e inorgânicas provenientes da ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular, produzidos continuamente durante os processos metabólicos. Assim, os radicais livres atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. Eles podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio ativo de formação (GONSEBATT et al., 2009). Suas concentrações são reguladas pela enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 , conforme apresentado em detalhe na Figura 12.

A catalase (CAT) é uma enzima que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, conforme apresentado na equação abaixo (Figura 12). A atividade normal da cadeia de transporte de elétrons leva à formação de baixas quantidades de ânion superóxido (O_2^-) que, sob a ação da superóxido dismutase (SOD), dá origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é convertido em água pela atuação da glutathiona peroxidase (GPx), através do consumo de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH), que são simultaneamente ligadas através de ligações dissulfeto, obtendo-se a forma oxidada da glutathiona (GSSG) (CAROCHO et al., 2013).

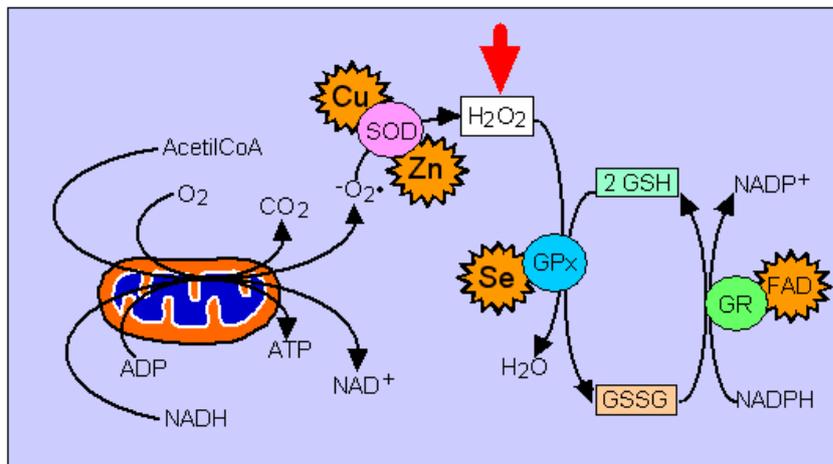
Figura 12 - Equação de dismutação de H_2O_2 pela catalase.



Fonte: KEHRER, 2000.

Para a continuidade do processo, a GSSG deve ser novamente convertida à GSH, através da atuação da glutathiona redutase (GR). Assim, a eliminação de radicais livres requer a ação consecutiva de diversas enzimas: SOD - dependente de cobre (Cu) e zinco (Zn), GPx - dependente de selênio (Se), e GR - dependente de flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) (FANG, et al., 2002). Através da combinação de uma elevada produção de O_2^- e de uma ineficiente atividade do ciclo 2GSH GSSG, prevê-se um acúmulo de H_2O_2 o que propiciará a ocorrência da reação de Fenton, também favorecida pelo aumento da disponibilidade de ferro solúvel (Fe^{+2}) pela redução da capacidade de armazenamento do ferro (Fe^{+3}) na ferritina.

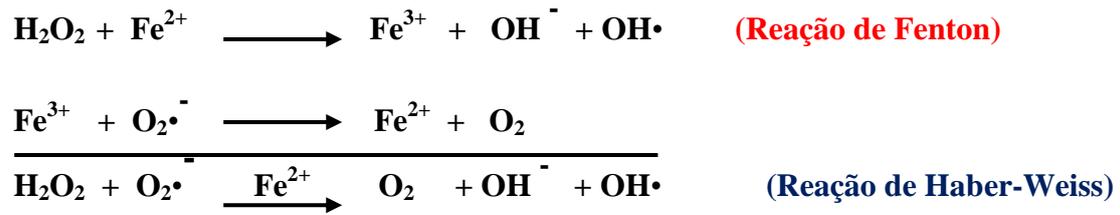
Figura 13 - Mecanismos mediadores da morte celular e estresse oxidativo; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathiona peroxidase; GSSG: glutathiona oxidada; GSH: glutathiona reduzida; GR: glutathiona redutase.



Fonte: <http://www.unifesp.br> (acesso em Abril de 2011).

A formação do radical $OH\cdot$ a partir de H_2O_2 depende essencialmente da catálise de íons ferrosos (Fe^{+2}) ou cuprosos (Cu^+) na reação de Fenton (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1992). As formas férrica (Fe^{+3}) ou cúprica (Cu^{+2}) não promovem diretamente a decomposição do H_2O_2 a $OH\cdot$, mas podem ser diretamente reduzidas às formas iônicas catalíticas ao reagirem com radicais $O_2\cdot^-$. Estas duas reações podem ser acopladas à reação de Fenton, compondo a denominada reação de Haber-Weiss, com redução dos cátions férricos por radical superóxido e reação de Haber-Weiss catalisada por íons ferrosos, processo mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Reação de Fenton.



Fonte: HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1992.

Alguns estudos mostraram que a formação de radicais livres *in vivo* ocorre durante o metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Segundo Halliwell e Gutteridge (1992), o combate aos radicais livres se dá por meio dos antioxidantes que podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos do alimento ingerido. Os antioxidantes são substâncias, que quando presente em baixa concentração comparada com o substrato oxidável regenera esse substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (CAROCHO et al., 2013).

4 OBJETIVO GERAL

A proposta deste trabalho constitui em avaliar o efeito da ingestão de *S. sclerotiorum* através do experimento *in vivo* para analisar o potencial mutagênico, bem como realizar caracterização preliminar do extrato aquoso de *S. sclerotiorum*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho compõem-se das seguintes etapas:

1. Análise preliminar do extrato aquoso de *S. sclerotiorum* por Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear;
2. Verificar o efeito mutagênico/antimutagênico do extrato aquoso de *S. sclerotiorum* sobre lesões de DNA e pré-neoplásicas em camundongos;
3. Conduzir experimento animal, avaliando os dados de evolução nutricional dos animais;
4. Realizar os testes de micronúcleo de medula óssea, eletroforese de DNA de sangue periférico (teste do cometa) e estresse oxidativo do fígado obtido (MDA e GSH).

5 PARTE EXPERIMENTAL

Para atingir os objetivos do trabalho foi realizado o isolamento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG).

Grande parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Análise Nutricional e Toxicológica *in vivo* – LANTIN, na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, onde foram produzidos os extratos e doses experimentais, conduzidos os experimentos animais, além da realização dos procedimentos para o teste do cometa, teste do micronúcleo (de medula óssea) e estresse oxidativo.

A análise do extrato aquoso por espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP). E, a análise de Ressonância Magnética Nuclear do extrato fúngico foi realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Universidade Federal de Alfenas/Campus II – UNIFAL-MG.

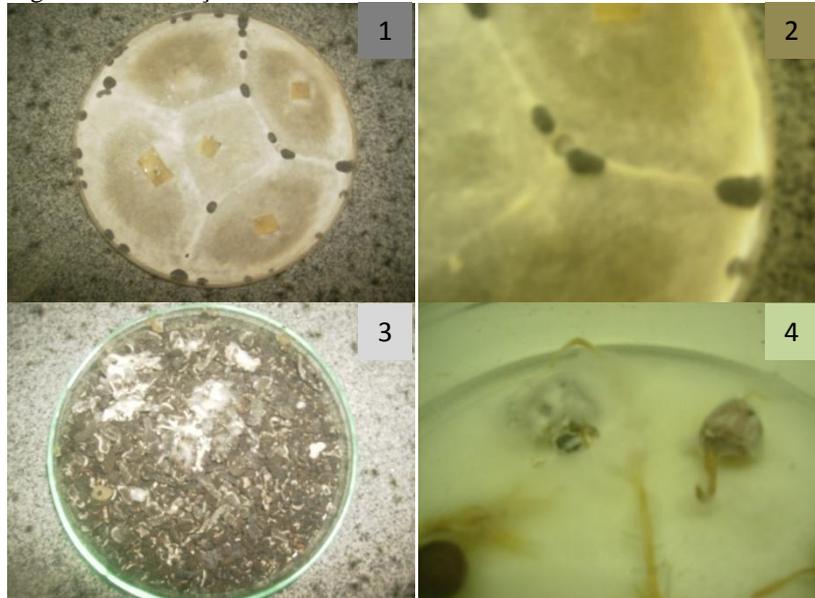
5.1 ISOLAMENTO DOS ESCLERÓDIOS E OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Os escleródios foram obtidos a partir de isolados fúngicos provenientes de plantas infectadas pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG). Para isso discos de micélio de cultura pura foram distribuídos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) e armazenadas em câmaras de incubação com temperatura de $20^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas até a formação de escleródios, conforme mostrado abaixo.

A Figura 15 ilustra o processo de obtenção e isolamento do fungo. Onde (1) Reprodução da *S. sclerotiorum* a partir de pequenos segmentos da cultura pura do fungo, distribuídos em cima do meio de cultura BDA (batata dextrose agar), após incubação em câmara a 20°C entre 5-7 dias. (2) Crescimento de colônias e formação dos escleródios (forma de resistência do Mofo Branco). (3) Os escleródios formados em placa de Petri são recolhidos

e colocados em outra placa de Petri esterilizada e então armazenados em câmara a 20°C. (4) Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* junto a sementes de ervilha.

Figura 15 - Obtenção e Isolamento de *S. sclerotiorum*



Fonte: Laboratório de Patologia de Sementes - Universidade Federal de Lavras/MG.

Foram utilizados escleródios de *S. sclerotiorum* isolados originários da coleção CLM do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Após isolamento dos escleródios, o material fúngico foi separado e mantido em geladeira. Foram pesados 60 g de escleródios e posteriormente mergulhados em nitrogênio líquido para melhorar o processo de trituração. Após a trituração, os escleródios foram mergulhados em um béquer contendo 360 mL de água destilada, deixando em ebulição por 15 minutos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Em seguida, o material foi filtrado, dividido em vidros de penicilina previamente rotulados e pesados, sendo posteriormente congelados e liofilizados em LIOFILOZADOR L101 – LIOTOP/LIOBRAS.

Sabendo-se que grãos de feijão e soja quando contaminado com *S. sclerotiorum* corresponde ao principal veículo do fungo para o consumidor, sendo assim, no presente estudo foi utilizado extrato aquoso com o propósito de alcançar um processo similar ao do cozimento do feijão e soja.

5.2 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE *S. SCLEROTIURUM*

O extrato aquoso liofilizado de *S. sclerotiorum* foi misturado vigorosamente durante 2 minutos com 1 mL de solução contendo metanol e água deionizada na proporção 1:1 (v/v), além de ácido fórmico (0,1%) utilizado para facilitar o processo de ionização em modo positivo. Subsequentemente, o material insolúvel restante foi removido por centrifugação a 6000 g durante 5 min a 25° C. Finalmente, a solução resultante foi infundido diretamente, por meio de uma micro-seringa 500 µL (Hamilton, Reno, NV), a um caudal de 5 µL min⁻¹, para Ionização de dessorção por eletrospray (ESI-MS). O espectrômetro de massas de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier - FT-ICR MS (model 7-T LTQ FT Ultra, ThermoScientific, Bremen, Germany) foi ajustado para operar no modo positivo de íons e na gama de m/z de 100 – 1000. As condições de fonte de ESI foram como se segue: pressão do gás de 0,3 psi, tensão capilar de 3,1 kV, e íons de transferência capilar de 270 °C. Os espectros de massa foram adquiridos somando 100 microscans e processadas utilizando o software Xcalibur 2,0 (ThermoScientific, Bremen, Germany).

Para a análise de RMN, a amostra do extrato aquoso foi solubilizada em DMSO-d₆ e as análises realizadas foram RMN de ¹H e ¹³C em espectrômetro Bruker® DPX-300, ajustado para operar a 300 MHz para RMN ¹H e 75 MHz para RMN ¹³C

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para as análises toxicológicas, o extrato fúngico foi fornecido via oral nas quantidades de 10mg/Kg p.c, 100mg/Kg p.c e 1000mg/Kg p.c.

Para realização do experimento *in vivo* foram utilizados 48 camundongos da linhagem Swiss recém-desmamados (15±5g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG). Os animais foram divididos em oito grupos experimentais contendo seis animais em cada grupo (n=6), mantidos em sala climatizada sob a temperatura constante de 22 ± 2°C; umidade relativa do ar de 50 ± 20%, com ciclo claro-escuro de 12 horas, durante o período de 14 dias. O regime alimentar e de água foi *ad libitum*, utilizando como dieta padrão a ração comercial Nuvilab. As três dosagens foram fornecidas via gavagem uma vez

ao dia durante os 14 dias experimentais. No 14º dia os animais dos grupos 5, 6, 7 e 8 receberam Doxorubicina (DXR-16 mg/kg p.c) via intraperitoneal e NaCl 0,9% (m/v). No 15º dia de experimento, foi realizada a eutanásia dos animais com a utilização de Cloridrato de Xilazina (0,05 mg a cada 100 g p.c) e Cloridrato de Ketamina 10% (0,1 mg a cada 100 g p.c) ambos da marca VETBRANDS.

Para o desempenho de crescimento e utilização de nutrientes dos camundongos alimentados com dieta comercial, foram pesados a cada dois dias. Estes parâmetros foram avaliados em termos de índice de eficiência alimentar (FER), taxa de eficiência proteica (PER), o ganho de massa corporal (BMG), taxa de crescimento específico (SGR), conversão alimentar (FCR), que foram calculados pelas seguintes formulações: FER = ganho de peso/ração consumida, PER = ganho de peso (g)/proteína consumida (g), BMG (%) = [(massa corpórea final (g) – massa corpórea inicial (g))/massa corpórea inicial (g)] X 100, SGR (% por dia) = [(ln massa corpórea final (g) – ln massa corpórea inicial (g))/Números de dias tratamento] X100 (KUMAR, 2010; KALRA et al., 1998). Desse delineamento foram realizados os testes do cometa pela eletroforese do DNA de sangue periférico, teste de micronúcleo de medula óssea e estresse oxidativo.

Tabela 1- Delineamento Experimental

Grupo/Gavagem	Tratamento	Dose EAS
G1*/água	NaCl	-
G2*/EAS**	NaCl 0,9%***	10 mg/Kg p.c
G3*/EAS	NaCl 0,9%	100 mg/Kg p.c
G4*/EAS	NaCl 0,9%	1000 mg/Kg p.c
G5*/água	DXR	-
G6*/EAS	DXR****	10 mg/Kg p.c
G7*/EAS	DXR	100 mg/Kg p.c
G8*/EAS	DXR	1000 mg/Kg p.c

*n=6;

**EAS= extrato aquoso de *S. sclerotiorum*;

***NaCl 0,9% (m/v) = dose equivalente (10 mL/Kg p.c) ao peso do animal (veículo);

****DXR = doxorubicina (16 mg/Kg p.c) agente intercalante de DNA e indutor de lesões pré-neoplásicas em células da medula óssea.

Fonte: Do Autor.

5.4 TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA E TESTE DO COMETA

O teste do micronúcleo (MN) em medula óssea e cometa de sangue foram realizadas no Laboratório de Avaliação Nutricional e Toxicológica *in vivo* (LANTIN) da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

A identificação do micronúcleo seguiu o método proposto por VENÂNCIO et al., 2012, seguindo MACGREGOR et al., 1987, que consiste na análise de 2000 células por animal em microscópio (NIKON ECLIPSE 50i), com aumento de 1.000X. Para essa finalidade, as células de medula óssea foram coletas dos fêmures em soro fetal bovino (3mL), centrifugadas por 5 minutos a 106,21 g, descartado o sobrenadante e realizado os esfregaços em lâminas previamente codificadas. As células foram coradas após 24 horas do preparo das lâminas com corante Leishman (MERK) para diferenciar o eritrócito policromático (PCE) do eritrócito normocromático (NCE).

O ensaio de cometa de sangue periférico foi executado, como descrito em TRIVEDI e JENA, 2012; AZEVEDO et al., 2007, com algumas modificações. Para este procedimento, 7 μ L de sangue foram misturados com 73 μ L de agarose de ponto baixo de fusão (0,5% m/v) e dispostos em camadas sobre a superfície da lâmina (pré-revestidas com 1% de agarose de ponto normal de fusão), para formar um microgel e deixada a repousar a 4 °C durante 20 minutos. As lâminas foram então imersas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10,0), 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) a 4 °C durante 24 h. Após 24 h, as lâminas foram colocadas num tanque horizontal de eletroforese e o DNA foi deixado a descansar durante 20 minutos em solução alcalina contendo 300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA (pH >= 13,0). A eletroforese foi conduzida a 0,7 V/cm, 300 mA, 80 W, durante 20 minutos numa unidade de eletroforese horizontal (LOCCUS BIOTECNOLOGIA/LPS-300V, tensão máxima de 300v, corrente máxima de 500mA, tempo máximo 999min). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas por 5 min, três vezes em tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) e coradas com Gel Red (1:10.000 diluições), para análise de fluorescência. O DNA fluorescente marcado foi visualizado usando microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i com uma ampliação de 400x, com filtro verde. Os parâmetros para a análise de dano de DNA incluem: *tail moment* (TM), intensidade da cauda (TI) e conteúdo de DNA na cauda do cometa (% de DNA in tail). Cinquenta células foram aleatoriamente contadas a partir de cada lâmina e um total de cem células foram contadas em cada animal e as imagens

resultantes foram capturadas em um computador e processadas com software de análise de imagem (TriTek CometScore™ freeware v1.5).

5.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Para a análise de estresse oxidativo, foram determinados os níveis de MDA e GSH. Para essa finalidade, o fígado foi removido, congelado em nitrogênio líquido, posteriormente homogeneizado e centrifugado, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação do teor de peroxidação lipídica, GSH, e teor de proteína. As amostras de fígado (1 g) foram misturadas com 10 ml de KCl 1,15% (m/v), centrifugadas durante 5 minutos a 424,84 g. Assim, 500 µL desta, foi misturada com 1 mL TCA-TBA-HCl aquoso (TCA 15% v/v, TBA 3,7 g/L; HCL 0,25 mol/L), foi aquecida num banho de água e fervido durante 15 minutos. Após arrefecimento em gelo, e centrifugação (1.301,07 g, 15 min), foi analisada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000UV), a absorvância de 535 nm, com a utilização de um coeficiente de absorção molar de 22000 M⁻¹cm⁻¹ para MDA e expressa em nmol mg de proteína⁻¹ (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

Para determinação de glutatona reduzida, seguiu-se o método de SEDLAK; LINDSAY, 1968, utilizando para a curva padrão a cisteína (2mmol/L). Na primeira etapa, adicionou-se 0,6 mL do homogenato hepático em 1,4 mL de água destilada e 0,1mL de solução de TCA 50%. Em seguida, os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto e centrifugados a 955,89 g por 10 minutos. Na segunda etapa, foram adicionados 2,0 mL de solução tampão Tris e 0,1 mL de solução de 5',5' ditio-bis (2 ácido nitrobenzóico) (3,3-6) ou DTNB a 0,5 mL do sobrenadante da etapa anterior. Após 1 minuto de agitação em vórtex, as amostras ficaram em repouso por 15 minutos, quando seguiram para análise em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000UV) com leitura em triplicata a 412 nm. Para determinação de GSH foi realizado o cálculo da concentração de GSH = K médio x absorvância da amostra x fator de diluição. As medidas de Glutatona Reduzida foram expressas em mg/g de proteína. O conteúdo de proteína foi quantificado usando Bradford (BRADFORD, 1976).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O peso corpóreo, ganho de peso, consumo de ração dos animais, estresse oxidativo foram analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey (JOHNSON e WICHERN, 1992). Para o teste de micronúcleo foi utilizada a análise de Qui-quadrado apresentada em AZEVEDO et al., 2010 e DRAGANO et al., 2010. No teste do cometa foi utilizado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, conforme sugerido por ANDERSON et al., 1998. Para isso foram utilizadas as medianas e medidas de semi-amplitude total. Para todos os testes foi considerado estatisticamente significativo os resultados com p valor igual ou menor a 0,05.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a obtenção das estruturas de resistência, os escleródios foram isolados de segmentos de cultura pura de *S. sclerotiorum*, assegurando-se que os extratos produzidos eram livres de contaminação com outros fungos e de defensivos agrícolas. Quanto ao rendimento dos extratos, constatou-se que 60g de escleródios produziram 6,075 g de extrato aquoso liofilizado, correspondendo a 10% de rendimento.

6.1 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE *S. SCLEROTIUM* POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O estudo dos íons moleculares indicou a presença de monossacarídeo e dissacarídeo (Figura 16), sendo verificados os íons de m/z 205,07; 365,11 e 381,08. Evidencia-se que os monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos correspondem a cerca de 80% a 90% da composição química da parede celular dos fungos, sendo os outros componentes proteínas, lipídios, polifosfatos e íons inorgânicos que constituem a matriz de sustentação da parede celular (CABIB et al., 2001; LIPKE e OVALLE, 1998; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; GORIN e BARRETO-BERGTER, 1983).

No modo de ionização por ESI positivo, o íon mais abundante no espectro de massas foi com m/z 365,11 $[M + Na]^+$, possivelmente correspondente a trealose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), um dissacarídeo não redutor de glicose, composto por duas moléculas de glicose unidas por ligações α - α -1,1-glicosídicas, presente em bactérias, fungos, plantas e insetos (LUO; LI; WANG, 2008; DONG et al., 2007). Além do íon m/z 365,11, o espectro mostrou que o íon 381,08 $[M + K]^+$ também pode ser atribuído a trealose, assim como observado por BRIQUE et al., 2010, na purificação e caracterização estrutural de oligossacarídeos derivados de trealose em *Sinorhizobium meliloti* através da ESI-MS. A trealose pode ser hidrolisada pela enzima trealase, originando duas moléculas de glicose por uma de trealose (PATEL e DAVIES, 2010; STAMBUK et al., 1993; THEVELEIN, 1984). Em fungos filamentosos como *S. sclerotiorum*, a trealose está relacionada a várias condições fisiológicas tais como: períodos de crescimento reduzido, período de jejum durante o estresse oxidativo, escassez nutricional,

presença de metanol, pois serve como carboidrato reserva durante períodos sem proliferação (LUO; LI; WANG, 2008).

O íon observado de m/z 205,07 $[M+Na]^+$, possivelmente correspondente à fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$ pode ser atribuída ao manitol, um poliol monossacarídeo encontrado em leveduras e fungos. O manitol é um predominantemente um composto de carbono existente nos conídios de fungos filamentosos, onde protege as células do calor, do estresse osmótico e de danos oxidativos (RUIJTER et al., 2003).

Figura 16 - Espectros obtidos por meio da análise por ESI(+)-MS (LTQ FT) dos compostos provenientes do extrato aquoso *S. sclerotiorum*. Faixa de aquisição entre m/z 100-1000 (destacando os íons m/z 205,07; 365,11 e 381,08).

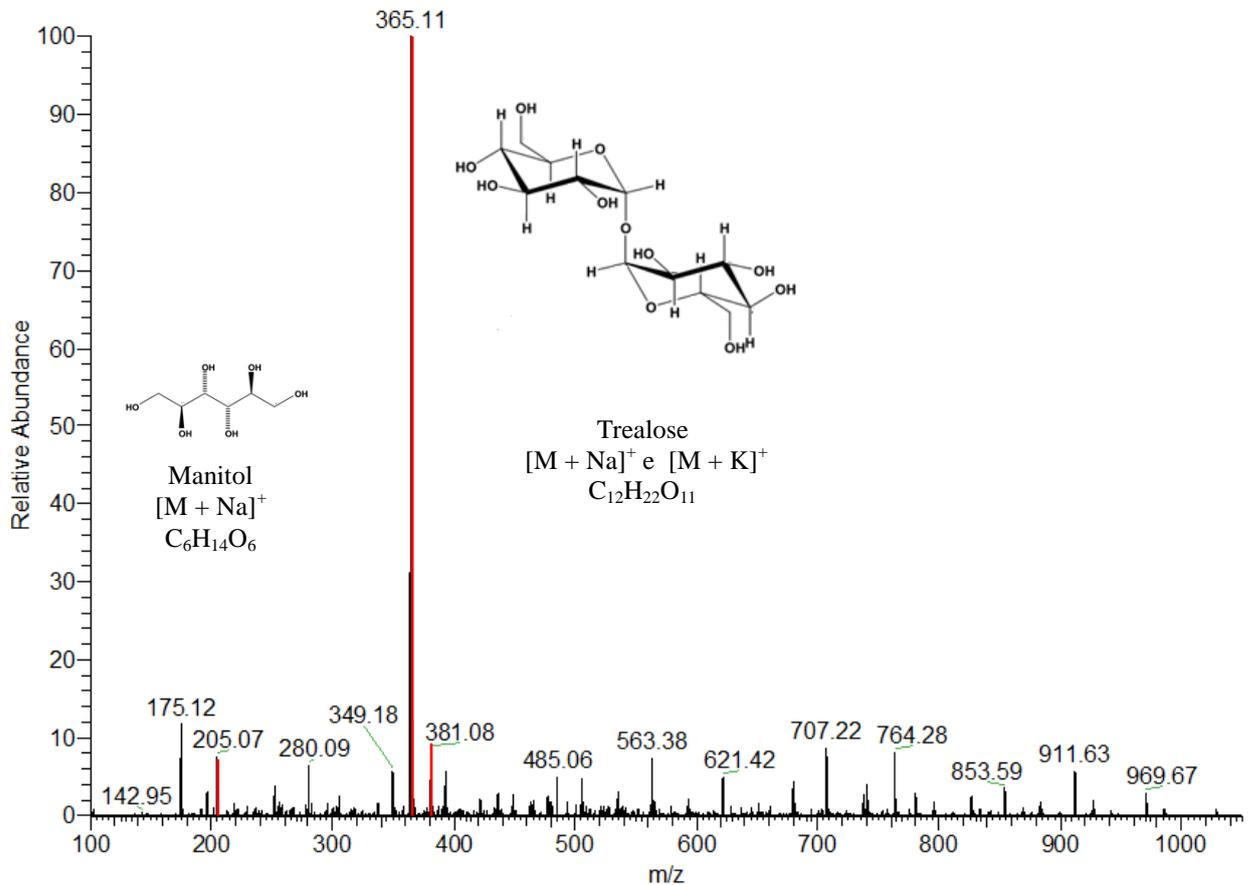


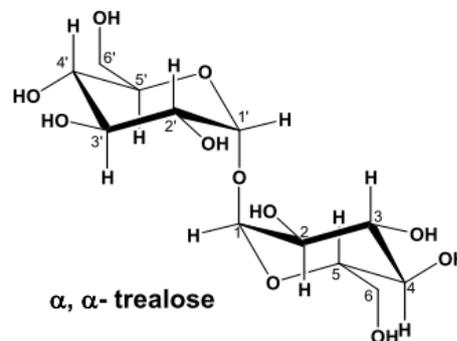
Figura obtida utilizando o software Xcalibur 2,0 (ThermoScientific, Bremen, Germany).
Fonte: Do Autor

6.2 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE *S. SCLEROTIUM* POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O extrato aquoso de *Sclerotinia sclerotiorum* foi analisado por RMN de ^1H e ^{13}C . A análise dos resultados por RMN sugerem a presença da trealose e do manitol no extrato fúngico.

6.2.1 Trealose

Figura 17 - Representação estrutural da α, α - trealose



Fonte: HAINES, 2003.

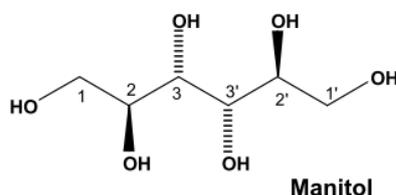
Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 19) foi observada a presença de sinais na região de açúcares e um dubleto em δ 4,87 (J = 3,5 Hz) característico de hidrogênio anomérico, possivelmente correspondente à trealose.

No experimento de RMN ^1H (Figura 20) foi observada a sobreposição de sinais que se desdobraram em um multipeto entre δ 3,59 e 3,53 correspondente aos H-2 e H-2', H-3 e H-3', multipeto entre δ 3,48 – 3,45 (H-4 e H-4') e outra sobreposição de sinais em multipeto entre δ 3,66 – 3,62 correspondente aos H-5 e H-5', H-6 e H-6' (Tabela 2).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21), foram observados sinais dos seis átomos de carbonos, que somados aos de hidrogênio sugerem a presença da trealose. Observou-se sinais característicos do C-1 e C-1' (δ 93,52), do C-2 e C-2' (δ 71,72), C-3 e C-3' (δ 73,23), C-4 e C-4' (δ 70,51), C-5 e C-5' (δ 72,88) e C-6 e C-6' (δ 61,15), conforme a tabela 2.

6.2.2 Manitol

Figura 18 - Representação estrutural do manitol



Fonte: COLLINS E FERRIER, 1995.

O espectro de RMN ^1H (Figura 19) apresentou sinais referentes a oito hidrogênios, um duplo dubleto em δ 3,23 ($J = 9,5; 3,5$ Hz) correspondente ao H-1 e H-1', um multiplete entre δ 3,59 e 3,53 correspondente aos H-2 e H-2', H-3 e H-3' que se apresentam em sobreposição com os mesmos hidrogênios da trealose (Figura 20)

Na análise do espectro de ^{13}C (Figura 21), observou-se os sinais dos três carbonos em δ 72,0 (C-1 e C-1'), δ 70,08 (C-2 e C-2') e δ 64,27 (C-3 e C-3'), conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para Trealose e Manitol presentes no extrato aquoso de *S. sclerotiorum* (^1H - 300 MHz; ^{13}C - 75 MHz, DMSO, δ em ppm, J=Hz, M= multiplicidade).

Trealose						Manitol				
	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)	n°H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)	n°H	$\delta^{13}\text{C}$
1 e 1'	4,87	d	3,5	2H	93,52	3,23	dd	9,5; 3,5	4H	72,0
2 e 2'	3,59 – 3,53	m	-	2H	71,72	3,59-3,53	m	-	2H	70,08
3 e 3'	3,59 – 3,53	m	-	2H	73,23	3,59- 3,53	m	-	2H	64,27
4 e 4'	3,48 – 3,45	m	-	2H	70,51					
5 e 5'	3,66 – 3,62	m	-	2H	72,88					
6 e 6'	3,66 – 3,62	m	-	4H	61,15					

Fonte: Do Autor

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H da amostra do extrato aquoso *S.s* – ACMR (300 MHz, DMSO d_6) ampliado de 3,0 – 5,0 ppm.

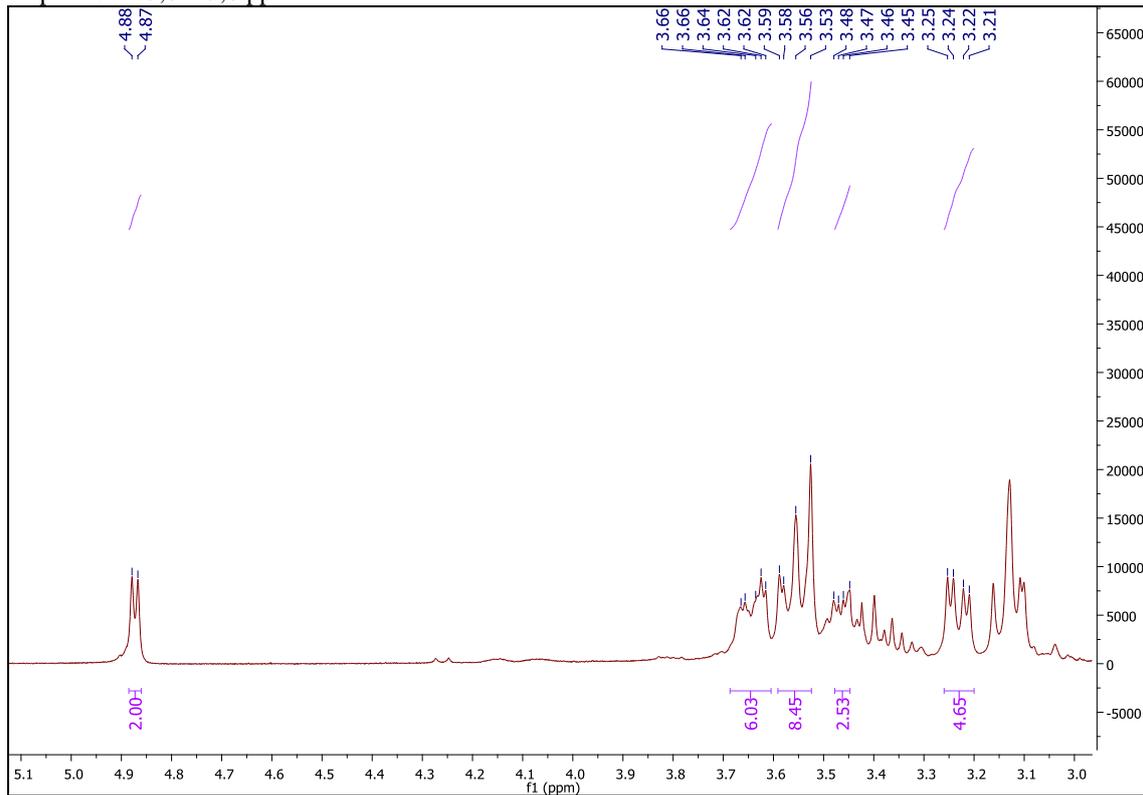


Figura obtida a partir do programa MestReNova.

Fonte: Do Autor

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H da amostra do extrato aquoso *S.s* – ACMR (300 MHz, DMSO d_6) ampliado de 3,2 – 3,7 ppm.

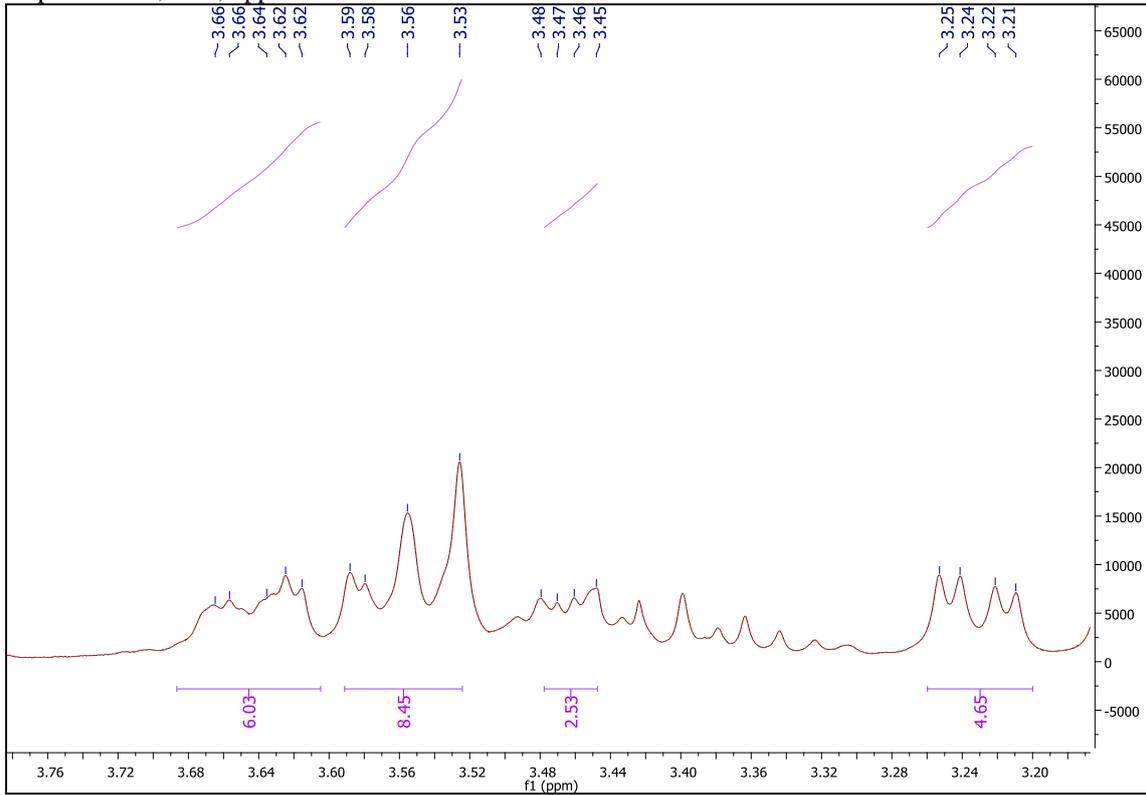


Figura obtida a partir do programa MestReNova.

Fonte: Do Autor

Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da amostra do extrato aquoso *S.s* – ACMR (75 MHz, DMSO d_6) ampliado de 59 – 94 ppm.

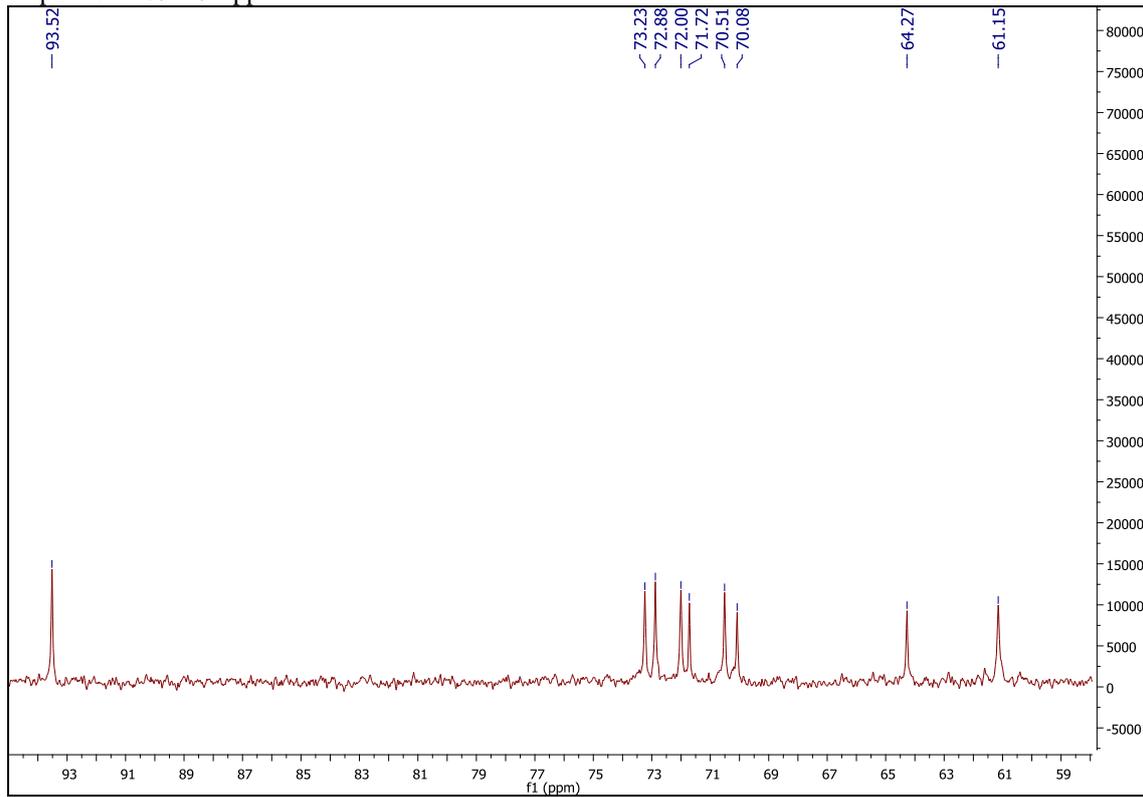


Figura obtida a partir do programa MestReNova.

Fonte: Do Autor

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do estudo toxicológico da *S. sclerotiorum in vivo*, utilizou-se as formas de escleródios, as quais são as comumente encontradas nos grãos que chegam ao consumidor.

Quanto aos resultados *in vivo*, a Tabela 3 apresenta o perfil de variação do peso corpóreo médio dos animais que foram utilizados na avaliação da mutagenicidade do extrato aquoso de *S. sclerotiorum*. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os pesos dos animais do grupo controle, que recebeu somente ração comercial e água filtrada e dos que receberam extrato fúngico nas três concentrações testadas (10, 100 e 1000 mg/Kg p.c).

As variáveis monitoradas (ganho de peso, consumo de ração, consumo de água, FER, PER, BMG, SGR e FCR) durante todo período experimental servem como um sensível indicador do estado geral do animal durante a sua vida (APPENZELLER et al., 2008). Sendo assim, os resultados das variáveis monitoradas neste delineamento experimental, indicam que o extrato aquoso de *S.sclerotiorum* em diferentes concentrações, não causou alterações nutricionais. Este aspecto é de fundamental relevância, uma vez que alterações metabólicas podem influir na avaliação de agentes mutagênicos e/ou antimutagênicos (RABELLO-GAY et al., 1985).

Tabela 3 - Média (X) e desvio padrão (DP) dos parâmetros da evolução nutricional dos animais durante o período experimental.

Tratamento	Ganho de* peso (g)		Consumo* ração (g)		Consumo* água (mL)		FER*		FCR*		PER*		BMG*		SGR*	
	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP
G1/NaCl -controle negativo	24,70	5,17	6,00	3,31	7,00	4,68	0,27	0,06	3,80	0,89	1,25	0,26	155,01	40,51	6,17	1,08
G2/ NaCl + EAS 10 mg/Kg p.c	25,31	3,38	6,51	3,30	7,55	4,15	0,26	0,03	3,91	0,49	1,18	0,16	168,36	37,65	6,53	0,92
G3/ NaCl + EAS 100 mg/Kg p.c	26,52	4,75	6,07	3,63	8,32	1,62	0,29	0,05	3,52	0,61	1,32	0,24	180,17	49,18	6,79	1,13
G4/ NaCl + EAS 1000 mg/Kg p.c	25,27	4,75	6,81	3,74	10,88	1,94	0,20	0,05	5,12	1,05	0,92	0,21	142,43	25,59	5,87	0,69
G5/DXR-controle positivo	22,35	1,81	6,29	3,34	6,75	3,43	0,24	0,02	4,24	0,33	1,08	0,09	120,87	8,61	5,28	0,25
G6/DXR + EAS 10 mg/Kg p.c	22,05	1,59	7,44	2,66	7,83	1,54	0,20	0,01	5,08	0,37	0,90	0,06	128,88	18,90	5,50	0,54
G7/DXR + EAS 100 mg/Kg p.c	26,37	3,21	5,72	3,26	7,39	2,04	0,31	0,04	3,30	0,42	1,40	0,17	152,62	19,53	6,16	0,50
G8/DXR + EAS1000 mg/Kg p.c	21,42	4,77	8,65	4,48	12,25	1,84	0,19	0,03	5,37	0,83	0,86	0,12	129,96	26,98	5,51	0,76

*Valores médios das variáveis monitoradas seguido do desvio padrão amostral das mesmas ao longo do período experimental.

DXR: Doxorrubicina 16 mg kg⁻¹ p.c.; NaCl: 0.9% 10 mL kg⁻¹ p.c (veículo).

FER = índice de eficiência alimentar; PER = taxa de eficiência proteica; BMG = ganho de massa corporal; SGR = taxa de crescimento específico; FCR = conversão alimentar.

Conclusões: G2, G3 e G4 = G1 (controle negativo); G6, G7 e G8 = G5 (controle positivo); p < 0.05

EAS= extrato aquoso de *S. sclerotiorum*

Fonte: Do Autor

6.4 TESTE DO MN DE MEDULA ÓSSEA E TESTE DO COMETA

A relevância deste ensaio *in vivo*, apresentada na Tabela 4, foi demonstrada pela resposta do grupo positivo/DXR, o qual exibiu aumentos significativos na frequência de MNPCE (1,23; 1,32; 1,38 % MN) quando comparada ao grupo de controle negativo/NaCl (0,56; 0,90; 1,01 % MN).

Para a análise do efeito lesivo, foram comparados os grupos (G2, G3, G4) que receberam diferentes concentrações do extrato + NaCl (10, 100 e 1000 mg/Kg p.c) com o grupo controle negativo (G1). Observou-se que a exposição dos animais às diferentes concentrações do extrato induziu o aumento na frequência de MNPCE, correspondente a 243,48; 391,30; 439,13 % de aumento de MNPCE, respectivamente. Esses valores evidenciam a magnitude do número de MNPCEs gerados de modo superior ao controle negativo (G1). Assim conclui-se que os três níveis do extrato aquoso de *S. sclerotiorum* apresentaram efeito mutagênico sobre a medula óssea dos camundongos.

Considerando-se os grupos que receberam extrato fúngico + DXR, observou-se aumento na frequência de MNPCE nas três concentrações, quando comparado ao controle positivo (G5), evidenciando um efeito sinérgico do extrato aquoso de *S. sclerotiorum* frente DXR.

Sendo assim, este resultado demonstra que o extrato fúngico foi capaz de potencializar os efeitos genotóxicos e citotóxicos do agente intercalante e clastogênico (DXR). Entre esses possíveis efeitos potencializados, podemos considerar a inibição da enzima topoisomerase II, ligases e helicases, formação de adutos com DNA e formação de radicais livres como: o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (DESAI et. al., 2012; KIRSCH-VOLDERS et. al, 2011; VENKATESH et al., 2007).

Como o extrato aquoso do fungo é considerado uma matriz complexa, os seus compostos podem ter exercido efeito tóxico direto ou conversão metabólica em outros compostos citotóxicos (pró-oxidantes, agentes mutagênicos, inibidores de enzimas-chave). A ingestão do extrato fúngico quando associada a produtos químicos de dieta diferenciada, o uso de medicamentos e a presença de enzimas pode causar a interferência em vias metabólicas endógenas e induzir a atividade cancerígena (HODEK et al., 2009).

Assim, a composição química do extrato fúngico não pode ser negligenciada, uma vez que, é provável que existam muitas interações sinérgicas entre seus componentes

biologicamente ativos. Em altas concentrações são capazes de exibir um efeito aditivo com a DXR, o mecanismo exato de que merece uma investigação mais aprofundada e detalhada.

Tabela 4 - Efeitos do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em frequências de PCE.

Grupos/Tratamento	Nº	Cells	NCE	PCE	PCE/NCE	MNPCE	%MN	% Aumento de MNPCE
G1/ NaCl-Controle Negativo	6	12000	2459	3542	1,44	46	2,3*	-
G2/ NaCl + EAS 10 mg/Kg p.c	6	12000	1953	4047	2,07	180	9,0*	391,30**
G3/ NaCl + EAS 100 mg/Kg p.c	6	12000	2172	3257	1,49	202	10,1*	439,13**
G4/ NaCl + EAS 1000 mg/Kg p.c	6	12000	2168	3822	1,76	112	5,6*	243,48**
G5/DXR-Controle Positivo	6	12000	1825	4175	2,28	117	5,8*	-
G6/ DRX + EAS 10 mg/Kg p.c	6	12000	2032	3958	1,94	264	13,2*	225,64***
G7/DRX + EAS 100 mg/Kg p.c	6	12000	1952	4048	2,07	277	13,8*	236,75***
G8/ DRX + EAS 1000 mg/Kg p.c	5	10000	2054	2946	1,43	246	12,3*	210,26***

DXR: doxorubicina 16 mg kg⁻¹ p.c.; NaCl: 0.9% 10 mL kg⁻¹ p.c (veículo); NCE: eritrócito normocromático; PCE: eritrócito policromático;

*Conclusões: G2, G3 e G4 > G1 (controle negativo); G6, G7 e G8 > G5 (controle positivo); p < 0.05 (X²).

MN: células micronucleadas. 2,000 células analisadas/animal.

** % aumento de MNPCE com relação às lesões espontâneas G1(controle negativo)

*** % aumento de MNPCE com relação às lesões induzidas G5 (controle positivo)

EAS= extrato aquoso de *S. sclerotiorum*.

Fonte: Do Autor.

Os resultados da avaliação dos cometas pelo *software* CometScore™ estão apresentados na Tabela 5. Os resultados mostraram diferenças entre o controle negativo (G1) e positivo (G5), evidenciando a sensibilidade do método para detectar lesões genômicas.

Para a análise do efeito lesivo comparou-se o resultado do grupo negativo (G1-NaCl) com as três concentrações testadas (10, 100 e 1000 mg/Kg p.c). Assim, não houve diferença entre os tratamentos e as lesões espontâneas, indicando que o extrato aquoso de *S. sclerotiorum* não apresentou efeito genotóxico, ou seja, não causou lesões no DNA, não sendo mutagênico por esse teste.

Para avaliação do efeito protetor/potencializador, foram comparados os grupos tratados com as três concentrações de extrato aquoso de *S. sclerotiorum* mais DXR (G6, G7 e G8) com o grupo controle positivo (G5-DXR). Os resultados mostram que eles não foram diferentes, ou seja, os extratos não exerceram influência sobre as atividades da DXR. Assim, os extratos não foram capazes de potencializar, conforme observado no teste do micronúcleo, nem de proteger de suas atividades genotóxicas.

As diferenças observadas entre os resultados do teste do micronúcleo e cometa podem ser relativas à utilização de diferentes tipos celulares (eritrócitos para micronúcleo e linfócitos para o teste do cometa), além das especificidades desses testes. Assim, os danos observados são aqueles realmente produzidos pelo agente em questão, no caso a DXR.

Tomados os resultados desses dois testes, poderíamos sugerir que esses extratos não causaram quebras no DNA, como sugerido pelo teste do cometa, porém podem ter exercido seus efeitos lesivos pelos outros mecanismos previamente citados por KIRSCH-VOLDER et al., 2011. Assim, os mecanismos da DXR potencializados pelos extratos fúngicos e detectados no teste do micronúcleo podem estar relacionados aos eventos mutacionais por rearranjos cromossômicos como um potente cancerígeno, mas não associados à fragmentação de DNA, a qual não foi detectada pelo teste do cometa (BATTY et al., 2012; DESAI et. al, 2012; VENKATESH et al., 2007).

Tabela 5 - Resultados do ensaio cometa alcalino de ratos tratados por 14 dias com extrato aquosos de *S. sclerotiorum* e doxorubicina (DXR).

GRUPOS/TRATAMENTO	Tail moment		% DNA in tail		Tail intensity	
	MD	SA	MD	SA	MD	SA
G1/NaCl - controle negativo	5,05*	4,00	11,71*	4,50	38.545,83*	17.484,50
G2/ NaCl + EAS 10 mg/Kg p.c	5,82*	1,00	10,89*	3,50	42.778,00*	25.032,50
G3/ NaCl + EAS 100 mg/Kg p.c	5,80*	1,00	11,28*	2,00	41.240,00*	5.230,50
G4/ NaCl + EAS 1000 mg/Kg p.c	5,73*	4,00	11,81*	1,00	43.924,00*	10.211,50
G5/DXR - controle positivo	17,16**	1,00	22,31**	2,00	61.264,00**	13.962,50
G6/DXR + EAS 10 mg/Kg p.c	17,97**	2,50	25,32**	3,50	68.457,00**	10.742,00
G7/DXR + EAS 100 mg/Kg p.c	18,37**	3,50	23,37**	2,50	63.689,75**	7.773,50
G8/DXR + EAS 1000 mg/Kg p.c	15,35**	1,50	20,56**	1,50	60.177,00**	4.331,50

DXR: doxorubicina 16 mg kg⁻¹ p.c.; NaCl: 0.9% 10 mL kg⁻¹ p.c (veículo).

MD = mediana; SA = semiamplitude; *tail moment* = tail moment; % DNA in tail = conteúdo de DNA na cauda do cometa; Tail intensity = intensidade da cauda.

*G2, G3 e G4 = G1 (controle negativo); **G6, G7 e G8 = G5 (controle positivo); p < 0.05.

EAS= extrato aquoso de *S. sclerotiorum*

Fonte: Do Autor.

6.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Devido à relevância das respostas oxidativas, para o estudo toxicológico/estresse oxidativo do extrato fúngico o fígado foi utilizado por ser órgão central no processo metabólico do organismo.

As análises de estresse oxidativo dos fígados obtidos do delineamento experimental são apresentadas na Tabela 6. Nessa tabela pode-se observar que não houve diferença entre os grupos, ou seja, os resultados nos mostram que a DXR não elevou os níveis de MDA e glutaciona reduzida, não interferindo nos processos oxidativos dos animais testados. Assim o resultado médio dos grupos experimentais foi de $2,57 \pm 0,77$ nmol MDA.mg⁻¹ e de $0,036 \pm 0,02$ nmol GSH.mg⁻¹. Entretanto, a DXR mostrou-se efetiva ao induzir danos nos animais pelos testes do micronúcleo e cometa.

A análise da glutaciona reduzida tem importância pelo fato de ser um dos índices da capacidade total antioxidante do corpo após um estresse oxidativo, por ser um antioxidante multifuncional (SUN et al., 2010).

Considerando-se esses aspectos, podemos discutir que a similaridade entre os resultados dos grupos com e sem DXR para os parâmetros GSH e MDA poderia ser relativo à rapidez da resposta orgânica e adaptação metabólica dos animais, os quais podem ter ocorrido no intervalo inferior a 24 horas, período em que ocorreu a aplicação da droga e coleta dos

fígados. Esse reparo foi observado por ZHIJIAN et al., 2010, que verificou diminuição dos efeitos lesivos da DXR, já no DNA, no período relativo a 6 horas após a exposição a essa droga. Nesse curto intervalo seriam gerados os compostos reativos e, conseqüentemente, disparados os processos (enzimáticos e químicos –vitaminas e elementos funcionais) para equilibrar os níveis de radicais livres, de substâncias reativas (MULLER e BRUCHELT, 1998), assim como os elementos produzidos durante o ataque oxidativo, entre elas poderíamos citar as estruturas reativas ao TBARS (MDA) e os níveis enzimáticos e seus cofatores (GSH) (SIES, 1993; SINGH et. al., 1988).

Tabela 6 - Efeitos do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em níveis de GSH e MDA.

GRUPOS/TRATAMENTO	GSH (nmol.mg ⁻¹ proteína)	MDA (nmol.mg ⁻¹ proteína)
G1/ NaCl - Controle Negativo	0,027±0,013	2,06±1,06
G2/ NaCl + EAS 10mg/Kg p.c	0,021±0,013	1,79±0,98
G3/ NaCl + EAS 100mg/Kg p.c	0,074±0,034	2,45±0,75
G4/ NaCl + EAS 1000mg/Kg p.c	0,031±0,010	2,62±0,85
G5/DXR - Controle Positivo	0,030±0,004	2,74±1,15
G6/DXR + EAS 10mg/Kg p.c	0,043±0,025	2,39±0,93
G7/DXR + EAS 10mg/Kg p.c	0,033±0,019	2,52±1,28
G8/DXR + EAS 10mg/Kg p.c	0,028±0,009	2,86±1,83

Média ± Desvio padrão amostral; DXR: doxorubicina 16 mg kg⁻¹ p.c.; NaCl: 0.9% 10 mL kg⁻¹ p.c (veículo); GSH: Glutathione Reduzida; MDA: malondialdeído.

Conclusão: G2, G3 e G4 = G1 (controle negativo); G6, G7 e G8 = G5 (controle positivo); p < 0.05

EAS= extrato aquoso de *S. sclerotiorum*.

Fonte: Do Autor.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados de espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear verificou-se monossacarídeo, dissacarídeo como parte da composição química do fungo *S. sclerotiorum*, sugerindo a presença da trealose e do manitol.

Foi observado pelo teste do micronúcleo que o extrato foi capaz de potencializar os efeitos genotóxicos e citotóxicos do agente intercalante e clastogênico (DXR). Entre esses possíveis efeitos potencializados, podemos considerar a inibição da enzima topoisomerase II, ligases e helicases, formação de adutos com DNA e formação de radicais livres como: o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Ao contrário, pelo teste do cometa, os extratos não exerceram efeito lesivo, nem potencializador/protetor das atividades da DXR.

Tomados os resultados dos testes de MN e cometa, poderíamos sugerir que as doses experimentais não causaram quebras no DNA, como sugerido pelo teste do cometa, porém podem ter exercido os efeitos lesivos observados pelo MNPCE por outros mecanismos, como alterações nas fibras do fuso e rearranjos cromossômicos, mas não associados à fragmentação de DNA.

Quanto ao resultado do estresse oxidativo, a similaridade entre os resultados dos grupos com e sem DXR para os parâmetros MDA e GSH poderia ser relativo à rapidez da resposta orgânica e adaptação metabólica dos animais.

Desta forma, sugere-se que outros estudos químicos devem ser realizados de modo a obter a caracterização total da composição química deste fungo, bem como outras análises toxicológicas com os referidos compostos purificados, permitindo melhor entendimento de atuação deste fungo que é tão disponível nos alimentos que chegam ao consumidor.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Testes toxicológicos para produtos químicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> . Acesso em 9 de set. 2011.
- ALFIERI, M. A; LEUNG, F.Y.; GRACE, D.M. Selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition. **Biological Trace element Research**, v. 61, n. 1, p. 33 - 39, 1998
- AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1993.
- ANDERSON, D. et al. Flavonoids modulate Comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. **Mutation Research**, v.402, p.269-277, 1998
- APPENZELLER, L. M. et al. Subchronic feeding study of herbicide-tolerant soybean DP-356043-5 in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 2201 - 2213, 2008.
- ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FRANCESCHI, G. Structure and physiochemical properties of adriamycin (doxorubicin). **Int. Symp. Adriamycin**, Springer, New York, p. 9-22, 1972.
- AZEVEDO L. et al. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melano-gen*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. **Food Chem Toxicol**, v.45, p.852-858, 2007.
- AZEVEDO L. et al. In Vivo Antimutagenic Properties of Transgenic and Conventional Soybeans. **J Med. Food**, v.13, n.6, p.1-7, 2010.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesion as end-points in carcinogenicity testing. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 689-95, 1986.
- BATTY, N. et al. Doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine chemotherapy with interferon for advanced stage classic Hodgkin lymphoma: A 10-year follow-up study. **Leuk. Lymphoma** 53, 801-806, 2012.
- BIRT, D. F. Update on the effects of vitamins A, C and E and selenium on carcinogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 183, n. 3, p. 311-320, 1986.
- BOLTON, Melvin D; † THOMMA, Bart P. H. J and NELSON, Berlin D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: **biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen**. p. 1

– 16, USA, 2005.

BONORDEN, W. R.; PARIZA, M. W.; Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: KOTSONIS, F. N.; MACKEY, M.; HJELLE, J(eds.). **Nutritional Toxicology**. New York: Raven Press Ltd., 1994. p. 19-48.

BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2009. 399 p.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994.

BRIQUE, A. et al. Osmoregulated trehalose-derived oligosaccharides in *Sinorhizobium meliloti*. **FEBS Letters** 584 (2010) 3661–3666.

CABIB, E., et al. The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19679-19682, 2001.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**, v.51, p.15–25, 2013.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**. v. 204, p. 379-406, 1988.

CAVIN, C. et al. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1155-1163, 2002.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, London, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1994.

CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentiae**, Viçosa, v. 4, p. 69-133, 1964.

CHIANG, C.; KNIGHT, S.G. Metabolism of D-xylose by moulds. **Nature**, 188:79-81, 1960.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J.; Monosaccharides Their Chemistry and Their Roles in Natural Products, **John Wiley & Sons**: Chichester, 1995, p.33.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em setembro de 2011.

COSTA, J. L. da S. Situação do mofo branco no feijão de inverno. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia, GO. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, v. 2, p. 251-253. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 70) 1997.

CORMA, A., IBORRA S., VELTY, A., Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals, **Chem. Rev.** 107 (2007) 2411.

COTTON, P.; RASCALE, C. AND FEVRE, M. Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. **FEMS Microbiology Letters** v. 213, p. 239-244, 2002.

CUTTS, S. M et al. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. **IUBMB Life**, 57(2): 73-81, February 2005.

DAVIES, K.J.; DOROSHOW, J.H. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. **J. Bio. Chem.**, v. 261(7), p. 3060-7, 1986.

DESAI, V. G. et al. Development of doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in the B6C3F1 mouse model, **Toxicology and Applied Pharmacology** (2012), doi: 10.1016/j.taap.2012.10.025.

DONG, Y. et al. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells, **Biochem. Eng. J.**, 37, 2007, 226–230.

DRAGANO, N. R. et al. Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) Pulp Intake on the Modulation of Mutagenic/Antimutagenic Processes and Its Action on Oxidative Stress *in vivo*. **Plant Foods Hum Nutr**, v.65, p.319–325, 2010.

DURMAN, S.B.; MENENDEZ, A.B.; GODEAS, A.M.; Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 2180–2184, 2005.

DUTHIE, S.J. et al. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Cancer Research**, Baltimore, v.56, n.6, p.1291-1295, 1996.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <<http://www.embrapa.br>> Acesso 21 jan. 2010.

FAIRBAIN. D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v.339, p.37-59, 1995.

Farmacopéia brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FANG, Y. Z. et al. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res** 339:37-59.

FAVARON, F.; SELLA, L.; D'OVIDIO, R. Relationships Among Endo- Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein(PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. **The American Phytopathological Society**, v.17, n.12, p. 1402-1409, 2004.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, 1997, p.11-18

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

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E.T. G. Ácidos Orgânicos: dos primórdios da Química Experimental à sua presença em nosso cotidiano. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA, N.15, MAIO 2002.

FRAVEL, D. R. et al. Volatile Compounds Emitted by Sclerotia of *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Sclerotium rolfsii*. J. Agric. **Food Chem** 2002, 50, 3761.

FRISCHER H, AHMAD T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. **J Lab Clin Med** 1987; 109: 583-8.

GARCEZ, F. R. et al. Constituintes Químicos de Escleródios do Fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Universidade Federal de Mato Grosso, RESUMO: 28a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2005.

GIESE, E. C. Produção De Beta-Glucanases Por *Trichoderma Harzianum* Rifai Para Obtenção De Glucooligossacarídeos a Partir De Botriosferana. **Departamento De Engenharia e Tecnologia De Alimentos Instituto De Biociências, Letras e Ciências Exatas**, São José do Rio Pardo, p. 1 - 140, 2008.

GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças de Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 2005. v.2,p. 569-588

GONSEBATT, M. E. et al. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation**

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 674, p. 137–147, 2009.

GORIN, P.A.J., BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In **The Polysaccharides**, Aspinall, G. O., Academic Press, INC, 1983.

GRIGOLO, B et al. Copper/zinc superoxide dismutase expression by different human osteosarcoma cell lines. **Anticancer Research**, Athens, v.18, n.2A, p.1175-1180, 1998.

HAINES, A.H. Synthesis of L-trehalose and observations on isomer and by-product formation. **Carbohydr. Res.** 2003, 338, 813-818.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Biologically relevant metal ion-dependent OH[•] generation. An update. **FEBS Letters**. v. 307, p. 108 - 116. 1992.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol. Letters.**, v.90, p.183-88, 1997.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S., (Ed.), *Methods in Molecular Biology, DNA repair protocols: Eukaryotic Systems*. Totowa: **Humana Press**, pp. 203-212, 1999.

HAYASHI, M. et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**. v. 312, p.293-304, 1994.

HODEK, P. et al. Chemopreventive compounds—view from the other side. **Chem-Biol Interact**. doi:10.1016/j.cbi.2009.01.003, 2009.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. 3. ed. New Jersey : **Prentice-Hall**, 1992. 390p.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F.C. Podridão Branca da haste de soja: Manejo e Uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. Uberlândia: **Composer**, 2010.

KALRA, P. S. et al. The anti-gonadotropic effects of cytokines: The role of neuropeptides. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15: (5) 321-332, 1998.

KEATES, S. E. et al. 5-o-(α -D-galactopyranosyl)-D-glycero-pent-2-enono-1,4-lactone: Characterization in the oxalate-producing fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytochemistry** Vol. 49, No. 8, pp. 2397-2401, 1998.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**. 2000, 149, 43.

KERKSICK C. & WILLOUGHBY D. 2005. The antioxidant role of glutathione and n-acetylcysteine supplements and exercise induced oxidative stress. **J. Int. Soc. Sports Nutr.** 2(2):38-44.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, **Arch Toxicol** (2011) 85:873–899.

KLAUDE, M. et al. The Comet Assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v.363, p.89-96, 1996.

KOPJAR, N.; GARAJ-VRHOVAC V.; MILAS, I.; Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leucocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. **Teratog Carcinog Mutagen.** 2002; 22:13-30.

KUMAR: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th ed. (2010).

LEHMANN M.; FRANCOL.; VILAR KSP.; REGULY ML.; ANDRADE HHR (2003). doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** 539: 167-175

LEITE, R.M.V.B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em girassol e soja. **Comunicado tecnico** 76. ISSN 1517-1752. Embrapa Soja. Marco, 2005. Londrina, PR.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LUCCA FILHO, O. A. Importância Da Sanidade Na Produção De Sementes De Alta Qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 7, no 1, p. 113-124, 1985.

LUO, Y.; LI, W. M.; WANG, W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?, **Environ. Expe. Botany**, 63, 2008, 378-384.

MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**. v. 189, p. 103-12, 1987.

MACHADO, J. C. et al. Avaliação de tratamento de sementes de feijão com *Sclerotinia*

sclerotiorum. **Relatório técnico**, Lavras-MG, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall International, Inc. p. 774, 1997

MALUF, S.W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkline single-cell gel electrophoresis. **Clin Chim Acta**. 2004; 347(1-2):15-24.

MAPA, Manual de Análises Sanitária de Sementes, 2009.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.239, p.29-80, 1990

MCKELVEY, V.J.M. et al. The single cell gel electrophoresis assay (Comet Assay): an european review. **Mutation Research**, v.336, p.19-27. 1993.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination molonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**, v.86, p.271-278,1978.

MINOTTI G., et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev**.2004; 56:185–229.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2006; 98(4): 336-45.

MOURA, Amarildo Lemos Dias de. Efeito da Cafeína sobre a regulação da expressão gênica de Poligalacturonases em *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciências Biológicas**, Goiânia, p. 1 – 64, 2008.

MOOLENBEEK, C. e RUITENBERG, E.J. The ‘Swiss roll’: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. **Lab. Anim**. v.15, p. 57–59, 1981.

MULLER, D. N.; BRUCHELT, G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review), **Int. J. Mol. Med**. 1 (1998) 491–494.

MYERS, C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomiopathy. **Semin. Oncol.**, v. 25, p.10-4, 1998.

NASSER, L. C. B; NAPOLEÃO, R. e CARVAJAL, R. A. *Mofo branco – cuidado com a semente*. Ed.4. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, 1999.

NEERGAARD, P. (1979). Introduction to methods of seed-health testing. **Seed Sci Technol**, 7: 601-635.

ÓSTLING O, & JOHANSON KJ., 1984; **BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.** 123: 291-298 McGlynn AP, Wasson G, O'Connor J, McKerr G, McKelvey-Martin VJ, & Downes CS. 1999; **Cancer Research** 59(23):5912-6

PATEL, M. K. AND DAVIS, B. G. Flow chemistry kinetic studies reveal reaction conditions for ready access to unsymmetrical trehalose analogues. **Org. Biomol. Chem.**, 2010, 8, 4232–4235.

PENNINCKX, M. (1999). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Elsevier, Enzyme and Microbial Technology**, 26(9-10), pp 737-739.

PERES, E.; MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.

PITOT, H. C. et al. A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1491-1499, 1987.

PITOT, H. C. The terminal stage in carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 80, p. 599-607, 1989.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, p. 962-70, 1993.

PITSON, S.M.; SERVIOR, R.J & MCDUGALL, B.M. Noncellulolytic fungal β - glucanases: their physiology and regulation. **Enz Microb Technol** 15:178-190,1993.

PLUSHNER S. L. Valerian: *Valeriana officinalis*. **Am J Health-Syst Pharm** 2000; 57(4): 328-335.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, v.69, n.8, p. 875-880, Aug. 1979.

RABELLO-GAY, M.N. et al. The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutation research**, v. 158, p. 181 - 188, 1985.

RAMEL, C. General environmental modifiers of carcinogenesis. **Acta Pharmacological**

Toxicology, v. 5, n. 2, p. 181-196, 1984.

REGLERO, M. M. et al. Heavy metal exposure in large game from a lead minning área: Effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. **Enviromental Poluition**, v.1 57, p. 1388 - 1395, 2009.

RIBAS, Maurício Resta. BOLETIM TÉCNICO: Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) incidente na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.). **Instituto Federal Goiano**, Urataí 2010.

RIBEIRO L. R.; SALVADORI D. M.; MARQUES E. K. (org.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas, Ed. Ulbra, 2003. 355p.

ROLLINS, J.A. and DICKMAN, M.B. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 01, p. 75-81, January 2001.

ROY, P.; KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

RUEFF, J., et al. DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H₂O₂ and 60Co γ -radiation. **Mutat. Res.**, 289, 197–204, 1993.

RUIJTER, G. J. G. et al. Mannitol Is Required for Stress Tolerance in *Aspergillus niger* Conidiospores. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n.4, p.690-698, 2003.

RYDBERG B, JOHANSON K.J. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds): DNA repair mechanisms. New York: **Academic Press**, pp 465–468.

SALVADOR, Carlos Alberto. Análise da Conjuntura Agropecuária Safra 2010/2011-Feijão. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>, acesso em setembro de 2011.

SASAKI, Y. F. et al. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, v.388, p.33-44, 1997. p. 33-34.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v.24, p.192-205, 1968

SHAMBERGER, R.J. et al. Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 70, 1461-1463, 1973.

SPEIT, G. et al. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their

relevance for mutagenesis. **Toxicol. Letters.** v.88, p. 91-98, 1996.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry,** Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVERSTEIN, ROBERT M. (Robert Milton), 1916 - Identificação espectrométrica de compostos orgânicos/ ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, DAVID J. KIEMLE; 7ª Ed, LTC, 2007.

SIMEONI, R. B. et al. Angiogenesis without functional outcome after mononuclear stem cell transplant in doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy murine model. **The International Journal of Artificial Organs,** v. 31, p. 31-438, 2008.

SINGAL, P.K. et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Mol. Cell Biochem,** v. 207, p. 77-86, 2000.

SINGH, N.P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** v.175, p. 184-191, 1988.

SPALLAROSSA, P. et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. **J. of Mol. and Cel. Card.,** v. 37, p. 837-846, 2004.

SPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 378, p. 54 - 55, 2004.

STAMBUK, B. U. et al. A dependable method for the synthesis of [14C] trehalose. **Anal. Biochem.,** v. 212, p. 150-153, 1993

STEADMAN, J. R. White Mold- A serious yield limiting disease of bean. **Plant Disease,** St. Paul, v.67, p.346-350,1983.

SUN L. et al. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sciences** 86:39-44, 2010.

SWIFT, LP. et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer Res,** 66:4863-4871, 2006.

TANAKA A., ORITANI T., UEHARA F., SAITO A., KISHITA H., NÜZEKI Y., YOKOTA H., FUCHIGAMI K., Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoborneol, **Water Research** 30 (3) (1996) 759-761.

TAO, K. et al. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses,** v.71, p.730-736. 2008.

TERRADAS M, MARTÍN M, TUSELL L, GENESCA, A. (2010) Genetic activities in

micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutat Res** 705:60–67

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Rev.**, v. 48, p. 42-59, 1984.

THOMPSON M. L., MARRIOT R., DOWLE A. (2010) Biotransformation of β -mircene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants. *Applied Microbial and Cell Physiology* 85: 721-730.

TICE R. R. 1995. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In Phillipps DH, Venitt S (eds): **Environmental Mutagenesis**. Oxford: Bios Scientific Publishers, pp 315–339.

TOKARSKA-SCHALATTNER, M.; WALLIMANN T.; SCHLATTNER, U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. **C. R. Biologies**, v. 329, p. 657–668, 2006.

TOKESHI, Hasime. Manual de treinamento técnico em agricultura natural. Ed. especial. **Curso teórico e prático sobre Agricultura Natural**, Itaipava, 21 set. a 20 out. 2002. São Paulo: FMO, 2002.

TRIVEDI, P. P; JENA, G.B. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice. **Mutation Research** 744 (2012) 172– 183.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147 - 159, 1996.

UNIFESP. Universidade Federal de São Paulo - Disciplina de Neurologia Experimental. <http://www.unifesp.br/dneuro/nexp/riboflavina/d.htm> . Acesso em abril de 2011.

VANHAUAWAERT, A., VANPARYS, P and KIRSH-VALDERS, M. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**, v. 16, p. 39-50, 2001.

VENÂNCIO, V. P. et al. Conventional (MG-BR46 Conquista) and transgenic (BRS Valiosa RR) soybeans have no mutagenic effects and may protect against induced-DNA damage *in vivo*, 2012.

VENKATESH, P. et al. Modulation of Doxorubicin-Induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study, **Integrative Cancer Therapies** 6(1); 2007 pp. 42-53.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN M. E. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radicals Biology Medical**, v. 32, p. 577 - 583, 2002.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

ZAKRZEWSKI, S. F. **Principles of environmental toxicology**. 2 Ed. Oxford: American Chemical Society, p. 352, 1997.

ZHIJIAN, C. et al. He. Impact of 1.8-GHz radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by doxorubicin in human B-cell lymphoblastoid cells, **Mutation Research** 695, 16-21, 2010.