

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LAILA SANTOS VIEIRA GIANNINI

***Sclerotinia sclerotiorum* (MOFO BRANCO): AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
MUTAGÊNICAS *in vivo*.**

Alfenas/MG
2016

LAILA SANTOS VIEIRA GIANNINI

***Sclerotinia sclerotiorum* (MOFO BRANCO): AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
MUTAGÊNICAS *in vivo*.**

Dissertação sobre os resultados de pesquisa científica apresentados como requisito para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG.
Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientadora responsável: Luciana Azevedo.

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Giannini, Laila Santos Vieira

Sclerotinia sclerotiorum (mofo branco): avaliação das propriedades mutagênicas in vivo / Laila Santos Vieira Giannini. – Alfenas/MG, 2016.
62 f.

Orientadora: Luciana Azevedo.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Sclerotinia sclerotiorum. 2. Mutagênese. 3. Neoplasias. I. Azevedo,
Luciana. II. Título.

CDD-616.07


LAILA SANTOS VIEIRA GIANNINI

“*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (MOFO BRANCO): AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES MUTAGÊNICAS *IN VIVO*”.

A Banca Examinadora, abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Biociências
Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração:
Doenças Infecciosas e Parasitárias e Fisiopatologia.

Aprovado em: 30/11/2016

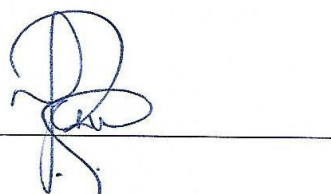
Profa. Dra. Luciana Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Maria Cristina Costa Resck
Instituição: Universidade José do Rosário Velano
UNIFENAS-

Assinatura: 

Dedico às pessoas mais importantes da
minha vida: Deus, meus pais, minha irmã,
meu marido e meus sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me sustentou, por seu amor e graça em minha vida, pela força e determinação que coloca em meu coração e por sua presença e amparo nos momentos difíceis.

Aos meus amados pais Beatriz e Vander, pelo incentivo, apoio, carinho, dedicação e suporte emocional. Pelo amor demonstrado de todas as formas possíveis, pelas orações e pela torcida e vibração a cada etapa vencida.

À minha irmã Jádina, minha grande amiga e parceira na pós graduação, por me ensinar a enfrentar os obstáculos de uma forma mais alegre, por dar leveza aos meus dias e me fazer sorrir sempre.

Ao meu marido Eliézer por todo apoio e dedicação, pela compreensão e pelos sonhos compartilhados, pelas palavras de carinho e de incentivo todos os dias. Por me animar e aconselhar, por querer me ver feliz.

Aos meus sobrinhos Julia e Álvaro, que mesmo sendo crianças me ensinam tanto e são meus “companheirinhos”, que me contagiam com amor e alegria e me fazem querer ser melhor a cada dia.

À minha orientadora professora Dra Luciana Azevedo, pelas lições ensinadas, pelo tempo dedicado a mim, pela confiança em meu trabalho e por contribuir com meu aprendizado e crescimento profissional. Agradeço por abrir as portas do laboratório e me dar autonomia para que eu pudesse executar os experimentos. Por me ensinar que ser metódica é uma qualidade e que os bons resultados vêm com esforço e trabalho duro.

Ao professor Dr Marcos José Marques que prontamente cedeu seu espaço e tempo para realizarmos as leituras de cometa, que carinhosamente disponibilizou seu laboratório e todos os recursos necessários e que sempre se mostrou empenhado a nos ajudar. Esta parceria foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Fisiologia da UNIFAL e aos professores Dr Alexandre Giusti Paiva e Fabiana Cardoso Vilela Giusti que auxiliaram as leituras no aparelho de ELISA.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica Tatieska, Fernanda e Marília que se disponibilizaram com empenho e dedicação a me ajudar nos experimentos, que tornaram esses anos muito alegres, agradáveis e especiais construindo uma boa relação de amizade, carinho e respeito.

Aos técnicos e auxiliares Lellis, Patrícia, Gabriel e Dona Ana pela companhia, pelos cálculos, cafés, pela ajuda em geral, manipulações de animais, por compartilhar e resolver

dúvidas, pela amizade.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa que aceitaram o convite colaborando para a finalização do trabalho.

À secretária, Maria Antonieta Nogueira, que sempre zelosa, de boa vontade, resolveu todos os problemas e esclareceu todas as dúvidas.

Aos animaizinhos roedores que nos permitem estudar de forma ética e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À UNIFAL, CAPES, FAPEMIG e CNPQ, pelo apoio financeiro ao longo destes 2 anos.

A todos que de uma forma ou outra participaram para que o trabalho fosse concluído, meu muito obrigada!

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima (PASTEUR,1939)

RESUMO

A produção de culturas de feijão, soja, algodão, batata, girassol, vêm sofrendo perda de até 70% ocasionada pelo fungo de solo denominado mofo-branco, da espécie *Sclerotinia sclerotiorum*, filamentosos e necrotrófico. Esse fungo na forma de escleródio apresenta-se como grânulo que se confunde com os grãos nas etapas de colheita e limpeza, podendo chegar ao consumidor final. Entretanto, ainda não são conhecidas as consequências do consumo desse fungo na forma de escleródios nos alimentos que são base da alimentação humana. Assim, a presente proposta visa o maior conhecimento da composição e aspectos toxicológicos desse fungo tão comum nos principais produtos agrícolas disponibilizados para o consumidor. Para identificação de solventes adequados à extração de compostos dos escleródios foram realizados testes cromatográficos que apontaram a escolha do acetato de etila para produção do extrato. Foram preparadas rações fúngicas contendo 6, 60 e 600 mg do extrato em 100g de ração, resultando num consumo de 25, 240 e 2600 mg de extrato por kg de peso corpóreo. No estudo *in vivo*, o consumo de ração fúngica não causou alterações nutricionais nos animais. O teste de cometa apresentou aumento no comprimento da cauda de cometas em 106,34; 174,77 e 131,90% para sangue; aumento de Tail Moment de 166%, 380% e 271% (linfócitos) e 660%, 639% e 429% (fígado) e aumento de 129%, 212% e 160% (linfócitos) e 284%, 296% e 260% (fígado) no % de DNA na cauda. Os testes de micronúcleos de medula óssea e cólon apresentaram aumento da frequência de micronúcleos em 186,95%; 147,82%; 239,13% para eritrócitos e 202,63; 173,68 e 223,68% em células do cólon. Este resultado também foi significativo para o teste de apoptose demonstrando aumento de 568,88, 457,77 e 513,33% no número de células apoptóticas. Estes resultados demonstram a ação mutagênica de escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que podem ser desde a quebra do DNA, quanto a alterações nas fibras do fuso ou rearranjos cromossômicos associados ou não a fragmentação do DNA. Esses aspectos tornam os escleródios compostos que devem ser alvo de mais estudo sobre esses efeitos lesivos, uma vez que os mesmos podem chegar ao consumo alimentar de homens e animais por meio de alimentos e rações contaminadas, respectivamente.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. Mutagênese. Neoplasias.

ABSTRACT

The crop of soybean, beans, canola, cotton, peas, lettuce, potatoes, currently represent one of the most important agricultural activities in Brazil. These crops have been threatened, leading to losses of up to 70% of its total volume by the presence of soil fungus called popularly white mold or rot soil, the species *Sclerotinia sclerotiorum*. This fungal species is characteristic to be filamentous and cause necrosis in their hosts, and often find themselves in the granules form (sclerotia) which mix themselves with the seeds in the stages of harvesting and cleaning, thereby they can reach the final consumer in batches containing up to half of its grains contaminated by dormant mycelium of the fungus. For identification of suitable solvents for extraction of compounds of sclerotia chromatographic tests were performed which indicated the choice of ethyl acetate to extract production. Fungal diets containing 6, 60, and 600 mg of extract in 100 g of feed were prepared, resulting in a consumption of 25, 240 and 2600 mg of extract per kg body weight. In the in vivo study, the consumption of fungal feed caused no nutritional changes in animals. The comet test showed an increase in the length of comet tail 106,34; 174.77 and 131.90%. in blood; increase of Tail Moment 166%, 380% and 271% (lymphocytes) and 660%, 639% e 429% (liver) and increase of 129%, 212% and 160% (lymphocytes) and 284%, 296% and 260% (liver) in % of DNA in tail. Micronucleus tests in bone marrow and colon showed increased micronuclei frequency 186.95%; 147.82%; 239.13% to 202.63 and erythrocytes; 173.68 and 223.68% in colon cells. This result was also significant for apoptosis test showing increased 568.88, 513.33 457,77e% in the number of apoptotic cells. These results demonstrate the mutagenic action of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*, which may be from the DNA breakage, as changes in spindle fiber or chromosomal rearrangements associated or not with DNA fragmentation. These aspects render the compounds sclerotia that should be subject to further study on these damaging effects, as they can reach the food intake of humans and animals through contaminated food and feed, respectively. and the other half mixed with the sclerotia.

Key-words: *Sclerotinia sclerotiorum*. Mutation. Neoplasm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ciclo de vida do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> : Germinação Miceliogênica e Carpogênica.	16
Figura 2-	Etapas da carcinogênese.....	19
Figura 3-	Processo de formação do micronúcleo.....	19
Figura 4-	(A)Sementes de soja misturadas aos escleródios do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (B) Escleródios do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> após separação manual das sementes de soja.....	24
Figura 5-	Preparo do extrato e ração fúngica incorporada à ração comercial, contendo escleródios do fungo <i>S. sclerotiorum</i>	27
Figura 6-	Representação esquemática do teste do cometa.....	30
Figura 7-	Esquema experimental utilizado para realização do teste de micronúcleo de medula óssea e micronúcleo de cólon.....	31
Figura 8-	Cromatografia em camada delgada revelada em ultravioleta de 252 nm (A) Alíquotas de 1 a 4 em solvente hexano 100%. (B) Alíquotas de 5 a 14 em solvente hexano 7:3 de acetato de etila. (C) Alíquotas de 15 a 22 em solvente hexano 1:1 de acetato de etila. (D) Alíquotas de 23 a 34 em solvente hexano 3:7 de acetato de etila. (E) Alíquotas de 35 a 45 em solvente acetato de etila 100%. (F) Alíquotas 46 a 55 em solvente álcool etílico 100%. (G) Alíquota 56 em solvente álcool etílico 100%.....	33
Figura 9-	Cromatografia em camada delgada (A) Alíquotas de 1 a 4 em solvente hexano 100%. (B) Alíquotas de 5 a 14 em solvente hexano 7:3 de acetato de etila. (C) Alíquotas de 15 a 22 em solvente hexano 1:1 de acetato de etila. (D) Alíquotas de 23 a 34 em solvente hexano 3:7 de acetato de etila. (E) Alíquotas de 35 a 45 em solvente acetato de etila 100%. (F) Alíquotas 46 a 55 em solvente álcool etílico 100%. (G) Alíquota 56 em solvente álcool etílico 100%.....	34
Figura 10-	Valores médios diários das variáveis monitoradas A- Ganho de peso dos animais e B- Consumo de ração por kg de peso animal, seguido do desvio padrão amostral das mesmas ao longo do período experimental. DXR: doxorubicina 30 mg kg/p.c.; NaCl: 0.9% 10mL kg/p.c.; DMH: N,N'dimetilhidrazina 30 mg/kg p.c. RF = ração fúngica de <i>S.</i>	37

- sclerotiorum*.....
- Figura 11- Teste do Cometa analisado em microscópio Nikon RI2, com aumento de 1000x. A escala representa a medida de 2µm. A: célula sem danos no DNA; B: células com danos no DNA; C: células com extenso dano no DNA..... 40
- Figura 12- A-Tail Length – comprimento da cauda, B- %DNA na cauda, C- Tail Moment de cometas em sangue dos grupos (n=11) G1:NaCl: 0.9% 10 mL/ kg p.c (veículo); G2: DXO: doxorubicina 30 mg/ kg p.c.; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/10 DXR e NaCl 0,9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c..... 42
- Figura 13- A- Tail Length em Fígado– comprimento da cauda, B- %DNA na cauda, C- Tail Moment de cometas dos grupos; n=11, G1:NaCl: 0.9% 10 mL/kg p.c.; G2: DXO: doxorubicina 30 mg kg⁻¹ p.c.; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. 42
- Figura 14- (A)Perfil de danos avaliados em eritrócitos na medula óssea 24horas após administração de 30 mg/ Kg p.c. de DXR. Eritrócito micronucleados em objetiva de 1000x. Fonte: Silva, 2014.(B) Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24 horas após administração de 30 mg/kg p.c. de DMH. Colonócitos micronucleados em objetiva de 1000x. Fonte: Mestranda L. Vieira (UNIFAL – MG). (C) Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24 horas após administração de 30 mg/kg p.c. de DMH. Colonócitos micronucleados em objetiva de 1000x..... 45
- Figura 15- Quantificação de MDA em animais dos grupos (n=11) G1:NaCl: 0.9% 10 mL /kg p.c; G2: DXO: doxorubicina 30 mg/ kg⁻¹ p.c; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. p.c..... 48
- Figura 16- Quantificação de GSH (A) e GSSG (B) em animais dos grupos (n=11) G1:NaCl: 0.9% 10 mL /kg p.c; G2: DXO: doxorubicina 30 mg/ kg⁻¹ p.c; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Proporções de solventes utilizados em CLCF.....	25
Tabela 2-	Proporções dos solventes utilizados em teste de fase móvel.....	25
Tabela 3-	Delineamento Experimental.....	28
Tabela 4-	Protocolo de utilização dos agentes químicos. Resultados <i>in vivo</i> do delineamento experimental.....	29
Tabela 5-	Composição da ração fúngica de <i>S. sclerotiorum</i> oferecida aos animais durante o período de 15 dias.....	36
Tabela 6-	Consumo de ração e proporção do extrato fúngico e de escleródios por kg de peso corpóreo de animal.....	36
Tabela 7-	Efeitos do Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados.....	43
Tabela 8-	Efeitos do Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em frequências de colonócitos micronucleados.....	44
Tabela 9-	Efeitos do Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em frequências de Apoptoses.....	46

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANOVA	-Análise de variância
ANVISA	-Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	-Comitê de tica no Uso de Animais
CLAE-	-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de UV e
UV-DAD	Detector de Arranjos de Diodos
CLCF	-Cromatografia líquida em coluna flash
COBEA	-Colégio Brasileiro de Experimentao Animal
DMH	-1,2 dimetilhidrazina
DNA	-cido desoxirribonucléico
DXR,	-Doxorrubicina
DXO	
FER	-ndice de eficiência alimentar
LANTin	-Laboratório de Análises Nutricionais e Toxicológicas in vivo
LFQM	-Laboratório Fitoquímica e Química Medicinal
Mg/kg	-Miligrama por kilo de peso corpóreo
p.c.	
MN	-Micronúcleos
MNPCE	-Eritrócito Policromático Micronucleado
NaCl	-Cloreto de sódio
NCE	-Eritrócito normocromático
PCE	-Eritrócito Policromático
PGs	-Poligalacturonases
pH	-Potencial hidrogeniônico
UFLA	-Universidade Federal de Lavras
UNIFAL	-Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	<i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	15
1.2	MUTAGÊNESE E CÂNCER.....	18
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	OBTENÇÃO DOS ESCLERÓDIOS E ANÁLISES PRELIMINARES.....	24
3.2	PREPARO DO EXTRATO FUNGICO.....	26
3.3	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	27
3.4	AVALIAÇÃO DA <i>S. SCLEROTIORUM</i> NA MODULAÇÃO DA MUTAGENICIDADE PELO TESTE DO COMETA, TESTE DE MICRONÚCLEO (MEDULA ÓSSEA E CÓLON), APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	29
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE <i>S. SCLEROTIORUM</i>	33
4.2	PREPARO, CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO DOS ANIMAIS.....	35
4.3	ANÁLISE DO COMETA, ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS, COLONÓCITOS MICRONUCLEADOS, PRESENÇA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NO CÓLON E ESTRESSE OXIDATIVO.....	38
4.3.1	Teste do Cometa.....	39
4.3.2	Teste do Micronúcleo e Apoptose.....	43
4.4.1	Análise de Estresse Oxidativo MDA.....	47
4.4.2	Análise de Estresse Oxidativo GSH e GSSG.....	48
5.	CONCLUSÃO	51

6.	REFERÊNCIAS.....	52
-----------	-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A alimentação brasileira tem como base o consumo de grãos que são alvo da contaminação por fungos e há poucos estudos sobre o risco deste consumo para a população.

1.1 *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

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. 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, de acordo com Leite (2005), o qual chega causar perdas de até 70% dessas culturas agrícolas (PERES; MELO, 1995).

Quanto à classificação biológica, o fungo pertence ao reino fungi, filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, subclasse Leotiomycetidae, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia*, espécie *S. sclerotiorum*. Forma anamórfica: Fungos mitospóricos, grupo dos hifomicetos (BOLTON et al., 2005; INDEX FUNGORUM, 2011).

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 conforme 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.

O processo de disseminação de *S. Sclerotiorum* pode ocorrer através da germinação miceliogênica ou carpogênica (LEITE, 2005) (Figura 1). 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 ascósporos que são lançados ao ar de acordo com 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 sobrevivendo por até 11 anos a espera de culturas vulneráveis (LEITE, 2005; PURDY, 1979).

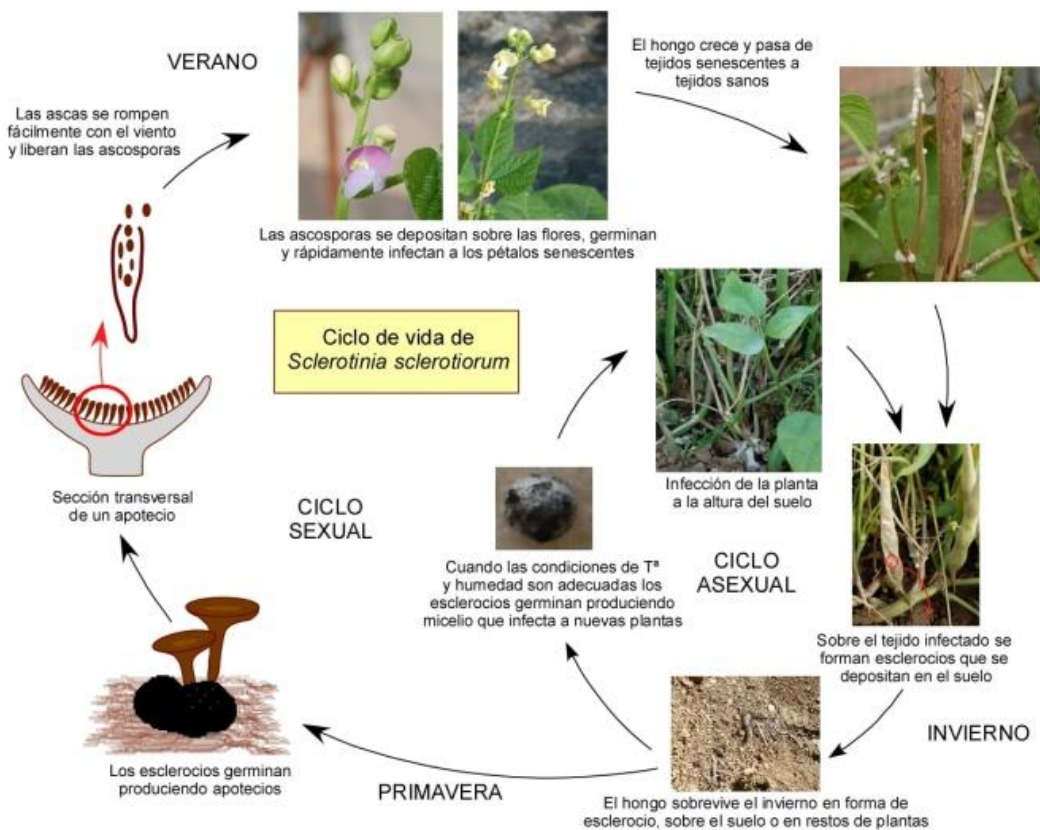


Figura 1 – Ciclo de vida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*: Germinação Miceliogênica e Carpogênica.
Fonte: www.potatodias.es.org

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, 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).

O início do processo patogênico se deve a síntese e secreção de ácido oxálico pelo fungo que exerce efeito tóxico atacando e degradando a complexa estrutura da parede celular da planta hospedeira (DURMAN et al., 2005; MOURA, 2008). Neste fungo, a síntese do oxalato é catalisada pela enzima oxalacetatoacetil-hidrolase, cuja atividade enzimática aumenta à medida em que o pH do meio diminui e tem como resultado uma acidificação do meio extracelular (DURMAN et al., 2005). Ou seja, o potencial patogênico está relacionado com a produção do oxalato e a alteração do pH do meio conforme Moura (2008), pois segundo Godoy et al (2005), isolados de *S.sclerotiorum* analisados que não secretavam ácido oxálico não são considerados patogênicos por não serem capazes de infectar seus hospedeiros.

O ácido oxálico secretado além de exercer efeito tóxico à planta age como quelante de íons cálcio, desestabilizando o sistema bioquímico funcional do hospedeiro, sequestrando o cálcio da parede celular e suprimindo o estresse oxidativo gerado pela planta (FAVARON et al., 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 et al., 2002). Estas enzimas aumentam suas atividades em condições ácidas devido a ação quelante do ácido oxálico e mudanças de pH (ROLLINS et al., 2001). A ação de proteases, pectinases 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).

Apesar da 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* com a finalidade de fornecer dados que possam ser utilizados para avaliação do consumo de *S. sclerotiorum* para a saúde humana. 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.

1.2 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 (PRESTON, 1996; RAMEL, 1984; TUCKER).

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 (PITOT, 1993; TAO et al., 2008.) (Figura 2).

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 (BANNASCH, 1986; PITOT et al., 1987). 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 et al., 1994). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que regulamenta tais testes, incluindo o de carcinogenicidade/mutagenicidade (ANVISA, 2011). No presente trabalho serão utilizados os testes de micronúcleo de medula óssea e de cólon, teste do cometa

em sangue periférico e fígado e apoptose, os quais abrangerão as etapas de iniciação do processo neoplásico.

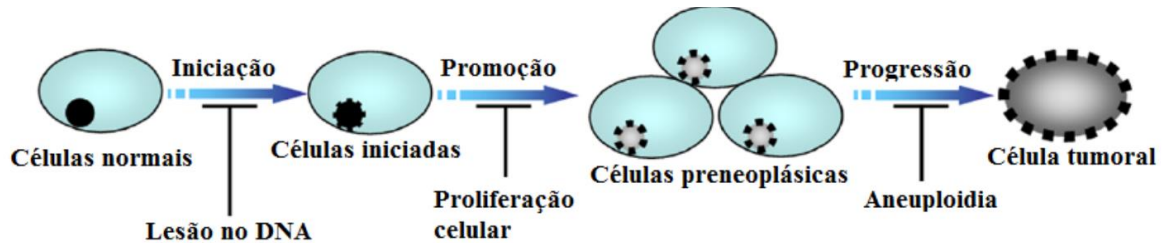


Figura 2- Etapas da carcinogênese.
Fonte: TAO et al., 2008.

O teste do micronúcleo é um método citogenético, utilizado para avaliação de danos cromossômicos *in vivo*, 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).

O ensaio, *in vivo*, constitui-se pela contagem de núcleos diminuídos no citoplasma de células recém-formadas. Os micronúcleos (MN) são estruturas originadas de fragmentos cromatídicos, cromossômicos e até mesmo de cromossomos inteiros, não incorporados às células-filhas durante o processo de divisão celular (Figura 3).

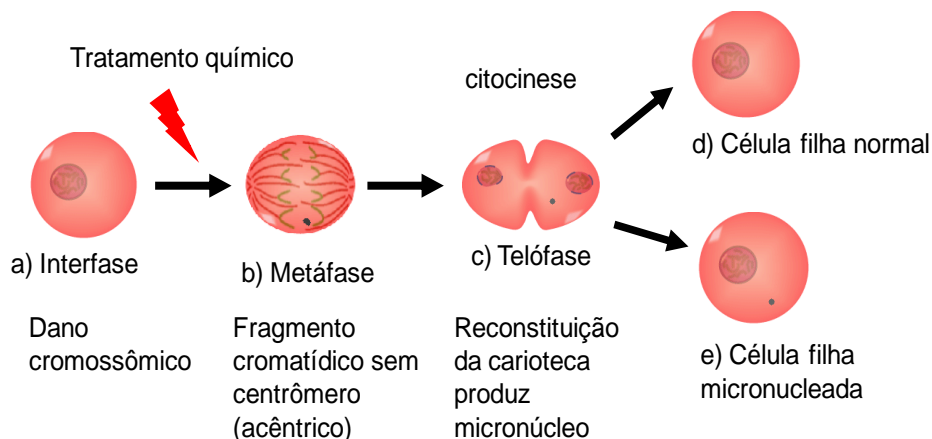


Figura 3- Processo de formação do micronúcleo.

Fonte: Kirsch-Volders, 2011.

Entre as possíveis causas da formação do micronúcleo, está o atraso ocorrido durante a

anáfase, fase em que o material genético migra para os pólos da célula. Estas estruturas são arredondadas e menores que o núcleo principal da célula, por isso chamadas micronúcleos (FENECH, 2000). 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).

O teste do micronúcleo detecta alterações e /ou danos genômicos durante a mitose, sendo um teste indicativo de perdas de DNA irreversíveis, e sua frequência pode ser usada como índice de mutação (VIEIRA et al. 2012). Embora a toxicidade genética não seja uma medida de carcinogenicidade, é muitas vezes associada com o aparecimento de câncer, uma vez que há uma correlação positiva entre a frequência aumentada de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e seres humanos (VINOD, TIWARI, & MESHARAM, 2011).

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. 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 de acordo com Sasaki et al.(1997); sensibilidade e reprodutibilidade conforme Fairbairn; Olive; O’Neill (1995) e 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 (FAIRBAIRN; OLIVE; O’NEILL, 1995; KLAUDE et al., 1996).

É uma técnica 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 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 (Figura 4). 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 (SPEIT et al. 1996).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre durante o metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Segundo Halliwell e Gutteridge (1992), o sequestro de 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). As análises de estresse oxidativo envolvem estudos com o intuito de melhor compreender os efeitos das substâncias antioxidantes e oxidantes na saúde humana. Dessa forma, o estudo de estresse oxidativo produzido por radicais livres, tem sido tema de diversos trabalhos e aqui serão apresentados os biomarcadores mais utilizados para mensurar o dano celular, que são a quantificação da glutatona nas formas oxidada e reduzida e a quantificação de malonaldeído (MDA) que expressa a produção de produtos tóxicos durante o ataque de radicais livres.

O início da carcinogênese geralmente consiste numa alteração do DNA por metabólitos oxidantes, com alta capacidade de lesionar as moléculas de ácidos nucléicos, que podem ser combatidos por anticarcinogênicos/antioxidantes. Estes são agentes de bloqueio, que 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 indicam que diversas doenças inflamatórias são, mediadas em parte, pelo desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes. Dessa forma, o estresse oxidativo pode estar relacionado às fases de iniciação e promoção do processo de carcinogênese (CAROCHO, 2013).

As enzimas antioxidantes 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 segundo Grigolo et al.(1998), assim como a produção de substâncias tóxicas como o malonaldeído. 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}), alcoxil (RO^{\bullet}) e o óxido nítrico ($\bullet NO$) (CAROCHO; FANG et al., 2002; FERREIRA, 2013).

Os radicais livres são espécies 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 . 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). Para a continuidade do processo, a GSSG deve ser novamente convertida à GSH, através da atuação da glutathiona redutase (GR).

A determinação da peroxidação lipídica, que é considerada marcador importante do estresse oxidativo está envolvida em fatores no dano celular causado pelos radicais livres. (BALU *et al.*, 2005). Este processo ocorre inicialmente através do ataque de radicais livres à bicamada lipídica de espécies capazes de doar um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado. Com a iniciação, este torna-se um processo autocatalítico que permanece enquanto houver reservas de oxigênio e ácidos graxos. Como produtos finais, há formação de hidroperóxidos e aldeídos, como o malonaldeído (MDA), que pode ser quantificado em amostras biológicas e utilizado nas avaliações de estresse oxidativo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral e estratégias para alcançar os objetivos específicos deste trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial genotóxicos e mutagênico, *in vivo*, dos grânulos de *Sclerotinia sclerotiorum*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial mutagênico dos escleródios usando teste de micronúcleo em células de medula óssea e cólon;

Avaliar o potencial mutagênico dos escleródios em linfócitos pelo teste do cometa usando sangue periférico e fígado;

Avaliar o efeito dos escleródios sobre o estresse oxidativo em fígado, pelo teste de peroxidação lipídica e glutathione.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Características da obtenção e processamento de materiais e testes toxicológicos.

3.1 OBTENÇÃO DOS ESCLERÓDIOS E ANÁLISES PRELIMINARES

Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram obtidos a partir de sacarias de soja provenientes de culturas infectadas pelo fungo. O material foi obtido pelo Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA) onde a contaminação pelo fungo foi confirmada, conforme Figura 4-A.

Os escleródios do fungo foram separados, manualmente das sementes (Figura 4-B).



Figura 4- (A) Sementes de soja misturadas aos escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. (B) Escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* após separação manual das sementes de soja.

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

Após o isolamento dos escleródios, o material passou por um processo de lavagem utilizando hipoclorito de sódio 10% por 10 minutos e em seguida enxaguado em água corrente por 10 minutos. Deste material foi realizada avaliação do solvente para preparo dos extratos. Essa análise do extrato foi realizada no Laboratório Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Foram realizadas análises para avaliação de diferentes solventes na maceração do fungo (água, hexano, etanol e acetato de etila) iniciando-se com a cromatografia líquida em coluna flash (CLCF) seguida de cromatografia de camada delgada. A amostra utilizada nesta cromatografia líquida em coluna flash foi preparada utilizando um cadinho e sílica, por meio do processo de adsorção do extrato em acetato de etila em 3,19 g de sílica, resultando em 2,27 g de amostra final. Após preparada a amostra, selecionou-se a coluna a ser utilizada baseada

no peso de amostra disponível e montada utilizando 20 cm de sílica flash mais algodão em ambas as extremidades da coluna. Efetuou-se um teste de fluxo da amostra para ajuste do mesmo a 5 cm por 30 segundos de fase móvel. Após acertado o fluxo, colocou-se a amostra sobre a sílica e aplicou-se a fase móvel na coluna, ligando o aparelho de pressão para retirada das alíquotas com maior eficiência. Utilizou-se como fase móvel gradiente o hexano/acetato de etila em diferentes proporções ao longo da corrida cromatográfica (Tabela 1) e, para finalizar, usou-se 250 mL de Álcool Etílico Absoluto garantindo a remoção completa dos componentes do extrato.

Tabela 1 Proporções de solventes utilizados em CLCF

Proporções	Solventes		Alíquotas
100%	Hexano 250 ml		1-4
7:3	Hexano 210 ml	Acetato de Etila 90ml	5-14
1:1	Hexano 150 ml	Acetato de Etila 150 ml	15-22
3:7	Hexano 150ml	Acetato de Etila	23-34
100%	Acetato de Etila		35-45
100%	Álcool Etílico Absoluto		46-57

A CLCF resultou em 57 alíquotas dispostas em frascos de penicilina numericamente identificados. Estes frascos foram armazenados, abertos, em capela de exaustão para a secagem dos solventes utilizados. As proporções de solventes utilizadas na CLCF foram apresentadas na Tabela 2.

As alíquotas obtidas da cromatografia líquida em coluna flash passaram por uma cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar a presença de substâncias em cada uma delas e a possibilidade de diferentes alíquotas terem a mesma composição, além da obtenção da melhor fase móvel para extração dos componentes do extrato.

Tabela 2 Proporções dos solventes utilizados em teste de fase móvel

Teste	Fase móvel		
1	Hexano (1 mL)	Acetato de Etila (1 mL)	
2	Hexano (1 mL)	Ac. de Etila (500 mL)	Clorofórmio (500 mL)
3	Hexano (500 mL)	Ac. de Etila (750 mL)	Clorofórmio (750 mL)

3.2 PREPARO DO EXTRATO FUNGICO

Após a lavagem dos escleródios com hipoclorito de sódio 10%, o material foi encaminhado para a estufa a 40 °C por 24 horas para secagem total. Foram pesados 1.500 g de escleródios para constituição de extrato em 1L de acetato de etila, realizando-se a o processo de trituração da amostra com o equipamento Turrax®. Os escleródios foram transferidos para kitassatos de 2L e mantidos sobre agitação por uma semana, trocando a solução extratora a cada três horas durante o dia, a qual foi armazenada para coleção total do extrato.

O extrato obtido foi rotaevaporado até que houvesse a completa evaporação da fração líquida com adição de 10 g de celulose D durante o processo. Para extração do principio ativo do balão, usou-se 30 mL de álcool etílico absoluto, que posteriormente foi eliminado por secagem em estufa a 40 °C.

Após o processo de secagem para retirada total do álcool, o princípio ativo passou a ter uma aparência semelhante à areia molhada. Este preparado em pó foi incorporado nas proporções desejadas com a ração comercial triturada (Figura 5).

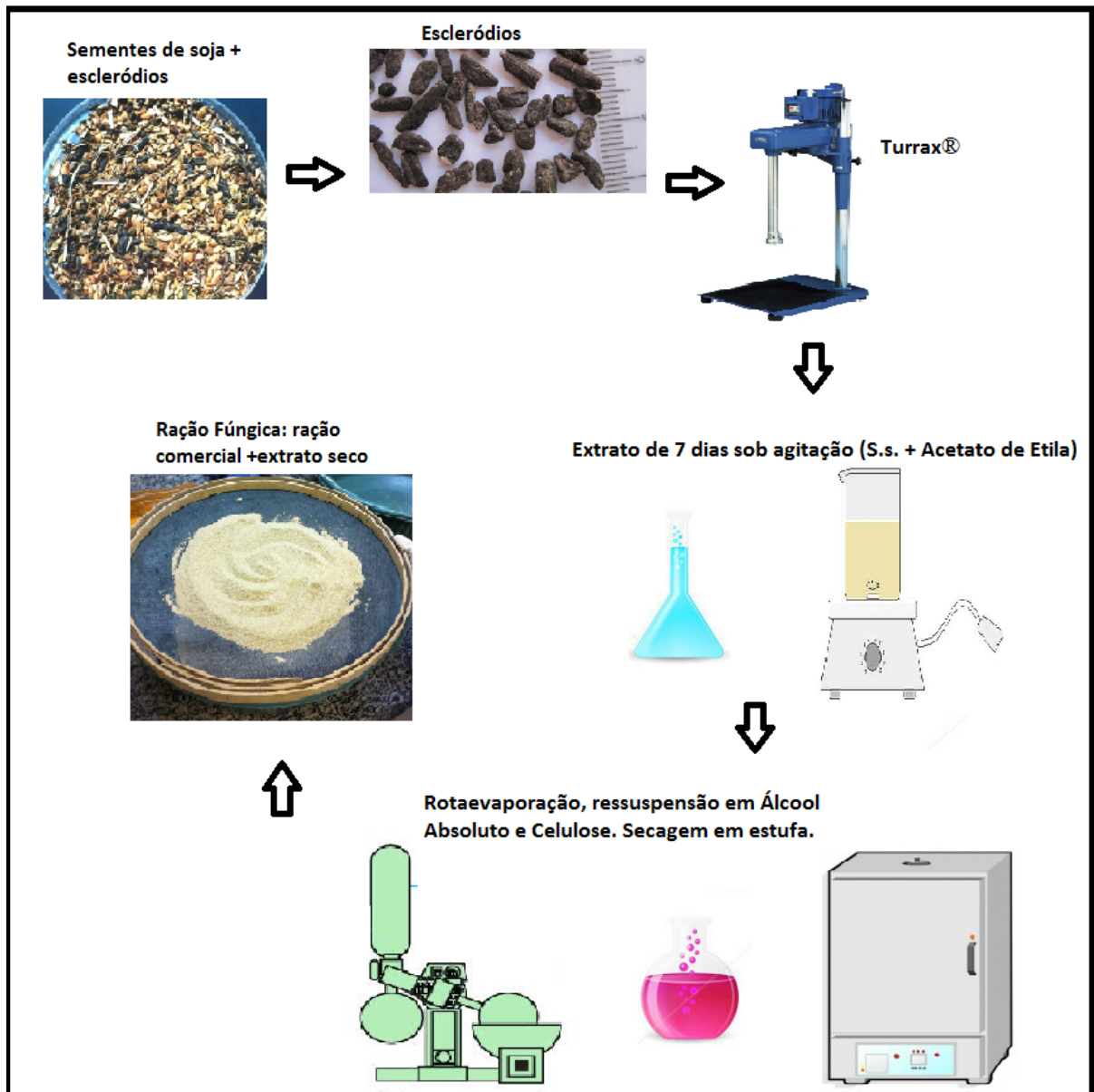


Figura 5- Preparo do extrato e ração fúngica incorporada à ração comercial, contendo escleródios do fungo *S. sclerotiorum*.
Fonte: Da autora.

3.3 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

As análises de modulação das lesões genômicas *in vivo*, correspondem à segunda etapa deste projeto. Os experimentos foram conduzidos, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme atestado a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-Unifal-MG) com protocolo número 408/2012.

Para as análises toxicológicas, o fungo foi inserido na ração nas seguintes quantidades 6 mg/100 g ração, 60 mg/100 g ração e 600 mg/100 g ração.

Para realização do experimento *in vivo* foram utilizados 66 camundongos da linhagem Swiss recém-desmamados (15 ± 5 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais contendo onze animais em cada grupo ($n=11$), mantidos em sala climatizada, sob umidade relativa do ar de $50 \pm 20\%$, a temperatura constante de 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, durante o período de 14 dias. O regime de água e a alimentação foi *ad libitum*, utilizando a ração comercial Nuvilab®. A ração foi triturada e adicionada ao princípio ativo nas três dosagens.

No 14° dia de experimento os animais dos grupos 1, 4, 5 e 6 receberam NaCl 0,9% (m/v) e o grupo 2 doxorubicina (DXR - 30 mg/kg p.c.) via intraperitoneal, já o grupo 3 recebeu N,N' – dimetilhidrazina (DMH – 30 mg/kg p.c.) via gavagem, conforme delineamento (Tabela 3):

Tabela 3 Delineamento Experimental

Grupo	Tratamento	DIETA
G1*	NaCl 0,9% **	Ração Comercial
G2*	DXR***	Ração Comercial
G3*	DMH****	Ração Comercial
G4*	NaCl 0,9% **	RF 6mg/100g ração
G5*	NaCl 0,9% **	RF 60mg/100g ração
G6*	NaCl 0,9% **	RF 600mg/100g ração

Tabela 3- Delineamento experimental

* n=11; ** NaCl 0,9% (m/v) = dose equivalente 10 mL/Kg p.c. ***DXR = doxorubicina (30 mg/Kg p.c.) agente intercalante de DNA e indutor de lesões pré-neoplásicas em células da medula óssea. ****DMH = N,N' – dimetilhidrazina (30mg/Kg p.c.) agente alquilante e composto clastogênico.

As doses, as vias de exposição e órgãos-alvo desses compostos estão descritos na Tabela 4. No 15° dia realizou-se a eutanásia dos animais com a utilização de Cloridrato de Ketamina 10% (0,1 mg a cada 100 g p.c.) e Cloridrato de Xilazina (0,05 mg a cada 100 g p.c.) ambos da marca VETBRANDS®.

Tabela 4 Protocolo de utilização dos agentes químicos.

Agentes	Doses	Vias de exposição	Período/exposição	Órgão alvo
DXO	30 mg/kg	Intraperitoneal	Dose única*	Medula óssea e sangue
DMH	30 mg/kg	Oral	Dose única*	Cólon

* No 15º dia do experimento. DXR = doxorubicina agente intercalante de DNA e indutor de lesões pré-neoplásicas em células da medula óssea; DMH = N,N' – dimetilhidrazina agente alquilante e composto clastogênico.

A variação dos agentes indutores e vias de administração ocorreram em função do que se desejava induzir e local de ação. Assim, delineamentos direcionados para o cólon utilizaram DMH e o direcionado para mutagenicidade em sangue periférico, medula óssea e fígado utilizaram a DXO.

Os animais foram pesados a cada dois dias para verificar o desempenho de crescimento e utilização de nutrientes dos camundongos alimentados com dieta comercial e ração fúngica. Estes parâmetros foram avaliados em termos de média de ganho de peso por grupo e média da ração consumida por grupo durante o delineamento experimental.

3.4 AVALIAÇÃO DA *S. SCLEROTIUM* NA AÇÃO DA MUTAGENICIDADE PELO TESTE DO COMETA, TESTE DE MICRONÚCLEO (MEDULA ÓSSEA E CÓLON), APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO

Esse experimento teve duração de 15 dias, no 14º dia os animais receberam DXR (30mg/kg peso corpóreo) via intraperitoneal ou NaCl 0,9%, conforme os grupos experimentais. No 15º dia de experimento, foi realizada a eutanásia dos animais. Para o teste do cometa e de micronúcleo foram utilizados materiais dos grupos controle e daqueles que receberam DXO.

O teste do cometa foi realizado conforme Azevedo et al. (2003 e 2007), seguindo técnica descrita originalmente por Singh et al. (1988), com modificações introduzidas por Hartmann e Speit (1999), utilizando células de sangue periférico e fígado. Foram analisadas 50 células por lâmina, de cada animal, em aumento de 200 vezes, em microscópio de fluorescência Nikon 50i com filtro verde, no Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL (Figura 6). A avaliação dos danos do DNA foi realizada usando o sistema de análise de imagem Comet Score, cujos parâmetros avaliados são comprimento e intensidade da cauda do cometa.

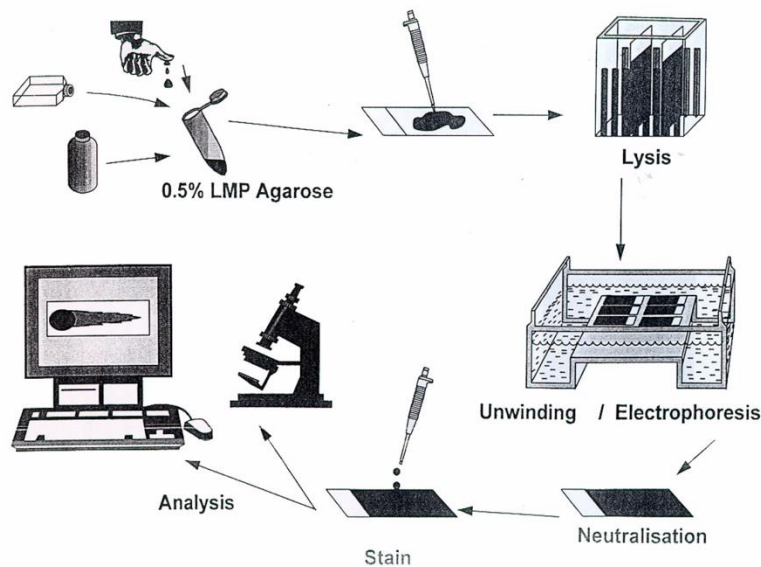


Figura 6- Representação esquemática do teste do cometa
 Fonte: Acervo do grupo LANTin.

As análises de micronúcleo em medula óssea (Figura 7) foram realizadas conforme apresentado em Azevedo et al (2010), seguindo MacGregor et al. (1987), que consiste na análise de 2000 células por animal em microscópio Nikon com aumento de 20X. Para essa finalidade, as células de medula óssea foram coletas dos fêmures em soro fetal bovino (3mL), centrifugadas por 5 minutos, descartando o sobrenadante e realizando os esfregaços em lâminas previamente codificadas. As células foram coradas após 24 horas com corante Leishman (Merk®) para diferenciar o eritrócito policromático (PCE) do eritrócito normocromático (NCE).

Para o teste de mutagenicidade em enterócitos, micronúcleo de cólon (Figura 7), foram utilizados os cólons do grupo controle negativo, dos tratamentos e daqueles que receberam DMH. Os cólons foram retirados e limpos de resíduos fecais com solução fisiológica, abertos longitudinalmente no sentido do ânus ao ceco e depois enrolados com pinça formando os chamados *swissrolls* (MOOLENBEEK e RUITENBERG, 1981). Os *swissrolls* foram fixados em formalina neutra a 10%, embebidos em parafina (Paraplast, CML, France), seccionados através do rolo (5 µm) e corados com Feulgen-fastgreen após hidrólise por 1 hora a 60-65°C em HCl5N. Para cada animal foram contadas 1000 células epiteliais manualmente, as quais foram classificadas como normais ou micronucleadas (VANHAUWAERT et al, 2001; POZHARISSKI, 1979). Para as análises de apoptose de enterócitos, os *swissrolls* foram corados com Hematoxilina-Eosina e levadas à microscopia. Para a identificação de células apoptóticas, foram examinadas 20 criptas orientadas perpendicularmente, para cada animal, realizando a contagem do número total de células epiteliais em cada cripta (CHANG,

CHAPKIN,&LUPTON,1997).

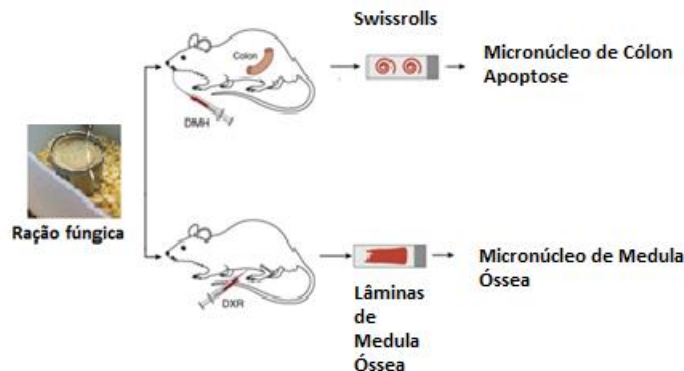


Figura 7- Esquema experimental utilizado para realização do teste de micronúcleo de medula óssea e micronúcleo de cólon. Fonte: Da autora.

Para a análise de estresse oxidativo, foram determinados os níveis de MDA e glutathiona. 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, glutathiona, e teor de proteína. As amostras de fígado (0,5 g) foram misturadas com 10 ml de KCl 1,15% (m/v), centrifugadas durante 5 minutos a 300 rpm. Assim, 500 μ L 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 (300 rpm, 15 min), foi analisada em aparelho ELISA a absorvância de 535 nm, e expressa em $\text{nmol mg de proteína}^{-1}$ (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

Para análise de glutathiona as amostras de fígado (0,5g) foram maceradas em 5mL de tampão KPE 0,1 M, pH 7,5 e deste material retirado 20 μ L do homogenato, colocado na placa de ELISA de 96 poços. Adicionou-se uma mistura de volumes iguais de soluções de DTNB (Sigma) e Glutathiona Redutase (Sigma) preparadas em conjunto no volume de 120 μ L a cada poço. Após 30 s de espera para a conversão de GSSG em GSH, adicionou-se 60 μ L de NADPH- β (Sigma) Foi medida imediatamente a absorvância a 412 nm num leitor de microplacas e a cada 30 s durante 2 minutos (5 leituras no total de 0-120 s). Para determinar a concentração de GSH total real nas amostras foi usada uma regressão linear para calcular os valores obtidos a partir da curva padrão (RHAMAN, 2007).

Para a análise de GSSG adicionou-se ao extrato celular 100 μ L de ácido sulfossalicílico

em um tubo de Eppendorf de 1,5 ml. e 2 mL de 2-vinilpiridina agitando em vortex para derivar GSH. A reação ocorreu por 1h em repouso em ambiente escuro à temperatura ambiente então adicionou-se 6 ul de trietanolamina e fez-se uma nova pausa para neutralização da reação. As amostras foram colocadas em placa de 96 poços e lidas em ELISA a 412 nm. Os resultados foram avaliados considerando-se que a medida de GSH é igual à subtração de GSSG do valor de glutathiona total. As medidas de glutathiona foram expressas em mg/g de proteína (RHAMAN, 2007). O conteúdo de proteína foi quantificado usando Bradford (BRADFORD, 1976).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos pesos corpóreos ao longo do período experimental foi realizada através da análise multivariada de perfil complementar com a construção dos intervalos de confiança simultâneos (WICHERN e JOHNSON, 1992).

Para os testes do cometa, foi utilizado o método ANOVA e teste de Tukey, conforme sugerido por Dias et al. (2010) e Anderson et al. (1998). Para isso, as comparações ocorreram entre os grupos controle negativos e os tratados com solução salina e entre os controle positivos e os tratados com as drogas indutoras (DXO ou DMH). Para o teste de micronúcleo foi utilizada a análise de Qui-quadrado apresentada em Azevedo et al. (2010) e Dragano et al. (2010).

Em todos os testes, foi adotado o valor a partir de $p < 0,05$ para significância estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentação dos resultados experimentais obtidos.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *S. SCLEROTIORUM*

As análises cromatográficas realizadas basearam-se na busca de uma fase móvel gradiente que permitisse a eluição e extração dos compostos do extrato fúngico. Essas análises demonstraram que o extrato possui componentes com polaridades muito diferentes. Entre as 57 alíquotas da cromatografia em camada delgada, apresentadas nas Figuras 7 e 8, as numeradas entre o intervalo 15 a 22 (letra C) em solvente hexano 1:1 de acetato de etila, 23 a 34 (letra D) em solvente hexano 3:7 de acetato de etila e 35 a 45 (letra E) em solvente acetato de etila 100% revelaram que o acetato de etila foi o solvente ideal, uma vez que apresentaram melhor retenção dos compostos.

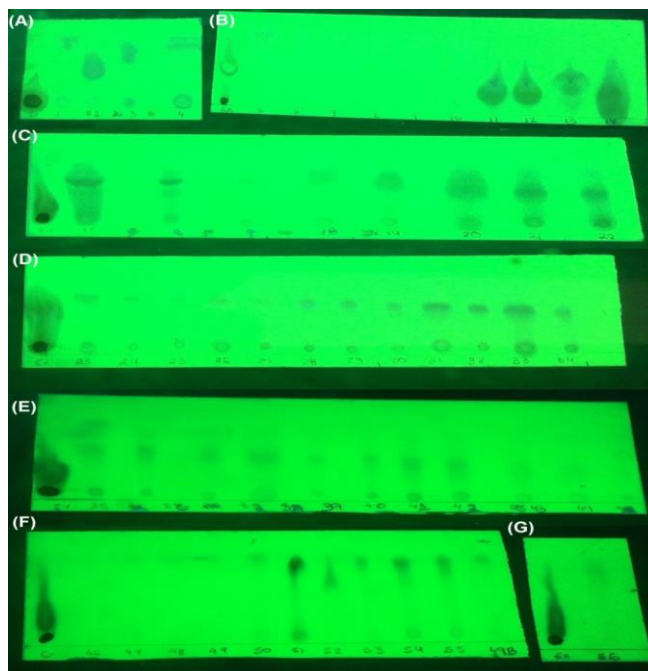


Figura 8- Cromatografia em camada delgada revelada em ultravioleta de 252 nm (A) Alíquotas de 1 a 4 em solvente hexano 100%. (B) Alíquotas de 5 a 14 em solvente hexano 7:3 de acetato de etila. (C) Alíquotas de 15 a 22 em solvente hexano 1:1 de acetato de etila. (D) Alíquotas de 23 a 34 em solvente hexano 3:7 de acetato de etila. (E) Alíquotas de 35 a 45 em solvente acetato de etila 100%. (F) Alíquotas 46 a 55 em solvente álcool etílico 100%. (G) Alíquota 56 em solvente álcool etílico 100%.

Fonte: Graduanda P. Valadão (UNIFAL –MG).

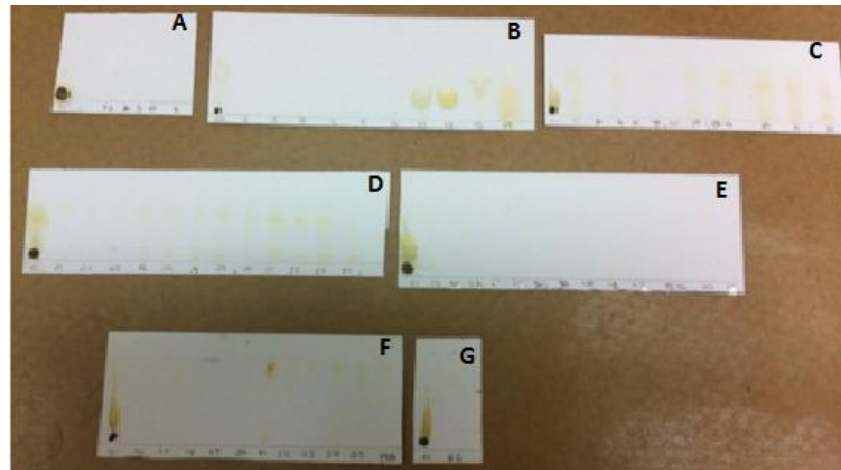


Figura 9- Cromatografia em camada delgada. (A) Alíquotas de 1 a 4 em solvente hexano 100%. (B) Alíquotas de 5 a 14 em solvente hexano 7:3 de acetato de etila. (C) Alíquotas de 15 a 22 em solvente hexano 1:1 de acetato de etila. (D) Alíquotas de 23 a 34 em solvente hexano 3:7 de acetato de etila. (E) Alíquotas de 35 a 45 em solvente acetato de etila 100%. (F) Alíquotas 46 a 55 em solvente álcool etílico 100%. (G) Alíquota 56 em solvente álcool etílico 100%.

Fonte: Graduanda P. Valadão (UNIFAL –MG).

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;).

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*, a qual constituirá as próximas etapas desse trabalho de pesquisa.

Roque et al. (2014) sugerem a presença de trealose e manitol na estrutura dos escleródios. 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, pois serve como carboidrato reserva durante períodos sem proliferação (LUO; LI; WANG, 2008).

Azevedo et al. (2016) encontraram compostos alcaloides e estruturas de isocumarinas em amostras de extrato aquoso de *S. sclerotiorum*, como esclerolide. Trabalhos anteriores relatam que alguns desses compostos da *S. sclerotiorum* apresentam vários efeitos biológicos. A variabilidade na estrutura das cumarinas com adição dos grupos catecólicos induzem aumento da atividade citotóxica em células tumorais (DEVIENNE, RADDI, VARANDA E VILEGAS, 2002). Entre suas atividades biológicas, atuam como repelentes, antitumorais, antimaláricos e estimulantes do sistema nervoso central. As isocumarinas são compostos derivados de ácidos fenólicos e hidrocarbônios que apresentam atividades anti-inflamatórias, antimaláricas, antitumorais, antioxidantes (SOUZA, 2005).

Quanto ao processo de produção do extrato utilizando-se acetato de etila 100% (v/v), constatou-se que 1,5Kg de escleródios produziram 18,24g de extrato liofilizado, correspondendo a 1,22% de rendimento. Esse extrato foi utilizado para a produção dos três níveis de dietas experimentais fornecidas para os animais.

4.2 PREPARO, CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO DOS ANIMAIS

Para o preparo da ração fúngica (RF), estimou-se um consumo diário de ração por animal e desta maneira foram preparados 2 Kg de cada uma das três rações contendo extrato fúngico fornecidas para os animais. A Tabela 5 demonstra a composição dessas rações com relação à quantidade de extrato fúngico e escleródios utilizados por kg de ração. Dessa composição podemos observar que foram alcançadas as concentrações de 6, 60 e 600 mg de escleródios em 100 g de ração, as quais foram utilizadas para denominar os três tratamentos no experimento *in vivo*. A Tabela 5 apresenta o consumo de ração/kg p.c. e, por consequência, o consumo diários médio de extrato e escleródios por quilograma de peso animal.

Tabela 5- Composição da ração fúngica de escleródios de *S. sclerotiorum* oferecida aos animais durante o período de 15 dias

Rações	Extrato + Celulose g/kg ração	Extrato g/kg ração	Escleródios g/kg ração	Composição de escleródios
Ração Fúngica 1	0,14g	0,06g	4,50g	6mg/100g ração
Ração Fúngica 2	1,43g	0,60g	45,00g	60mg/100g ração
Ração Fúngica 3	14,30g	6,00g	450,00g	600mg/100g ração

*Extrato seco de escleródios de *S. sclerotiorum* em acetato de etila 100% rotaevaporado e incorporado à ração nas concentrações de 0,014, 0,143 e 1,43%; celulose micro cristalina; ração comercial da marca Nuvilab® triturada.

Tabela 6- Consumo total de ração, de extrato fúngico e de escleródios ao longo do período experimental por kg de peso corpóreo de animal.

Grupo	ração g/kg p.c.	extrato mg/kg p.c.	escleródio g/kg p.c.
G1 NaCl	493,8±39,3	0	0
G2 DXR	386,4±69,2	0	0
G3 DMH	427,5±54,1	0	0
G4 RF 6 mg/100g ração	474,3±71,1	25	2,1
G5 RF 60 mg/100g ração	508,2±60,5	240	20,9
G6 RF 600mg/100g ração	300,0±11,8	2600	135,0

*DXR: doxorubicina 30 mg kg⁻¹ p.c.; NaCl: 0.9% 10mL kg⁻¹ p.c.; DMH: N,N' – dimetilhidrazina 30 mg kg⁻¹ p.c. RF = ração fúngica de *S. sclerotiorum* nas proporções de 6, 60 e 600mg/100g ração.

Observando-se a Tabela 6 e Figura 10 pode-se constatar que não houve variação significativa de consumo de ração entre todos os grupos experimentais, incluindo os controles. Por consequência do consumo de ração e das concentrações das dietas experimentais, com 6, 60 e 600 mg de extrato/100 g de ração, determinou-se que os animais tiveram um consumo diário de extrato nos níveis de 25, 240 e 2.600 mg extrato/kg peso corporal. Esses três níveis de tratamento foram anteriormente estimados para atender ao Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013). Esse Guia aborda orientações para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento

de fármacos, baseados em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos, visando uma maior padronização e regulamentação internacional. A maior dose amparou-se no critério de indicação para os testes de genotoxicidade *in vivo* que recomenda como maior dose 2000 mg/kg, a qual foi tolerada, sem alterar consumo ou peso animal. Um ensaio de mutação gênica é geralmente considerado suficiente para dar suporte a todos os estudos clínicos de administração única. Devem ser verificados periodicamente sinais específicos de importância toxicológica além de peso corporal e consumo de ração (ANVISA, 2013).

A Figura 10 evidencia o perfil de variação do peso corpóreo médio dos animais que foram utilizados na avaliação da mutagenicidade da ração fúngica contendo o extrato de *Sclerotinia sclerotiorum*, da mesma forma não houve diferença estatística no ganho de peso do animais entre todos os grupos experimentais.

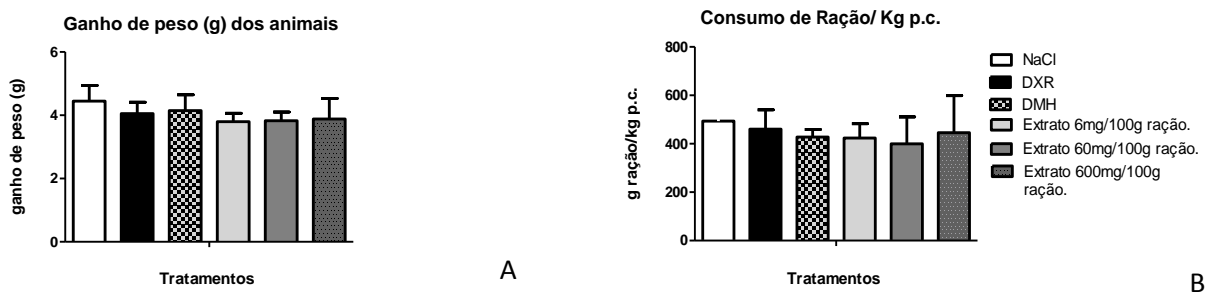


Figura 10-Valores médios diários das variáveis monitoradas A- Ganho de peso dos animais e B- Consumo de ração por kg de peso animal, seguido do desvio padrão amostral das mesmas ao longo do período experimental. .
Fonte: Da autora.

*DXR: doxorubicina 30 mg kg⁻¹ p.c.; NaCl: 0.9% 10mL kg⁻¹ p.c.; DMH: N,N' – dimetilhidrazina 30 mg kg⁻¹ p.c. RF = ração fúngica de *S. sclerotiorum*. Conclusão: não houve diferença estatística entre o ganho de peso e consumo de ração entre os grupos observados, de acordo com teste de Tukey.

As variáveis monitoradas durante todo período experimental como ganho de peso e consumo de ração, servem como um sensível indicador do estado geral do animal durante a sua vida (APPENZELLER et al., 2008). Sendo assim, os resultados dessas variáveis indicam que o extrato de *S.sclerotiorum* em diferentes concentrações, não foi capaz de causar 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). Esse mesmo comportamento foi observado em Roque et al. (2014), demonstrando que o consumo do fungo não interferiu no ganho de peso, taxa de eficiência alimentar, taxa de eficiência proteica e crescimento específico de animais ao utilizar

extrato aquoso do fungo por um período de 15 dias.

4.3 ANÁLISE DO COMETA, ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS, COLONÓCITOS MICRONUCLEADOS, PRESENÇA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NO CÓLON E ESTRESSE OXIDATIVO

As análises *in vivo* foram realizadas a fim de explorar os efeitos mutagênicos do fungo *S. sclerotiorum* em relação aos danos que ocorrem espontaneamente. Os efeitos mutagênicos foram investigados pelos ensaios de cometa e testes de micronúcleos, utilizando-se variação entre órgãos e tipos celulares. Assim, os resultados do teste de cometa em leucócitos do sangue foram comparados aos testes de micronúcleos de eritrócitos de medula óssea e complementados pelos testes de micronúcleos e apoptose de enterócitos, a fim de determinar os efeitos desses escleródios forma mais ampla.

Os agentes DXR e DMH utilizados como controle foram escolhidos por possuírem órgãos alvos os materiais biológicos de interesse no estudo, como leucócitos do sangue e eritrócitos de medula óssea para DXR e colonócitos para DMH. Esses agentes apresentam como mecanismos de ação a indução de lesões no DNA. A doxorubicina é originalmente isolada do fungo *Streptomyces peucetius* e está entre os mais efetivos agentes antineoplásicos utilizados na quimioterapia de câncer de mama, fígado e pulmão. 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, desenvolvimento de tumores (DUTHIE et al., 1996; CERUTTI, 1994;) e degeneração celular. A DMH é usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção em estudos de carcinogênese de cólon, possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (NEWELL & HEDDLE, 2004, TANAKA, 2009; FEMIA, 2010). É considerado um agente indireto, uma vez que os produtos de seu metabolismo induzem a formação de adutos de grupos metil no DNA, mutações pontuais, separação aberrante de cromátides irmãs e induz apoptose no cólon aumentando a proliferação de colonócitos (Newell & Heddle, 2004).

Quanto ao teste do cometa, observa-se que ele avalia os danos no DNA de células individuais, causados pela substância testada, denominadas genotóxicas. Esses genotóxicos são capazes de produzir quebras de fitas simples e duplas, sítios alcali-lábeis e expressão de sítios com reparo incompleto. Assim, os danos observados pelo teste do cometa nesse

experimento com extrato de esclerotínia podem ser considerados como recentes e ainda passíveis de reparo. Eles correspondem a uma identificação das características dessa exposição específica e, como consequência, podem ou não causar mutação, quando esses danos são perpetuados nas células filhas após a divisão celular (MOLLER, 2006; MALUF, 2004; KOPJAR; GARAJ-VRHOVAC; MILAS, 2002). A corrente elétrica, referente a fase de eletroforese da técnica, faz com que esses fragmentos ou danos de DNA do núcleo da célula migrem em direção ao pólo positivo, resultando em imagens com aparência de “cometas”, as quais são medidas como objetivo de determinar a extensão da lesão. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam cauda, enquanto que células com mais danos, apresentam caudas maiores (SPEIT et al. 1996).

4.3.1 Teste do Cometa

Para o teste do cometa foram utilizadas células do sangue periférico e células do fígado dos animais em estudo. Para ambos foram utilizados como *endpoints* os parâmetros Tail length, %DNA in tail e Tail moment. O Tail moment reflete medidas do menor tamanho detectável de migração de DNA (refletido no tamanho do comprimento da cauda) e do número de quebras de DNA (representado pelo % de DNA na cauda), demonstrando a relação entre as quebras e o arraste do material genético (SPEIT et al., 1996).

O comprimento da cauda de cometas (Tail length) expressa proporcionalmente a magnitude do dano causado ao DNA das células analisadas, uma vez que, quanto mais e menores forem os fragmentos do nucleóide, maior arraste apresentarão durante a corrida de eletroforese, sendo a % de DNA in Tail, representa a densidade de partículas de DNA durante a quebra do material genético (Di PAOLO, 2006). (Figura 11)

Os resultados da avaliação dos cometas no software Comet Score mostraram diferenças entre o controle negativo (G1) e positivo (G2) em todos os parâmetros analisados, em ambos os testes, evidenciando a sensibilidade do método para detectar lesões genômicas.

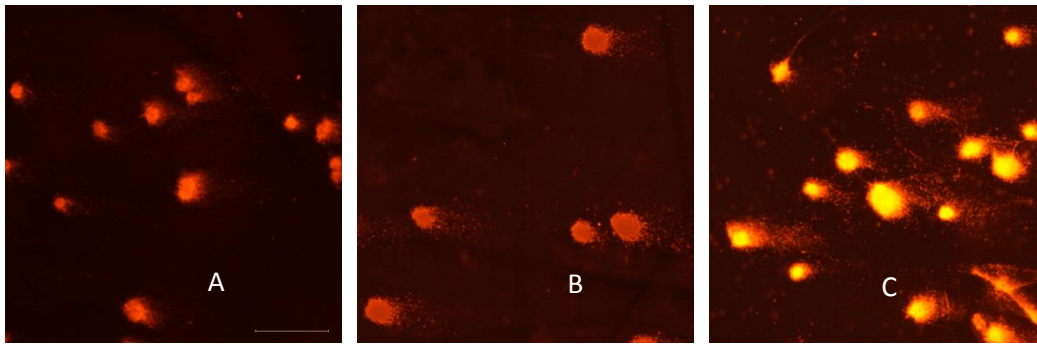


Figura 11- Teste do Cometa analisado em microscópio Nikon RI2, com aumento de 20x. A escala representa a medida de 100µm. A: célula sem danos no DNA; B: células com danos no DNA; C: células com extenso dano no DNA.

Fonte: Da autora.

Evidencia-se que lesões persistentes no DNA podem levar a um aumento da mutagênese pela maior probabilidade de ocorrerem erros devido a uma replicação em molde alterado, as quais podem ser superiores a capacidade de correção do sistema de reparo (MALUF, 2004; MOLLER, 2006). Se o reparo do DNA ocorrer de forma deficiente causará a instabilidade genômica, caracterizada por mutações generalizadas, quebras cromossômicas e aneuploidias no genoma, que pode comprometer a regulação do ciclo celular, levando à formação de tumores (BORGES-OSÓRIO 2001). De fato estas mutações foram avaliadas e confirmadas pelo teste do micronúcleo, conforme item 4.3.2.

Danos no DNA e reparo defeituoso são os eventos moleculares subjacentes dirigindo o início e progressão do câncer, no caso, disparados pelos compostos bioativos dos escleródios. Na evolução do processo, uma célula cancerosa pode emergir de uma população de células em crescimento pelo acúmulo de mutações nos genes reguladores. Estas células podem falhar em responder a sinais de diferenciação e continuar se multiplicando ao invés de diferenciar-se. Desta forma o câncer pode resultar de um processo progressivo de eventos que aumentam a desregulação dentro de uma linhagem celular. (JORDE et al 2000).

Para o parâmetro de % DNA na cauda de cometas, observou-se um aumento de 129%, 212% e 160% para as três concentrações de 6, 60 e 600 mg/100 g ração, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo NaCl 0,9% m/v. Os grupos tratados tiveram comportamento da mesma magnitude do agente anti-neoplásico DXR, controle positivo, com exceção da menor dose (G4). Com relação ao teste de cometa em fígado, houve um aumento respectivo de 284%, 296% e 260% na porcentagem de DNA na cauda de cometas dos grupos tratados com a ração fúngica, também semelhante ao dano causado pela DXR. Os parâmetros de percentual de DNA na cauda demonstram diretamente a relação entre dano celular e fragmentação do material genético, indicando a descompactação do nucleóide e espalhamento de seus fragmentos (Di PAOLO, 2008).

Como o nível de toxicidade causado pelos escleródios atinge semelhança com a DXR, deve-se considerar que é essa uma das formas de atuação desse agente antineoplásico, no que se refere a morte celular, tendo como objetivo matar as células cancerosas. Desta forma essa toxicidade tem como interesse a atividade farmacológica do composto. Como forma de atuação, a Doxorubicina é potente causadora de lesões e morte celular formando radicais que geram danos nas macromoléculas celulares durante uma situação de desequilíbrio, comumente chamada 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, desenvolvimento de tumores e degeneração celular (AMES, 1993; CERUTTI, 1994; DUTHIE et al., 1996; ROY e KULKARNI, 1996; RUEFF et al., 1993; SHAMBERGER et al., 1973; WITZUM, 1994).

Esse mesmo resultado foi observado para o Tail Moment onde as porcentagens tiveram um aumento, respectivamente, de 166%, 380% e 271% (linfócitos) e 660%, 639% e 429% (fígado) para os respectivos grupos tratados com o extrato. O Tail moment é um parâmetro obtido por equações entre as proporções do comprimento da cauda e da intensidade de DNA na mesma. Em comparação aos demais os parâmetros de análise de cauda de ele é reconhecido por fornecer resultados de menor variabilidade e maior consistência nos dados sobre as extensões de danos no DNA (FAIRBAIRN, 1995).

Sobre o comprimento da cauda (Tail Length), as análises de cometas de sangue periférico demonstraram um aumento de 106,34%; 174,77% e 131,90%, respectivamente nos três grupos tratados com ração fúngica. Quanto a análise desse parâmetro no fígado, interessante, os grupos de tratamento foram iguais ao grupo controle negativo NaCl 0,9% m/v. Considerando-se que esta técnica inclui informações sobre a distribuição de danos nos tecidos alvo segundo Fairbairn (1995), este resultado sugere uma indução de quebras de DNA menos intensa neste órgão se comparado com o teste em sangue periférico. Esse resultado também remete a observação de danos gerados pelo fungo nos nucleóides das células hepáticas com formação de fragmentos maiores. Isso se explica pelo fato de que durante a corrida de eletroforese, há uma migração do material genético para o pólo positivo da cuba, promovendo o arraste das partículas que darão origem à cauda do cometa. Neste caso observa-se que houve fragmentação devido a presença de resultados positivos nas análises de %DNA na cauda, porém pode-se destacar uma corrida menor do material, refletida no encurtamento de cauda. Assim, sugere-se uma quebra menos intensa formando fragmentos maiores, causando, conseqüentemente uma cauda mais curta, porém com intensidade de

DNA, observada nos outros parâmetros avaliados (Di PAOLO, 2006; SPEIT et al.,1996) (Figuras 12 e 13).

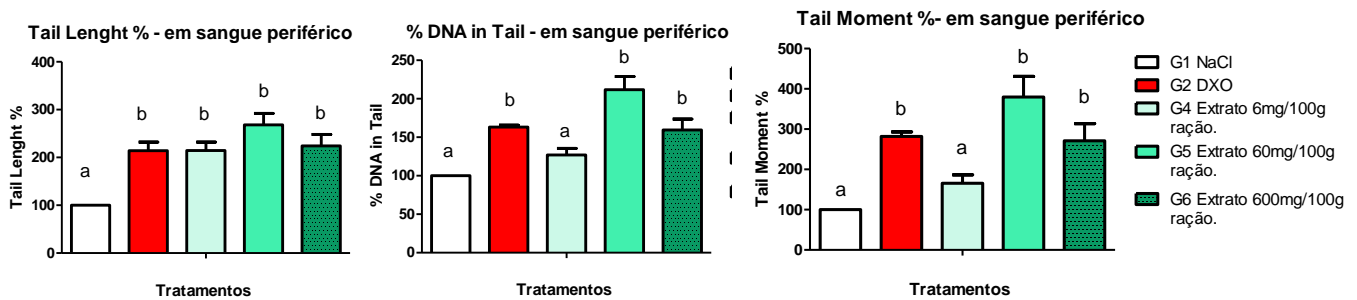


Figura 12-A Tail Length – comprimento da cauda, B- %DNA na cauda, C- Tail Moment de cometas em sangue dos grupos (n=11) G1:NaCl: 0.9% 10 mL/ kg p.c (veículo); G2: DXO: doxorubicina 30 mg/ kg p.c; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. DXR e NaCl 0,9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.

Fonte: Da autora

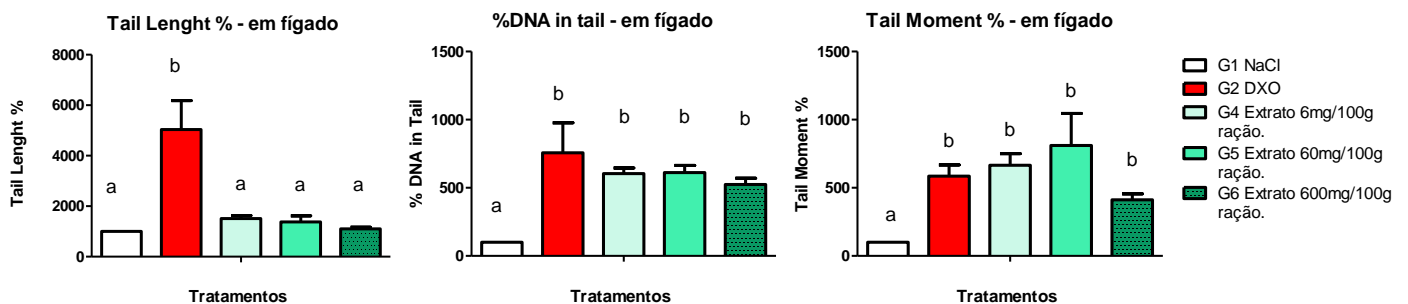


Figura 13- A- Tail Length em Fígado– comprimento da cauda, B- %DNA na cauda, C- Tail Moment de cometas dos grupos; n=11, G1:NaCl: 0.9% 10 mL/kg p.c.; G2: DXO: doxorubicina 30 mg kg⁻¹ p.c; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.

Fonte: Da autora.

Os resultados do teste do cometa deste experimento diferem dos apresentados por Roque (2014) e Azevedo (2016), os quais não observaram danos causadas pelo extrato aquoso do fungo em linfócitos de sangue periférico. Essas diferenças provavelmente são relativas às diferenças entre os solventes utilizados durante a extração. Como já discutido na Figura 9 pela análise em CCD, observa-se uma maior extração de compostos dos escleródios em acetato de etila, realizado no presente trabalho, em comparação a extração em água (Roque, 2014).

4.3.2 Teste do Micronúcleo e Apoptose

A validação deste ensaio *in vivo* foi demonstrada pela resposta do grupo positivo/DXR, o qual exibiu aumentos significativos na frequência de MNPCE (12,4% de células micronucleadas) quando comparada ao grupo de controle negativo/NaCl 0,9% (1,5% de células micronucleadas). Da mesma forma realizada para o teste do cometa, para analisar o efeito mutagênico dos escleródios do fungo *S. sclerotiorum* (Figura 13-A), foram comparados os grupos (G4, G5, G6) que receberam diferentes concentrações dos extratos (6 mg/100 g ração, 60 mg/100 g ração e 600 mg/100 g ração) e NaCl 0,9% (m/v) com o grupo controle negativo (G1).

Observou-se que a exposição dos animais às diferentes concentrações da ração fúngica grupos (G4, G5 e G6) induziram um aumento na frequência de micronúcleos (MNPCE) (Tabela 7), correspondendo a 186,95%; 147,82%; 239,13%, respectivamente, gerados de modo superior ao controle negativo (G1, 100%). Demonstra-se, assim, que há efeito mutagênico sobre células da medula óssea de camundongos.

Tabela 7- Efeitos do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados.

Grupos/Tratamento	Cells	NCE	PCE	PCE/NCE	MNPCE	MN(%)	Aumento de MNPCE (%)
G1/ NaCl – Controle Negativo	11000	4585	6415	1,39	23	1,15*	-
G2/DRX – ControlePositivo	11000	4127	6875	1,66	248	12,40*	-
G4/ NaCl + RF 6 mg/100g	11000	4901	6099	1,24	43	2,15*	186,95**
G5/ NaCl + RF RF 60mg/100g	9940	3871	6069	1,56	34	1,70*	147,82**
G6/NaCl + RF 600 mg/100g	11000	4657	6343	1,36	55	2,75*	239,13**

Fonte: Da autora

*DXR: doxorubicina 30 mg/ kg¹ p.c.; NaCl: 0.9%10 mL/ kg¹p.c.; NCE: eritrócito normocromático; PCE: eritrócito policromático; MN: células micronucleadas. 2,000 células analisadas/animal. RF = ração fúngica de *S. sclerotiorum* nas concentrações de 6, 60 e 600mg/100g ração** % aumento de MNPCE com relação às lesões espontâneas G1 (controle negativo). DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.

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

Os resultados positivos obtidos com o Teste de Micronúcleo evidenciam a mutagenicidade da substância avaliada. Esses resultados foram compatíveis com os de Roque et al. (2014) utilizando extrato aquoso desses escleródios. Esses autores ainda acrescentaram que esse extrato aquoso foi também capaz de potencializar os efeitos genotóxicos e citotóxicos do agente intercalante e clastogênico (DXR). Entre esses possíveis efeitos potencializados os autores consideram 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.

Com relação ao teste de micronúcleo de cólon, observa-se que esse tecido foi escolhido devido ao fato de as células epiteliais intestinais serem as primeiras a ter contato com os resultados da ingestão alimentar e compostos neles presentes. Além disso, estas células possuem grande capacidade de turnover, facilitando a detecção de efeitos clastrogênicos e aneugênicos em compostos químicos não detectados pelo teste de micronúcleo de medula (VANHAUWAERT et al., 2001).

A identificação de efeito lesivo em enterócitos do cólon pela presença de micronúcleos (Figura 14-B) foi realizada comparando-se os grupos experimentais (G4, G5, G6), que consumiram a ração com diferentes concentrações do fungo + NaCl 0,9% m/v com o controle negativo (G1) e com o grupo controle positivo (G3) que recebeu 30 mg kg⁻¹ p.c. de DMH.

A validação deste ensaio *in vivo* foi dada pela resposta do grupo positivo/DMH, o qual exibiu aumentos significativos na frequência de MN (0,75% de células micronucleadas) quando comparada ao grupo de controle negativo/NaCl (0,35% de células micronucleadas).

Observou-se que a exposição dos animais às diferentes concentrações da ração fúngica grupos (G4, G5 e G6) também induziram um aumento na frequência de micronúcleos nos colonócitos (Tabela 8), apresentando um aumento de 202,63%; 173,68% e 223,68% respectivamente, quando comparados com o controle negativo (G1). Estes resultados confirmam o efeito mutagênico do fungo *S. sclerotiorum* também sobre as células do epitélio intestinal em todas as concentrações analisadas.

Tabela 8- Efeitos do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em frequências de colonócitos micronucleados.

Grupos/Tratamentos	Nº células	Total Criptas	Células/criptas	Total cells micronucleadas	% MN	Aumento de MN (%)
G1/NaCl	11.000	305	36,07	38	0,35	–
G3/DMH	11.000	316	34,81	83	0,75	–
G4/RF 6mg/100g	11.000	326	33,74	77	0,70	202,63**
G5/RF 60mg/100g	11.000	312	35,26	66	0,60	173,68**
G6/RF 600mg/100g	11.000	296	37,16	85	0,77	223,68**

Fonte: Da autora.

*DMH: dimetilhidrazina 30 mg/ kg p.c.; NaCl: 0.9%10 mL/ kg p.c (veículo); RF: ração fúngica de *S. sclerotiorum* nas concentrações de 6, 60 e 600 mg/100g ração. MN: células micronucleadas. 1000 células analisadas/animal. ** % aumento de MN com relação às lesões espontâneas G1. DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.

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

O aumento no número de micronúcleos observado em colonócitos e eritrócitos policromáticos de medula óssea significa que os danos causados pelos escleródios de *S.*

sclerotiorum foram transmitidos para as células filhas durante a multiplicação celular. Esses danos foram previamente constatados pelo teste do cometa, os quais alcançaram uma magnitude comparável ao do agente DXR, e perpetuaram-se como mutações por superar a capacidade do sistema de reparo. A ingestão de compostos mutagênicos quando associada a outros produtos químicos de uma dieta variada, com o uso de medicamentos e a presença de enzimas pode causar a interferência em vias metabólicas endógenas e induzir ao longo do tempo uma atividade cancerígena (HODEK et al., 2009).

Quanto a apoptose, deve-se considerar que ela ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo a hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH; NAGASHREE, 2001).

A apoptose foi estudada no epitélio intestinal (Figura 14-C) por ser um evento de grande importância na erradicação de células que tenham sofrido danos no DNA devido a presença de compostos mutagênicos e/ou genotóxicos (VANHAUWAERT et al., 2001). Desequilíbrios na homeostase celular podem levar ao crescimento celular desordenado e desenvolvimento do câncer. A regulação dos processos de apoptose também tem sido associada a diferentes processos de oncogênese, incluindo iniciação, progressão e metástase. Além de estar relacionada a doenças autoimunes, Parkinson e Alzheimer (RAMI, 2008). Desta forma os resultados relativos a indução de apoptose são complementares aos demais testes que avaliaram uma resposta do extrato fúngico para a fase de iniciação do processo carcinogênico (RAMEL, 1984; TUCKER; PRESTON, 1996).

Portanto, um aumento na frequência de mitoses facilita a eliminação de células mutadas que poderiam progredir para malignidade após um período de latência (BARTEK & LUKAS, 2007).

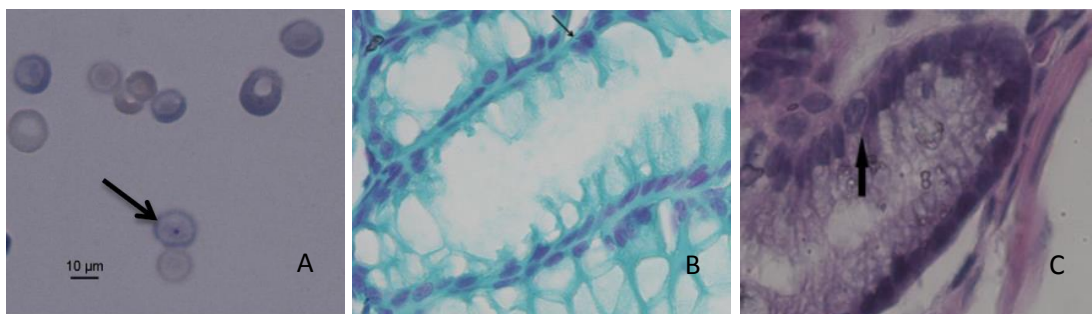


Figura 14- (A):Perfil de danos avaliados em eritrócitos na medula óssea 24horas após administração de 30 mg/ Kg p.c. de DXR. Eritrócito micronucleados em objetiva de 1000x. Fonte: Silva, 2014.(B): Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24 horas após administração de 30 mg/kg p.c. de DMH. Colonócitos micronucleados em objetiva de 1000x. (C): Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24 horas após administração de 30 mg/kg p.c. de DMH. Colonócitos micronucleados

em objetiva de 1000x.

Fonte: Da autora.

A sensibilidade deste ensaio *in vivo* foi demonstrada pela resposta do grupo positivo/DMH, o qual exibiu aumentos significativos na frequência de apoptoses (3,01% de células apoptóticas) quando comparada ao grupo de controle negativo/NaCl 0,9% (0,62% de células apoptóticas).

As três concentrações do extrato fungico estudadas apresentaram efeito tóxico/mutagênico comparados com o grupo negativo, apresentando aumento de 568,88%, 457,77% e 513,33%, respectivamente. O aumento do número de apoptoses indica que o fungo causou danos ao DNA e então, mecanismos de morte celular foram ativados. A severidade da indução é constatada pelo nível de apoptose ser em escala semelhante à droga indutora DMH (Tabela 9).

Tabela 9- Efeitos do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em frequências de Apoptoses

Grupos/Tratamentos	Total cells	Total Cells Apoptoticas	% Apoptose	Aumento de Apoptose (%)
G1/NaCl	7170	45	0,62	
G3/DMH	7960	240	3,01	533,33*
G4/RF S.S.6 mg/100g	8471	256	3,02	568,88*
G5/RF S.S.60 mg/100g	8210	206	2,50	457,77*
G6/RF S.S.600mg/100g	7343	231	3,14	513,33*

*DMH: dimetilhidrazina 30 mg kg/ p.c.; NaCl: 0.9% 10 mL/ kg p.c (veículo); RF: ração fúngica de *S. sclerotiorum* nas concentrações de 6, 60 e 600 mg/100g ração. * % aumento de apoptoses com relação às lesões espontâneas G1 (controle negativo) DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.

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

Fonte: Da autora.

Uma variedade de alterações que levam a um aumento da resistência a apoptoses foram descritas em diferentes células cancerígenas. Estas incluem uma diminuição na expressão de genes pró apoptóticos bem como diminuição da sinalização de receptores de morte. Nas terapias contra carcinomas, a apoptose apresenta abordagem central, desempenhando um papel crucial no progresso da proliferação celular, diferenciação, senescência e morte (MA, et al., 2014).

A ração fúngica causou danos genotóxicos observados pelo teste do cometa, mutações nos eritrócitos policromáticos e em células de contato intestinal, além de estímulo ao processo

de apoptose em enterócitos. Essa amplitude de resultados pode ser decorrente de compostos extraídos do fungo pelo acetato de etila, os quais de acordo com Azevedo et al. (2016) poderiam ser compostos alcalóides e cumarínicos como esclerolide. Li et al. (2014) acrescentam que isosclerones extraídas de outro fungo, *Aspergillus fumigatus*, também causaram efeito citotóxico em células cancerosas, inibindo mecanismos de transglicosilação envolvidos na proliferação e migração celular. Esses aspectos tornam esses escleródios compostos que devem ser alvo de mais estudo sobre esses efeitos lesivos, uma vez que os mesmos podem alcançar homens e animais por meio de alimentos e rações contaminadas, respectivamente. Desta forma, estes escleródios que podem facilmente alcançar consumidores por estarem presentes em alimentos comuns como o feijão, apresentam efeito tóxico mutagênico, mas também podem apresentar efeitos terapêuticos anticâncer, assim como Azevedo et al. expressou, amigo ou inimigo?

4.4.1 Análise de Estresse Oxidativo MDA

O desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres e é chamado de estresse oxidativo, podendo causar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e outras substâncias oxidáveis (LEITE, 2008). Este desequilíbrio, por sua vez, está associado a muitos fenômenos fisiológicos, patológicos e a processos adversos como carcinogênese de acordo com Dean *et al.* (1997) e Stahl (2000), a qual foi avaliada pelos *endpoints* do teste do cometa, micronúcleo e apoptose.

Para esta finalidade foi realizada a análise de MDA, avaliando-se uma das consequências mais estudadas do estresse oxidativo: a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, alterando a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (GOODE *et al.*, 1995; STAHL, 2000).

O índice de estresse oxidativo causado normalmente pelos radicais livres no organismo foi determinado pela peroxidação lipídica, que é considerada marcador importante do estresse oxidativo e, também, um dos principais fatores envolvidos no dano celular, causado por estes radicais (BALU *et al.*, 2005). O processo de peroxidação lipídica é iniciado pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado. Após seu início, este processo torna-se autocatalítico, terminando apenas quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos e oxigênio. Os principais produtos finais da lipoxidação são hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malonaldeído (MDA), que pode ser detectado em amostras biológicas e utilizado para avaliar o estresse oxidativo, como

proposto neste ensaio (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) (Figura 15).

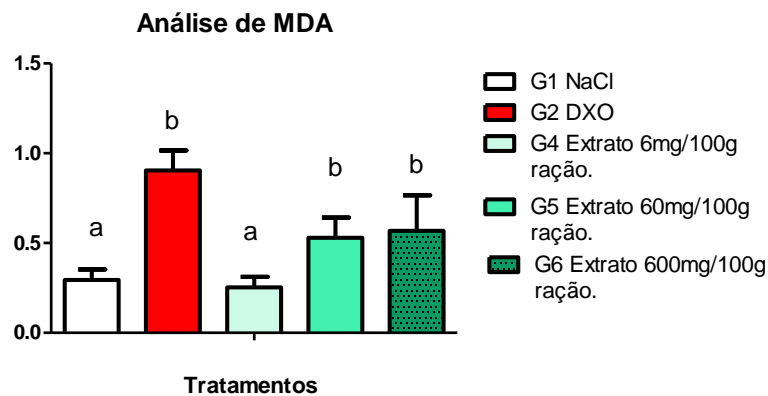


Figura 15- Quantificação de MDA em animais dos grupos (n=11) G1:NaCl: 0.9% 10 mL /kg p.c; G2: DXO: doxorubicina 30 mg/ kg p.c; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.

Fonte: Da autora.

As análises para o teste de MDA demonstraram que os grupos controles negativo e positivo, G1 e G2 respectivamente, apresentaram diferença significativa quanto aos seus resultados, reforçando a validação do teste.

Os grupos tratados com o extrato da ração fúngica foram iguais quando comparados com o controle positivo (G2), demonstrando os mesmos danos do agente anti-neoplásico DXR, com exceção da menor dose (G4), que foi semelhante ao controle negativo NaCl 0,9% m/v (G1). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Roque (2014), enfatizando os efeitos nocivos do fungo *S. sclerotiorum* sobre o fígado.

A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, degenerações celulares e câncer, sendo que os resultados observados na produção de malonaldeído confirmam as hipóteses sobre as propriedades tóxicas do fungo, complementando as análises do cometa, apoptose e micronúcleos realizadas. Alterações na estrutura e na permeabilidade celular são as principais consequências da peroxidação lipídica, com perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, com subsequente formação de produtos citotóxicos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). como o malonaldeído quantificado neste trabalho

4.4.2 Estresse Oxidativo GSH e GSSG

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 (RAHMAN, 2000). Para essa finalidade foram analisados os parâmetros glutathiona total, GSH e GSSG, os quais atuam sobre o ânion superóxido (O_2^-) que, sob a ação da superóxido dismutase (SOD), dá origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que 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).

Os resultados são apresentados na Figura 16, onde pode-se observar que não houve diferença entre os grupos que receberam DXR (positivo) e o com solução salina (negativo). Observa-se que um dos principais mecanismos de atuação anticâncer da DXR é justamente a indução de radicais livres e por consequência uma diminuição endógena de GSH, devido a maior mobilização e utilização das moléculas na forma reduzida, e concomitante aumento da forma oxidada gerada GSSG (RAHMAN, 2000). A DXR exerceu atividade o que foi confirmado pela fragmentação de DNA observada pelo teste do cometa e mutações observadas pelo teste do micronúcleo de medula, mas não foi visualizada pela alteração dos níveis das glutathionas. Esses mesmos resultados também foram observados por Venancio (2016) utilizando o mesmo protocolo e confirma a não visualização desses marcadores com os referidos procedimentos executados. Esse autor justifica a não observância dessas alterações oxidativas devido ao tempo de coleta dos materiais em 24 horas, considerando não ter havido modulação suficiente de biomarcadores do estresse oxidativo durante nesse tempo, o que talvez pudesse ocorrer em período maior que 24 horas. Pesquisas mostrando que a DXR também influencia processos como inibição enzimática, biogênese mitocondrial e geração e acumulação tecidual (DAMIANI et al. 2016; VENANCIO et al. 2016).

Ao contrário, em protocolos de genotoxicidade e mutagenicidade, Tice e colaboradores (2000) discutiram a recomendação da administração dos tratamentos em 24h e demonstraram que manifestações clínicas da administração de DXR podem ocorrer minutos após uma dose única desta droga (HORESTEIN, VANDER HEIDE, L'ECUYER, 2000). De fato, em trabalhos como Azevedo et al. (2007 e 2003) utilizando ciclofosfamida, que é um agente antineoplásico indireto com ativação hepática, quebras no DNA foram observadas no período de apenas 4 horas após o tratamento. Au e Hsu (1980) mostraram que tratamentos com DXR requeriam entre 5h e 24h para ativar a indução de aberrações cromossômicas em

células da medula e de 3 a 5 dias em tecido testicular. Se esta hipótese se aplicar a ação dos escleródios, pode-se dizer que houve tempo de recuperação celular e por isso os níveis das glutationas se normalizaram, mas mantendo-se os níveis de malonaldeído como o resultado do estresse oxidativo pela peroxidação lipídica.

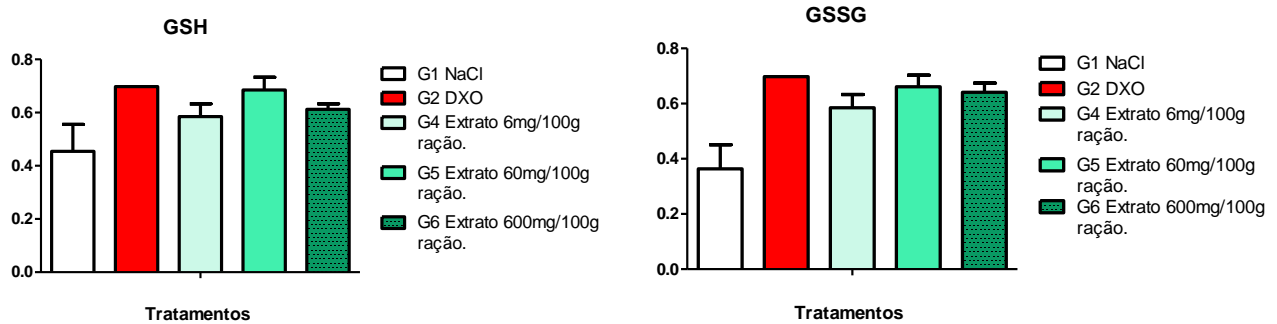


Figura 16- Quantificação de GSH (A) e GSSG (B) em animais dos grupos (n=11) G1:NaCl: 0.9% 10 mL /kg p.c; G2: DXO: doxorubicina 30 mg/ kg⁻¹ p.c; G4: ração fúngica *S. sclerotiorum* 6 mg/100g.; G5: ração fúngica *S. sclerotiorum* 60 mg/100g.; G6: ração fúngica *S. sclerotiorum* 600 mg/100g. DXR e NaCl: 0.9% foram fornecidos em 10 mL/kg p.c.
Fonte: Da autora.

5 CONCLUSÃO

Observou-se que os escleródios do fungo *S. sclerotiorum* apresentam uma composição complexa alcançando-se 56 alíquotas no teste de cromatografia de camada delgada e determinou-se o uso do acetato de etila para a produção do extrato, o qual apresentou maior retenção de compostos durante o teste. Quanto ao rendimento, o extrato de escleródios em acetato de etila apresentou 1,22% de extrato seco em relação à quantidade inicial de escleródios utilizada.

Quanto aos testes *in vivo* para avaliação da toxicidade dos escleródios, a partir dos resultados obtidos no teste do cometa, pode-se observar que os escleródios causaram danos ao DNA de linfócitos constatando sua genotoxicidade. Os testes de micronúcleo de medula óssea, micronúcleo de cólon e apoptose, demonstraram que a ração fúngica com doses experimentais do extrato de acetato de etila do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* exerceu efeitos lesivos observados pela presença de eritrócitos micronucleados, colonócitos micronucleados e aumento do número de apoptoses por meio de efeitos mutagênicos, que podem ser desde a quebra do DNA, quanto a alterações nas fibras do fuso ou rearranjos cromossômicos associados ou não a fragmentação do DNA. Estes resultados consolidam os resultados do cometa em sangue periférico e hepatócitos, indicando que houve perpetuação das mutações no material genético após a divisão celular. Esta exposição frequente a compostos mutagênicos pode dar início a um processo carcinogênico.

Quanto à análise de estresse oxidativo, observou-se um aumento de compostos citotóxicos nos animais que consumiram as duas maiores doses do extrato adicionado à dieta se comparados com os grupos controle, o que evidencia a toxicidade do material estudado.

Esses aspectos tornam os escleródios compostos que devem ser alvo de mais estudo sobre esses efeitos lesivos, uma vez que os mesmos podem chegar ao consumo alimentar de homens e animais por meio de alimentos e rações contaminadas, respectivamente.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (Conab). **Testes toxicológicos para produtos químicos**. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 9 set. 2011.

ANDERSON, D. et al. Flavonoids Modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. **Mutation Res.**, 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.

AU, W.W.; HSU, T. C. The genotoxic effects of Adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 79, n.4, p.351-361, 1980.

AZEVEDO L. et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem Toxicol.**, v. 41, p.1671-1676, 2003.

AZEVEDO L. et al. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) 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.

AZEVEDO L. et al. White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), friend or foe: Cytotoxic and mutagenic activities *in vitro* and *in vivo*. **Food Research International**. v. 80 p. 27-35, 2016.

BALU, M. et al. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. **Neurosci. Lett.**, v. 383, n.3, p.295-300, 2005.

BANNASCH, P. Preneoplastic lesion as end-points in carcinogenicity testing. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 689-95, 1986.

BARTEK, J., & LUKAS, J. DNA damage checkpoints: From initiation to recovery or adaptation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, p. 238-245, 2007.

BICK RODGER L.: **Hematology clinical and laboratory practice**, v. 1, p. 39-49; 1993.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letter**, v. 37, p. 47-151, 1987.

BOLTON, D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. p. 1 - 16, USA, 2005.

BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 278 – 299.

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 Saúde.. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação em Vigilância Sanitária** Resolução-RE nº 90, de 16 mar. 2004. Disponível em: <www.anvisa.com.br>. Acesso em: 29 mar. 2010.

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

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.

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

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

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.

COSTA, J. L. da S. Situação do mofo branco no feijão de inverno. In: Reunião nacional de pesquisa de feijão, 1996, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA-

CNPAF, v. 2, p. 251-253. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 70) 1997.

COTTON, P. *et al.* Characterization of PG2, an early endo PG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. **FEMS Microbiology Letters** v. 213, p. 239-244, 2002.

DAMIANI, R. M. *et al.* Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. **Archives of Toxicology**, Berlin, 2016.

DEAN, R.T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.**, v. 324, n.1, p.1-18, 1997.

DEVIENNE, K. F., RADDI, M. S. G., VARANDA, E. A., & VILEGAS, W. In vitro cytotoxicity of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Zeitschrift Fur Naturforschung — Section C Journal of Biosciences**, v. 57, p. 85–88, 2002.

DIAS, M. C., *et al.* Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarker of rat colon carcinogenesis. **Food and Chem. Toxicol.**, v.48, p.772-780, 2010.

Di PAOLO, C. **Aplicação do Ensaio do Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos *Centropomus paralellus* (Poey,1860), expostos à β -naftoflavona.** São Paulo, 2006.

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

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

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

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, p.11-18, 1997.

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

FENOGLIO-PREISER, C.M.; NOFFSINGER, A. Aberrant crypt foci: a review. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, p. 632-42, 1999.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 43, n.1 São Paulo Jan./Mar. ,1997.

FRAVEL, D. R., *et al.* Volatile Compounds Emitted by Sclerotia of *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Sclerotium rolfsii*. **J. Agric. Food Chem**, v. 50, p. 37-61, 2002.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis, **Int. J. Cancer** v. 124; p. 511–515, 2009.

GIESE, E. C. Produção De Beta-Glucanases Por *Trichoderma Harzianum Rifai* para Obtenção de Glucopolissacarídeos 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, C., *et al.*, (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres., v.2,p. 569-588, 2005.

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.

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 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, p. 203-212, 1999.

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

HORESTEIN, M. S. VANDER HEIDE, R. S. L'ECUYER, T. J. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v.71, n. 1-2, p. 436-444, 2000.

INDEX FUNGORUM, banco de dados para consulta de táxons fúngicos. Disponível em: <www.indexfungorum.org>, acessado em 10 set. 2011.

JORDE, L. B., CAREY, J. C., BAMSHAD, M. J., WHITE, R. L. **Genética Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 197 – 221.

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

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev. Bras. Nutr. Clín.**, v.18, n.2, p.60-65, 2003.

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

LI, Y., HIMAYA, S.W. A., DEWAPRIYA, P., KIM, H. J., & KIM, S. Anti-proliferative effects of isosclerone isolated from marine fungus *Aspergillus fumigatus* in MCF-7 human breast cancer cells. *Process Biochemistry*, v. 49(12), p. 2292–2298(2014).

LIMA, O.A.; Soares JB; Greco J.B. Galizzi, Caçado J.R.: **Métodos de laboratório**

aplicados à clínica, p. 21-9 a 21-12; 1992.

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.

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

MA, W.D., *et al.* Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. **Food and Chemical Toxicology**. v. 70, 2014.

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.

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**. 347(1-2):15-24, 2004.

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**.56. p. 185–229, 2004.

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

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

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.

PASTEUR Vallery-Radot, **Carta a Paul Dupuy**, 1939, citada por Hilaire Cuny, *Pasteur et le mystère de la vie*, Paris, Seghers, p. 53–54, 1963.

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 SM, SERVIOR RJ & MCDUGALL BM. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physicolody and regulation. **EnzMicrobTechnol.** v. 15: p. 178-190, 1993.

POZHARISSKI, K. M., LIKHACHEV, A. J., KLIMASHEVSKI, V. F., SHAPOSHNIKOV, J. D., **Adv Cancer Res.**; v. 30. p. 165-237. Review, 1979.

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

RAHMAN, I.; Mac NEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **European Respiratory Journal**, v.16, p. 534-554, 2000.

RAMI, A.; BECHMANN, I.; STEHLE, J.H. Exploiting endogenous anti-apoptotic

proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia, **Prog. Neurobiol.** v.85, p. 273–296, 2008.

RANGANATH, R.M.; NAGASHREE, N.R. Role of programmed cell death in development. **IntRev Cytol.** v. 202, p. 159-242, 2001.

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.

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

ROQUE, A.C.M. Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*): Estudo dos compostos químicos e da modulação de lesões de DNA e pré-neoplásicas in vivo. 2014. 70f Dissertação (Mestrado em Química) -Faculdade de Química, UNIFAL, Alfenas, 2014.

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

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.

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.

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.

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

TANAKA A., *et al.* Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoborneol, **Water Research** v. 30 n. 3. P. 759-761, 1996.

TAO, K.; *et al.* The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on

liver. **Medical Hypotheses**, v.71, p.730-736. 2008.

TICE R. R. 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, p 315–339, 1995.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Nova York: v.35, n.3, p. 206-221, 2000.

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.

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.

VANHAUWAERT, 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.

VENANCIO, V.P *In vitro* and *in vivo* activities of guajiru fruit (*Chrysobalanus icaco* L.) in oxidative stress, DNA damage, and inflammation biomarkers. 2016. (Dissertação de doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2016.

VENANCIO, V.P. *et al.* *Chrysobalanus icaco* L. fruits inhibit NADPH oxidase complex and protect DNA against doxorubicin-induced damage *in vivo*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Washington, 2016.

VIEIRA, P. M., VERONEZI, E., SILVA, C. R., & CHEN-CHEN, L. Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, p. 563–567, 2012.

VINOD, V., TIWARI, P. K., & MESHARAM, G. P. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the *in vitro* Ames salmonella/microsome assay and *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 931–93, 2011.

VIOLA, P. **Azeite de oliva e a saúde**. Madrid: Conselho Oleícola Internacional, 1997. 64p.

WICHERN, D.W., JOHNSON, R.C. **Applied multivariate statistical analysis**, 3 ed., New Jersey: Prentice Hall, 642 p.,1992.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1. ed. Chapecó: Argos, 2001. 500p.

WAESSNER, S.: **Técnicas em citologia hematológica**, 1990, p. 16-32.

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