



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Bruna Barros Fróes Cal

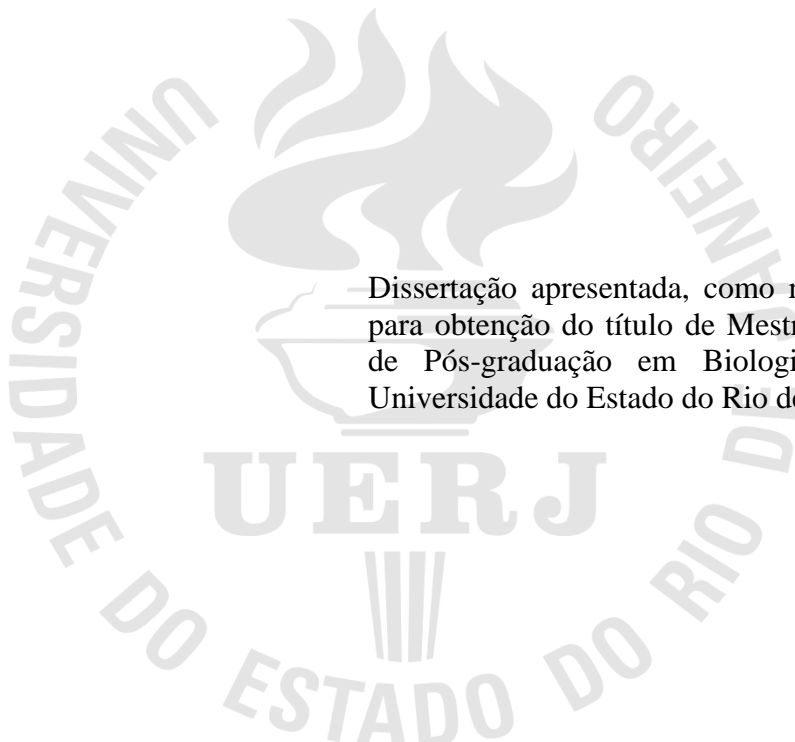
**Estudos da toxicidade e do potencial antineoplásico do extrato etanólico de  
folhas de *Petiveria alliacea* L.**

Rio de Janeiro

2017

Bruna Barros Fróes Cal

**Estudos da toxicidade e do potencial antineoplásico do extrato etanólico de folhas de  
*Petiveria alliacea* L.**



-Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo (*in memorium*)

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C141 Cal, Bruna Barros Fróes  
Estudos da toxicidade e do potencial antineoplásico do extrato etanólico de folhas de *Petiveria alliacea* L. / Bruna Barros Fróes Cal. – 2017.  
68 f. : il.

Orientador: Flávio José da Silva Dantas.

Coorientadores: Rachel Fatima Gagliardi Araujo, Adriano Caldeira de Araujo.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. *Petiveria alliacea* - Teses. 2. Citotoxicidade - Teses. 3. Plantas medicinais - Uso terapêutico - Teses. 4. Agentes antineoplásicos - Teses. I. Dantas, Flávio José da Silva. II. Araujo, Rachel Fatima Gagliardi. Araujo, Adriano Caldeira de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.664

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte

---

Assinatura

---

Data

Bruna Barros Fróes Cal

**Estudos da toxicidade e do potencial antineoplásico do extrato etanólico de folhas de  
*Petiveria alliacea* L.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de junho de 2017.

Banca Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Simões Gurgel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. José Luiz Mazzei da Costa

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à Deus, a minha família e aos amigos de trabalho que foram fundamentais nesta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o autor da minha vida, pelos sonhos que se concretizam e por ter me dado força para ultrapassar os obstáculos durante esta caminhada.

Aos meus pais Marco e Ângela e ao meu irmão Rafael, por todo amor, carinho, incentivo para que eu concluísse mais uma etapa e por serem um exemplo de vida e caráter. Sou eternamente grata a vocês.

Ao meu noivo Gabriel, por todo carinho, dedicação e compreensão durante esta etapa.

Ao Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo (*in memorium*), pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Radio e Fotobiologia, que me proporcionou esta experiência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas por ter me acolhido no laboratório desde a iniciação científica. Te agradeço pela amizade, compreensão, incentivo, paciência e por todo o ensinamento durante este percurso.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo que muito contribuiu com suas experiências, correções e sugestões durante o trabalho.

À bióloga Dra. Cláudia Ribeiro, pela amizade, ensinamentos, incentivo e por estar sempre disposta a me ajudar. Também agradeço por ter me recebido de “portas abertas” e ter me apresentado uma outra linha de pesquisa, que foi de grande importância para complementação deste trabalho.

À minha amiga Luana Brito do Nascimento de Araujo, por dividir a bancada e o fluxo de cada dia. Por toda cumplicidade, pelas conversas, por chorar e se alegrar comigo. Sem a sua ajuda e companheirismo seria mais árdua essa jornada. Sua colaboração e parceria foi essencial para a conclusão deste trabalho.

À minha amiga Letícia Oliveira da Cruz, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, paciência, por todo ensinamento na parte de cultura de células e por tornar nossos almoços mais longos e divertidos. Além da ajuda com os experimentos finais sem os quais eu não teria cumprido todos os objetivos propostos.

À Dra. Bianka de Oliveira Soares, pelos ensinamentos e pela ajuda no preparo dos extratos para este trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ellen Serri Motta, pelos ensinamentos durante a graduação e pela sua confiança em mim, quando se disponibilizou a me indicar ao Prof. Adriano.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos, pela contribuição na parte experimental, estatística e nas discussões de resultados do presente trabalho.

À técnica Msc. Marcia Betânia de Oliveira Nunes, pelas sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Luiz Mencialha e ao Prof. Dr. Adenilson Fonseca, pela viabilização de equipamentos para condução diferentes etapas da parte experimental.

À Isis Salvino, por toda a ajuda com a manipulação e interpretação dos resultados do citometro.

À equipe do Laboratório de Radio e Fotobiologia (Laís, Nemes, Verônica, Tais, Nathalia, Eduardo, Murata, Michele, Mariana, Gabriel e Mauricio) pelas sugestões e discussões ao longo desta jornada.

Aos professores do programa de Pós-graduação, que contribuíram para minha formação, compartilhando conhecimentos e experiências, que certamente serão muito bem aproveitados ao longo dessa nova fase.

A CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

CAL, Bruna Barros Fróes. *Estudos da toxicidade e do potencial antineoplásico do extrato etanólico de folhas de *Petiveria alliacea* L.* Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O uso dos recursos naturais é uma prática antiga, através da qual o homem busca aumentar sua chance de sobrevivência. Desta forma, o homem primitivo encontrou nas espécies vegetais muitos benefícios, inclusive a cura para muitas enfermidades. Consequentemente foram desenvolvidos vários estudos para garantir a segurança, e a eficácia no uso de plantas medicinais, como a espécie *Petiveria alliacea* Lineu., ou guiné, como é popularmente conhecida. Nesta espécie foi descrita diversas atividades biológicas, dentre elas, a atividade anti-neoplásica, que foi atribuída aos polissulfetos derivados do metabolismo secundário. O objetivo do presente estudo consiste em avaliar o potencial antineoplásico, citotóxico e mutagênico do extrato etanólico de folhas de *Petiveria alliacea* L. Amostras de folhas foram obtidas a partir do telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), onde são mantidas plantas envasadas, as quais foram coletadas em propriedades particulares de Niterói. O extrato foi preparado a partir de folhas imersas em etanol P.A. Células pulmonares humanas de carcinoma (linhagem A549) foram tratadas com diferentes concentrações desse extrato. Após o período de tratamento de 24 horas, a atividade citotóxica foi analisada pelos métodos de exclusão por azul de tripan, WST-1 e recuperação clonogênica. A dose que inibe 50% do crescimento celular foi encontrada, quando as células foram expostas ao extrato nas concentrações de 20 e 25 µg/mL. Essas concentrações foram testadas na linhagem normal de rim de macaco-verde (VERO). Nesta linhagem foi observado diminuição de 10% da viabilidade celular, através dos testes de inclusão por azul de tripan e WST-1. Já no ensaio de recuperação clonogênica, não foi observado diminuição estatisticamente significativa da capacidade mitogênica das células quando comparadas ao controle. Experimentos foram realizados para avaliar a taxa de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), através de citometria de fluxo utilizando o reagente DCFH-DA, onde o extrato apresentou-se antioxidante para ambas as linhagens testadas. O outro modelo biológico utilizado neste estudo foi à levedura *S. cerevisiae* FF18733 (selvagem) e CD138 (mutante). Ambas foram avaliadas quanto à fração de sobrevivência, crescimento, mutagênese (sistema de resistência a canavanina) e colônias *petites*. Os resultados indicam que a concentração de 10 e 7,5 µg/mL diminuem a viabilidade celular em 50% nas cepas FF18733 e CD138 respectivamente. No ensaio de crescimento as cepas foram expostas por 48h ao extrato de *P. alliacea*. Não foi observada diminuição significativa na cepa FF18733 quando comparada ao controle, já a cepa CD138 apresentou diferença significativa na taxa de crescimento. Entretanto, no ensaio de resistência a canavanina, o extrato mostrou-se mutagênico para ambas as cepas. Nos experimentos para avaliar a perda da função mitocondrial, foi observado que ambas as cepas apresentaram um aumento na taxa de colônias *petites*. Analisando os resultados observados em leveduras e linhagens celulares, observamos que em ambos os casos ocorreu uma alteração nas vias oxidativas que afetam o metabolismo mitocondrial, sugerindo que esta organela é mais afetada pelo extrato de *P. alliacea*. Sendo necessário estudos analisando a via de morte celular e a composição química do extrato.

Palavras-chave: Guiné. Citotoxicidade. Mutagenicidade. *Saccharomyces cerevisiae*. A549. VERO.



## ABSTRACT

CAL, Bruna Barros Fróes. *Studies of the toxicity and antineoplastic potential of the ethanolic extract of *Petiveria alliacea* L.* Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The use of natural resources is an ancient practice, through which man seeks to increase his chance of survival. In this way, primitive man found in the vegetable species many benefits, including the cure for many diseases. Consequently, a number of studies have been developed to ensure the safety and efficacy of medicinal plants, such as the species *Petiveria alliacea* Lineu., Or guinea, as it is popularly known. In this species, several biological activities have been described, among them, anti-neoplastic activity, which was attributed to polysulfides derived from secondary metabolism. The objective of the present study is to evaluate the antineoplastic, cytotoxic and mutagenic potential of the ethanolic extract of *Petiveria alliacea* L. Leaf samples were obtained from the Plant Biotechnology Nucleus (NBV) at the State University of Rio de Janeiro (UERJ), where bottled plants are kept, which were collected in private properties of Niterói. The extract was prepared from leaves immersed in ethanol P.A. Human lung carcinoma cells (line A549) were treated with different concentrations of this extract. After the 24-hour treatment period, the cytotoxic activity was analyzed by trypan blue exclusion, WST-1 and clonogenic recovery methods. The dose inhibiting 50% of cell growth was found when cells were exposed to the extract at concentrations of 20 and 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . These concentrations were tested on normal monkey green kidney (VERO) lineage. In this lineage, a 10% decrease in cell viability was observed through the inclusion tests by tripan blue and WST-1. In the clonogenic recovery trial, there was no statistically significant decrease in the mitogenic capacity of the cells when compared to the control. Experiments were carried out to evaluate the rate of production of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry using the DCFH-DA reagent, where the extract was an antioxidant for both tested strains. The other biological model used in this study was yeast *S. cerevisiae* FF18733 (wild) and CD138 (mutant). Both were evaluated for the fraction of survival, growth, mutagenesis (canavanine resistance system) and petites colonies. The results indicate that the concentration of 10 and 7.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  decrease the cell viability in 50% in the strains FF18733 and CD138 respectively. In the growth assay the strains were exposed for 48 h to the *P. alliacea* extract. No significant decrease was observed in strain FF18733 when compared to the control, since the CD138 strain showed a significant difference in the growth rate. However, in the canavanine resistance test, the extract was mutagenic for both strains. In the experiments to evaluate the loss of mitochondrial function, it was observed that both strains presented an increase in the rate of petites colonies. Analyzing the observed results in yeasts and cell lines, we observed that in both cases a change occurred in the oxidative pathways that affect the mitochondrial metabolism, suggesting that this organelle is more affected by the extract of *P. alliacea*. It is necessary to study the cell death pathway and the chemical composition of the extract.

Keywords: Guine. Cytotoxicity. Mutagenicity. *Saccharomyces cerevisiae*. A549. VERO.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários vegetais .....	17
Figura 2 -	Imagem ilustrativa da espécie <i>Petiveria alliacea</i> L.	18
Quadro 1 -	Cepa de levedura utilizada no presente trabalho.	30
Figura 3 -	Fração de sobrevivência da linhagem celular A549, tratada com extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	35
Figura 4 -	Fração de sobrevivência da linhagem celular VERO tratada com extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	36
Figura 5 -	Fração de sobrevivência da linhagem celular A549 tratada com extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	37
Figura 6 -	Fração de sobrevivência da linhagem celular VERO tratada com extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	38
Figura 7 -	Avaliação da capacidade mitogênica da linhagem celular A549 tratada com o extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	39
Figura 8 -	Avaliação da capacidade mitogênica da linhagem celular VERO, tratada com o extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	40
Figura 9 -	Detecção da taxa de produção de espécies reativas oxigênio na linhagem A549 tratada com o extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	41
Figura 10 -	Detecção da taxa de espécies reativas oxigênio na linhagem VERO, tratada com o extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> .	42
Figura 11 -	Fração de sobrevivência da cepa FF18733 de <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> .	43
Figura 12 -	Fração de sobrevivência da cepa CD138 de <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> .	44
Figura 13 -	Crescimento da cepa FF18733 <i>S. cerevisiae</i> (selvagem) na presença do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> .	45

Figura 14 -	Crescimento da cepa <i>S. cerevisiae</i> CD138 (mutante) na presença do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> .	46
Figura 15 -	Frequência de mutagênese espontânea e induzida pela exposição ao extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> da cepa <i>S. cerevisiae</i> FF18733 (selvagem).	47
Figura 16 -	Frequência de mutagênese espontânea e induzida pela exposição ao extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> da cepa CD138 <i>S. cerevisiae</i> (mutante).	48
Figura 17 -	Frequência de colônias <i>petites</i> após a exposição ao extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> da cepa FF18733 <i>S. cerevisiae</i> .	49
Figura 18 -	Frequência de colônias <i>petites</i> após a exposição ao extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> da cepa CD138 <i>S. cerevisiae</i> .	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAN <sup>R</sup>	Resistente a canavanina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbon
DCF	2', 7' - diclorofluoresceína
DCF-DA	2'-7' diclorodihidrofluorescina-diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fapy	2,6-diamino-4-hidroxi-5-(metil)formamidopirimidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HRJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FS	Fração de Sobrevivência
IC <sub>50</sub>	Concentração que reduz a viabilidade em 50%
mtDNA	DNA mitocondrial
PBS	Tampão fosfato salino
RPM	Rotação por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SFB	Soro fetal bovino
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	14
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	14
1.1	<b>Plantas medicinais .....</b>	14
1.2	<b>Metabólitos Secundários .....</b>	15
1.3	<b><i>Petiveria alliacea</i> L .....</b>	17
1.3.1	<b><u>Constituintes Químicos.....</u></b>	19
1.3.2	<b><u>Atividades biológicas .....</u></b>	19
1.4	<b>Modelos biológicos em estudo .....</b>	21
1.4.1	<b><u>Linhagem celular de carcinoma pulmonar A549 .....</u></b>	21
1.4.2	<b><u>Linhagem celular de rim de macaco-verde (VERO).....</u></b>	21
1.4.3	<b><u><i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</u></b>	22
1.5	<b>Justificativa .....</b>	23
2	<b>OBJETIVOS.....</b>	24
2.1	<b>Geral.....</b>	24
2.2	<b>Específicos.....</b>	24
3	<b>MATERIAIS E METODOS.....</b>	25
3.1	<b>Material Botânico.....</b>	25
3.1.1	<b><u>Preparo do extrato vegetal.....</u></b>	25
3.2	<b>Obtenção da Linhagem celular de carcinoma pulmonar (A549) e da linhagem de rim de macaco-verde (VERO).....</b>	25
3.3	<b>Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma pulmonar (A549) e da linhagem de rim de macaco-verde (VERO).....</b>	26
3.3.1	<b><u>Tratamento das células com o extrato etanólico de folhas de <i>P.</i> <i>alliacea</i>.....</u></b>	26
3.3.1.1	<b><u>Ensaio de viabilidade de exclusão por azul de tripan.....</u></b>	27
3.3.2	<b><u>Ensaio de viabilidade por WST-1.....</u></b>	27
3.3.3	<b><u>Recuperação clonogênica.....</u></b>	28
3.3.4	<b><u>Deteção de espécies reativas de oxigênio por DCF-DA.....</u></b>	29
3.4	<b>Cepa FF18733 e CD138 de <i>Saccharomyces erevisiae</i>.....</b>	29
3.4.1	<b><u>Obtenção das culturas de <i>S. cerevisiae</i>.....</u></b>	30
3.5	<b>Efeito do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> na sobrevivência da cepa de</b>	

	<i>S. cerevisiae</i> .....	30
3.6	<b>Efeito do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> no crescimento de <i>S. cerevisiae</i></b> .....	31
3.7	<b>Avaliação da potencialidade mutagênica do extrato etanólico de <i>P. alliacea</i></b> .....	31
3.8	<b>Avaliação de perda da atividade mitocondrial em presença do extrato de <i>P. alliacea</i> em <i>S. cerevisiae</i></b> .....	32
3.9	<b>Análise estatística</b> .....	32
4	<b>RESULTADOS</b> .....	34
4.1	<b>4.1. Experimentos na Linhagem celular de carcinoma pulmonar (A549) e rim de macaco-verde (VERO)</b> .....	34
4.1.1	<u>Exclusão por azul de tripan A549</u> .....	34
4.1.2	<u>Exclusão por azul de tripan VERO</u> .....	35
4.1.3	<u>Ensaio de viabilidade WST-1 na linhagem A549</u> .....	36
4.1.4	<u>Ensaio de viabilidade WST-1 na linhagem VERO</u> .....	37
4.1.5	<u>Recuperação Clonogênica com a linhagem A549</u> .....	38
4.1.6	<u>Recuperação Clonogênica com a linhagem VERO</u> .....	39
4.1.7	<u>Produção de espécies reativas oxigênio na linhagem A549</u> .....	40
4.1.8	<u>Produção de espécies reativas oxigênio na linhagem VERO</u> .....	41
4.2	<b>Experimentos com as cepas FF18733 e CD138 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	42
4.2.1	<u>Estudos para avaliar a sobrevivência da cepa FF18733 após exposição ao extrato de <i>P. alliacea</i></u> .....	42
4.2.2	<u>Estudos para avaliar a sobrevivência da cepa CD138 após exposição ao extrato de <i>P. alliacea</i></u> .....	43
4.2.3	<u>Estudo para avaliar a crescimento na cepa FF18733 de <i>S. cerevisiae</i> em presença do extrato de <i>P. alliacea</i></u> .....	44
4.2.4	<u>Estudo para avaliar a crescimento na cepa CD138 de <i>S. cerevisiae</i> em presença do extrato de <i>P. alliacea</i></u> .....	45
4.2.5	<u>Estudo para avaliar mutagênese na cepa FF18733 de <i>S. cerevisiae</i> em presença do extrato de <i>P. alliacea</i></u> .....	46
4.2.6	<u>Estudo para avaliar mutagênese na cepa CD138 de <i>S. cerevisiae</i> em presença do extrato de <i>P. alliacea</i></u> .....	47

4.2.7	<u>Estudo para avaliar a frequência de colônias <i>petites</i> na cepa FF18733 de <i>S. cerevisiae</i> na presença do extrato de <i>P. alliacea</i>.....</u>	48
4.2.8	<u>Estudo para avaliar a frequência de colônias <i>petites</i> na cepa CD138 de <i>S. cerevisiae</i> na presença do extrato de <i>P. alliacea</i>.....</u>	49
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
	<b>APÊNDICE</b> - Preparo de meios e soluções .....	64

## **INTRODUÇÃO**

### **1 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **1.1 Plantas medicinais**

O uso dos recursos naturais é uma prática antiga, através da qual o homem busca aumentar sua chance de sobrevivência. Desta forma, o homem primitivo encontrou nas espécies vegetais muitos benefícios, desde melhorias em suas construções até a cura para muitas enfermidades. Assim, a utilização das plantas, representou um marco histórico na evolução da civilização (GIRALDI; HANAZAK, 2010).

Os primeiros europeus que chegaram ao Brasil encontraram uma grande diversidade de espécies em uso pelos povos indígenas que aqui viviam. O conhecimento sobre a flora acabou se difundindo, e o poder curativo das espécies vegetais foi transferido às gerações posteriores (DEVIENNE et al., 2004). Sendo assim, o consumo das plantas com propriedades medicinais, se intensificou ao longo do tempo passando de formas mais simples como chás, infusões e garrafadas, até formas mais sofisticadas, fabricadas industrialmente (LORENZI; MATOS, 2008). Devido ao grande interesse da indústria farmacêutica, cada vez mais substâncias com atividades bioativas têm sido identificadas (FOGLIO et al., 2006).

No século XVI, foram realizadas as primeiras extrações de produtos bioativos a partir de material vegetal. Porém, somente no século XVIII teve início a identificação destas substâncias. Entretanto, estima-se que apenas dez por cento da flora tenha sido quimicamente e farmacologicamente investigada, em função da enorme diversidade em termos de estruturas, propriedades físico-químicas, e biológicas dos metabólitos secundários presentes nos vegetais (RATES et al., 2001; RUFFA et al., 2002).

A biodiversidade vegetal do Brasil é rica em espécies que podem ser fontes de substâncias biologicamente ativas. O território brasileiro possui cerca de 60.000 espécies de angiospermas catalogadas, e apenas 8% tiveram a composição química definida e, destas, 1.100 espécies foram estudadas em relação às suas propriedades medicinais (BARREIRO; BOLZANI, 2009; GADELHA et al., 2013).



Em 2006, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que 80-85% da população dos países em desenvolvimento utilizavam plantas ou seus derivados no cuidado básico com a saúde. Dentre algumas das espécies de uso medicinal estão: *Peumus boldus* Molina (boldo), indicada para má digestão, *Calendula officinalis* L. (calêndula) e *Matricaria recutita* L. (camomila), utilizadas como anti-inflamatório e antisséptico; *Mentha* sp (hortelã), usada como expectorante; *Cassia angustifolia* Vahl (sene), utilizada como laxante; *Aloe vera* (babosa), usada no tratamento de queimaduras e *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), indicada como expectorante e antiplasmódico (ANVISA, 2016).

As plantas medicinais são utilizadas tanto nas zonas urbanas quanto nas zonas rurais, devido ao custo mais baixo, quando comparadas aos medicamentos alopáticos, que possuem um custo mais alto em função da industrialização. Além disso, em muitas comunidades o conhecimento sobre as plantas medicinais simboliza o único recurso terapêutico disponível (GUERRA; NORADI, 2001).

## 1.2 Metabólitos secundários

As plantas produzem uma variedade de compostos orgânicos que são divididos em metabólitos primários ou essenciais e secundários ou especiais. Os metabólitos primários são responsáveis pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais. Já os metabólitos secundários, aparentemente não possuem relação direta com o crescimento e desenvolvimento da planta, porém, geralmente possuem uma estrutura complexa, baixo peso molecular e atividades biológicas importantes. Além disso, estão presentes em baixas concentrações quando comparados aos metabólitos primários (SIMÕES, 2010). Outro aspecto pelo qual os metabólitos secundários se diferenciam dos metabólitos primários é a distribuição restrita no reino vegetal, isso significa que, certos metabólitos são específicos de uma determinada espécie vegetal ou grupo de espécies filogeneticamente relacionadas, enquanto os metabólitos primários são encontrados em todo reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os vegetais coevoluem com herbívoros e microorganismos patogênicos presentes nos ecossistemas. Neste processo, os produtos do metabolismo secundário, que conferem características de resistência a essas pragas, muitas vezes apresentam alta toxicidade para

animais (incluindo o Homem) e tornam-se ferramentas importantes para a defesa das plantas (TAIZ; ZEIGER 2009).

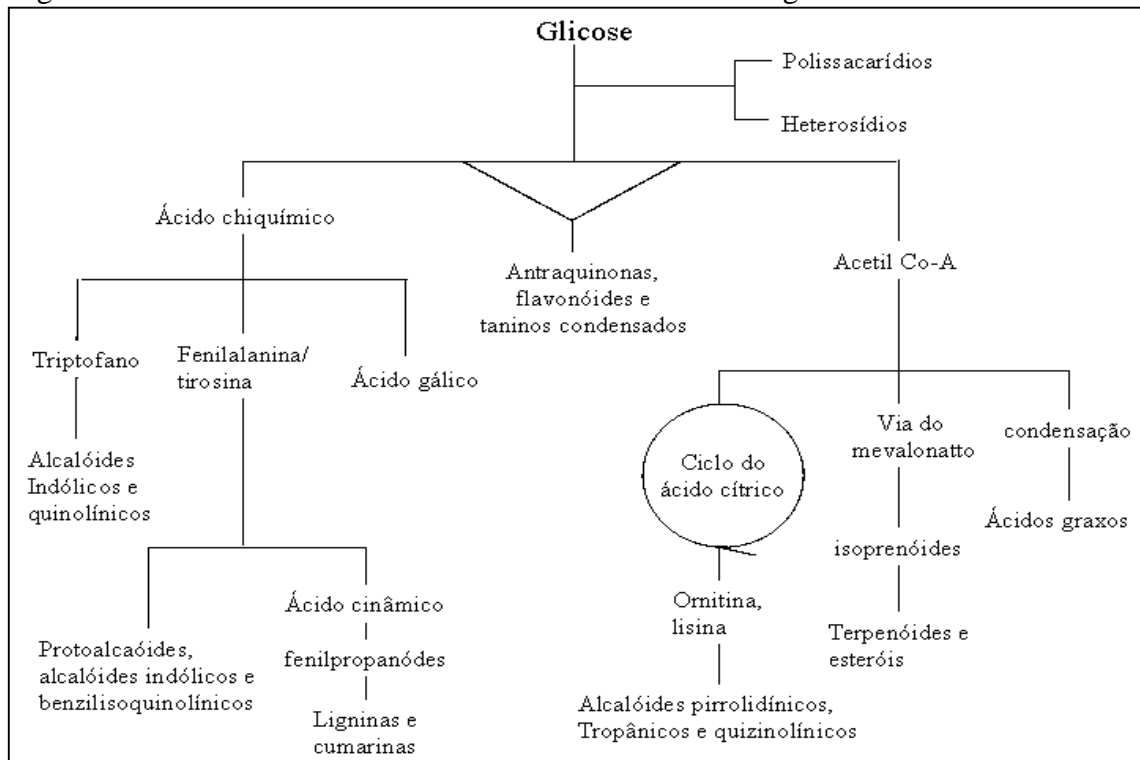
No passado, os metabólitos secundários foram considerados como produto de excreção dos vegetais. No entanto, sabe-se hoje, que muitas dessas substâncias estão envolvidas nos mecanismos de adaptação da espécie e resposta a estímulos do meio ambiente, contribuindo para uma boa interação com os diferentes ecossistemas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os produtos do metabolismo secundário apresentam diversas atividades biológicas, sendo agrupadas em três classes quimicamente distintas: compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos (Figura 1) (SIMÕES, 2010). Geralmente, os compostos nitrogenados são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio em seu anel heterocíclico, são derivados de aminoácidos aromáticos e, como sugere o nome, têm propriedades alcalinas. São encontrados em, aproximadamente, 20% das espécies de plantas vasculares. Dentre as diversas atividades biológicas deste grupo, uma delas é atuar na proteção contra herbívoros predadores devido à sua toxicidade e paladar amargo (SANTOS et al., 2010; TAIZ; ZEIGER 2009).

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas básicas, razão pela qual compõem um grupo bastante heterogêneo, são elas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico. Devido a sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam funções variadas nos vegetais, muitos agem na defesa contra patógenos e herbívoros, enquanto outros são responsáveis pelo odor e sabor agradáveis dos frutos e pela coloração das flores, que servem de atrativo para polinizadores ou dispersores de frutos. Atuam também na proteção das plantas contra os raios ultravioleta. Além disso, algumas espécies produzem compostos fenólicos com ação alelopática, inibindo o crescimento de outras plantas competidoras (FUMAGALI, 2008; SANTOS, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários, a maioria das substâncias dessa classe é insolúvel em água, e são sintetizados a partir de acetil-CoA ou de seus intermediários glicosilados. Atuam como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de espécies de polinizadores, na proteção contra desidratação e elevação de temperatura (JÚNIOR, 2003; SANTOS, 2010). Já foram descritas na literatura algumas atividades de interesse para a indústria farmacêutica, como por exemplo, ação carminativa (relaxamento da cárdia e expulsão do ar do trato gastrointestinal), ação antiespasmódica, anestésica e antisséptica (SANTOS et al., 2010).

Figura 1- Ciclo biossintético dos metabólitos secundários vegetais



Fonte: Simões et al., 2010

### 1.3 *Petiveria alliacea* Linné.

A espécie *Petiveria alliacea* Linné é nativa da floresta amazônica e das áreas tropicais das Américas do Sul, Central, Caribe e África (ANDRADE et al., 2012). É conhecida popularmente como apazoto-de-zorro, anamu, tipi ou hierba-de-gallinitas, na Argentina; guinea henweed na Jamaica; ipasina em Honduras; mucura, chanviro ou micura no Peru; Yvyné no Paraguai; ojúúsájú no Continente Africano; anamu ou jazmillo na Colômbia (CAMARGO, 2007). No Brasil, é conhecida como guiné, pipi, anamu, raiz-de-guiné, erva-de-guiné, erva-de-tipi, tipi, amansa-senhor, erva-de-alho, gorarema, iratacaca, gorana-timbó e mucuracaá (Figura 2) (BEZERRA, 2006; BLAINSK et al., 2010).

Figura 2- Imagem ilustrativa da espécie *Petiveria alliacea* L.



Fonte: OLIVEIRA, 2012.

Atualmente a espécie é encontrada em todos os estados do Brasil, principalmente em locais sombrios e úmidos. Sua floração predominante se dá entre novembro e março e sua frutificação, entre abril e maio (ABREU MATOS et al., 2011). *Petiveria alliacea* é conhecida até hoje como amansa-senhor, por ter sido utilizada pelos escravos a fim de proteger as mulheres do assédio de seus senhores. Poções à base desta planta eram administradas parceladamente, junto com o alimento, por tempo prolongado e a vítima morria envenenada (CAMARGO, 2007).

Apesar de seus efeitos tóxicos conhecidos desde o período colonial, *P. alliacea* é ainda hoje utilizada na medicina tradicional da América do Sul e Central para tratamento de muitas enfermidades, devido às suas atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária (GUEDES et al., 2009). Entretanto, poucos estudos estão disponíveis na literatura sobre os efeitos tóxicos, que poderiam respaldar sua utilização segura.

### 1.3.1 Metabólitos secundários de *P. alliacea* L.

Muitas substâncias biologicamente ativas já foram identificadas nas folhas e raízes de *P. alliacea*. O uso de preparados à base dessa espécie é muito comum na medicina tradicional da América do Sul e Central (GUEDES et al., 2009; SILVA et al., 2015a).

Muitas substâncias já foram caracterizadas, com distribuição variada nas diferentes partes da planta, incluindo esteroides, trans-N-metil-4-metoxiprolina, benzaldeído, isoarborinol, ácido benzoico,  $\beta$ -sitosterol, álcool ducosílico, benzoato de benzila, lupenona, acetato de isoarborinol, cinamato de isoarborinol,  $\alpha$ -friedelinol, tritiolaniacina, pinitol, ácido surônico, ácidos graxos, ácidos resinosos e os compostos sulfurados. Um óleo essencial inodoro de cor amarelada chamado de Petiverina também foi obtido na espécie (BEZERRA, 2006; KIM et al., 2006; LUZ et al., 2016).

A partir das folhas da *P. alliacea* foram identificados esteroides, flavonoides, terpenoides e polifenóis. Já nas raízes foram isolados polissulfetos, derivados da cisteína, como sulfóxidos e sulfetos. Dentre eles, destacam-se o dissulfeto de dibenzila (DDS), dissulfeto de dipropila e o trissulfeto de dibenzila (DTS), sendo que este último apresenta atividade antitumoral (BLAINSKI et al., 2010; KUBEC; KIM; MUSAH, 2002).

### 1.3.2 Atividades biológicas

A espécie *P. alliacea* é utilizada para diversos fins medicinais em função dos efeitos biológicos de seus constituintes, muitos já comprovados, como hipoglicemiante (DOMÍNGUEZ et al., 2002), antihelmíntico (ANDRADE et al., 2012), antimicrobiano (ANTUNES; FREITAS; ROYO, 2016; GUEDES et al., 2009), anti-inflamatório (LOPES-MARTINS et al., 2002), estimulante e antineoplásico (HERNANDES et al., 2014; LOWE et al., 2014).

Estudos sobre o efeito antimicrobiano e antifúngico de diversas partições de extratos das folhas de *P. alliacea* em *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida kefyr* mostraram que a fração

hidroalcoólica foi mais efetiva quando comparada ao tratamento com extratos metanólico, etanólico e hexânico (GUEDES et al., 2009).

A partir do conhecimento popular a respeito dos efeitos de *P. alliacea* sobre a melhora da memória, ratos Wistar receberam doses do extrato hidroalcoólico de folhas e foram avaliados pelo teste do labirinto. Os resultados mostraram uma melhora na memória e na aprendizagem ao longo do tempo (SILVA et al., 2015a).

Foi observado também que o extrato hidroalcoólico das raízes causa um atraso na implantação do zigoto no útero de ratas, porém, o extrato não apresentou atividade zigotóxica e abortiva. No entanto, outros estudos relatam que o extrato de sementes estimula a contração uterina, induzindo ao aborto (MAIA et al., 2010).

Os extratos aquosos de caule e folha vêm sendo utilizados na medicina tradicional da Colômbia como imunoestimulantes. Esta atividade foi avaliada através dos efeitos de extratos e suas frações orgânicas em células dendríticas (CD) de monócitos humanos. Essas células promovem uma resposta imune adaptativa, através da ativação de linfócitos T induzindo uma resposta efetora dependendo do nível de diferenciação. Esses estudos confirmaram que o extrato aquoso e as frações induziram alterações morfológicas e estimularam a expressão de CD86, indicando a maturação parcial das CD. Além disso, houve a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  (SANTANDER et al., 2012).

Extratos brutos de folhas de *P. allicea* preparados com hexano, clorofórmio e etanol foram usados na linhagem celular RBL (leucemia basofílica), para avaliar a atividade antialérgica através da quantificação do efeito inibitório sobre a liberação de  $\beta$ -hexosaminidase. Os resultados obtidos mostram que o extrato etanólico foi o único a apresentar este efeito, indicando a presença de significativa propriedade antialérgica (GUTIÉRREZ, 2005).

Também foi descrita atividade antitumoral para o extrato etanólico de *P. alliacea*. Este efeito tem sido atribuído à presença de polissulfetos no extrato, incluindo o DTS, identificado como um componente imunomodulatório e com atividade citotóxica e antiproliferativa em células SH-SY5Y (neuroblastoma), sendo capaz de induzir apoptose por via mitocondrial (SANTANDER et al., 2012). Além disso, o DTS inibiu o crescimento de algumas linhagens celulares tumorais, como a K562 (leucemia humana) e A375 (melanoma humano) (URUEÑA et al., 2008).

Porém, são necessários estudos sobre os potenciais tóxicos, uma vez que grande parte da população acredita que, por ser um produto natural, são seguros e não possuem efeitos colaterais.

#### 1.4 Modelos biológicos em estudo

##### 1.4.1 Linhagem celular de carcinoma pulmonar A549

A linhagem celular de carcinoma pulmonar A549 (células A549) foi isolada em 1972 por Giard DJ e colaboradores, através da cultura de tecido carcinomatoso pulmonar de um homem caucasiano de 58 anos de idade. É um tipo de célula epitelial, aderente e que possui um tempo de replicação de aproximadamente 22 horas, e vem sendo usada como modelo biológico em testes de atividade biológica. (ATCC, 2016).

Esta linhagem já tem o seu cultivo estabelecido no Laboratório de Rádio e Fotobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo o seu manuseio de baixo custo, rápido e fácil. Das linhagens disponíveis é uma das mais utilizadas para estudos *in vitro* de câncer de pulmão. E apesar da redução no diagnóstico de câncer de pulmão entre os homens na década de 80, entre as mulheres, esta redução só foi observada alguns anos depois, a partir do ano 2000. Ainda assim, o câncer de pulmão é o segundo mais diagnosticado em homens e mulheres, o que justifica a importância de serem realizados estudos com linhagens de carcinoma pulmonar como a A549 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

##### 1.4.2 Linhagem celular de rim de macaco-verde (VERO)

A linhagem de rim de macaco-verde (células VERO) é um modelo eucarioto, que possui uma alta taxa de proliferação celular mesmo sendo uma linhagem normal, além de apresentar um baixo custo de manutenção. Está entre os modelos eucarióticos mais utilizados

como controle para estudos com células tumorais (ABID-ESSEF et al., 2004; ALBA et al., 2016; AL-OQAIL et al., 2013; FRIÓN-HERRERA et al., 2015; GUO et al., 2016).

As células VERO foram isolada a partir do rim de um macaco africano adulto da espécie *Cercopithecus aethiops*, em março de 1962 por Y. Yasumura e Y. Kawakita na Universidade de Chiba em Chiba, Japão (ATCC, 2017). É um tipo de célula epitelial, aderente e que vem sendo utilizada como modelo biológico para estudos de toxicidade de substâncias químicas *in vitro* (FERNÁNDEZ FREIRE et al., 2005). Além disso, estudos para produção de vacinas utilizam essa linhagem, uma vez que esta atua como um excelente substrato (CHEN; CHEN, 2009).

#### 1.4.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae*, é um organismo eucarioto unicelular, anaeróbio facultativo, pertencente ao reino Fungi (AZEVEDO, 1997). A facilidade de cultivo, a caracterização genética, as fases de crescimento características e controláveis e o grande número de ferramentas moleculares disponíveis, tornam a *S. cerevisiae* um modelo biológico para diferentes estudos sobre perturbações ambientais, drogas terapêuticas, reparo de DNA, mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, avaliação de mutagênicos químicos, funções mitocondriais, recombinação genética, deslocamento intracelular de proteínas, controle do ciclo celular, degradação de proteínas, etc (MAGER; WINDERICKX, 2005; SILVA et al., 2015b; TERZIYSKA; WALTSCHEWA; VENKOV, 2000).

Uma vez que *S. cerevisiae* possui 40% de proteínas com sequências homólogas a proteínas humanas. E 31% dos genes reconhecidos como causadores de doenças em humanos, apresentam homólogos funcionais com genes de leveduras, tornando-se assim um modelo para estudo de doenças humanas (FOURY, 1997; MAGER; WINDERICKX, 2005; SLETTA et al., 2011).

*S. cerevisiae* é também descrita como sendo uma boa ferramenta em estudos para avaliar o potencial mutagênico e genotóxico de plantas medicinais (SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2015b). Os ensaios de mutagênese são feitos com base no gene *CAN1*. Este gene localiza-se no braço curto do cromossomo V, e codifica a proteína arginina permease (*CAN1p*) (OPEKAROVÁ et al., 1998). A permeabilidade celular controlada pelo gene *CAN1* é mediada por uma proteína associada à membrana celular. Durante o crescimento em meio



mínimo, a permease da arginina é o único sistema de transporte desse aminoácido para dentro da célula (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979). O transporte da arginina através da membrana plasmática em levedura é mediado pela enzima permease que é codificada pelo gene *GAP1* e pelo gene constitutivo altamente específico *CAN1*. O gene *CAN1* de *S. cerevisiae* possui grande afinidade e especificidade pelo aminoácido arginina e também apresenta afinidade pela lisina (MATIJÈKOVÁ; SYCHROVÁ, 1997).

Linhagens de levedura com o gene *CAN1* funcional, são sensíveis a um aminoácido análogo à arginina, que foi isolado da leguminosa *Canavalia ensiformis* na forma de L-canavanina. A L-canavanina é um potente inibidor do crescimento de muitos microrganismos, incluindo *S. cerevisiae* (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979). A célula produzindo a permease da arginina incorpora o aminoácido arginina e por consequência a L-canavanina, caso esteja presente no meio, o que provocará inibição do crescimento celular enquanto o gene *CAN1* estiver sendo expresso. Porém, se o gene *CAN1* estiver mutado, deixa de produzir a arginina permease, não permitindo a entrada da L-canavanina, fazendo com que ocorra crescimento celular após alguns dias de incubação (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979).

A detecção de atividades tóxicas e/ou mutagênicas, em leveduras, é uma medida prioritária para avaliar o risco no uso de diversos agentes que induzem lesões no DNA, inclusive aquelas que podem ser causadas por plantas medicinais (Silva et al., 2015).

Muitas lesões podem ser oxidativas, estando este estresse oxidativo associado a fenômenos biológicos degenerativos como o câncer e o envelhecimento (BOITEUX & RADICELLA, 2000). Contudo, as células possuem estratégias para combater especificamente a formação e permanência de lesões oxidativas no DNA. Uma delas é baseada em mecanismos enzimáticos de reparação de DNA, capazes de eliminar danos causados à estrutura do DNA e restabelecer a informação genética original (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Se as lesões não forem eliminadas, elas poderão conduzir à fixação de mutações. Estas mutações constituem uma das etapas do processo de carcinogênese, uma vez que elas podem alterar as funções celulares, conferindo um poder oncogênico ou inativando genes supressores de tumor.

## 1.5 Justificativa

Este trabalho visa ampliar os conhecimentos sobre *P. alliacea*, uma vez que grande parte da população que faz uso desta espécie não tem conhecimento dos seus possíveis efeitos tóxicos. Tornando-se necessário estudos mais aprofundados dos efeitos biológicos dos extratos dessa planta.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar os potenciais antineoplásico, citotóxico e mutagênico do extrato etanólico de folhas secas de *Petiveria alliacea* L.

### 2.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico de *P. alliacea* L. aplicando as metodologias de exclusão por azul de Tripan e WST-1 nas linhagens A549 e VERO.
- Analisar a potencialidade antineoplásica do extrato etanólico de *P. alliacea* L., através da metodologia de recuperação clonogênica nas linhagens A549 e VERO.
- Avaliar os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio em resposta ao extrato etanólico de *P. alliacea* L., nas linhagens A549 e VERO, através da metodologia de citometria de fluxo.
- Determinar a potencialidade citotóxica do extrato etanólico de *P. alliacea* L., através de curva de sobrevivência em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138.
- Determinar a influência do extrato etanólico de *P. alliacea* L., no crescimento de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138.
- Determinar a potencialidade mutagênica do extrato etanólico de *P. alliacea* L., através do ensaio de mutagênese (sistema de resistência à canavanina), em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138.
- Avaliar a perda de função mitocondrial, em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, através da quantificação do aumento na frequência de colônias *petites*.

### 3 MATERIAIS E METODOS

#### 3.1 Material botânico

Amostras de folhas foram obtidas a partir de plantas envazadas, mantidas no telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Essas plantas foram coletadas em propriedades particulares no município de Niterói, RJ (22°53'55" S e 43°05' 09.37" O elev 54m). Um exemplar representativo foi depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ 11.710). As folhas foram coletadas no mês de agosto de 2015 para o preparo dos extratos.

##### 3.1.1 Preparo do extrato vegetal

O extrato vegetal utilizado neste trabalho foi preparado no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) pertencente ao NBV/UERJ. As folhas de *P. alliacea* foram pesadas em balança de precisão para a obtenção do peso fresco que foi de 14 g, posteriormente lavadas em água corrente e desidratadas em estufa, por 24 horas, entre 45° e 50°C. O material seco (3,720 g) foi macerado com as mãos e colocado em frasco *Erlenmeyer* juntamente com 1L do solvente Etanol P.A. O frasco foi lacrado com parafilme e mantido por sete dias protegido da luz na capela de fluxo laminar. Na sequência, o material foi filtrado com auxílio de funil, e acrescentou-se mais 1L etanol ao frasco, o qual foi deixado por mais sete dias na capela. Foram realizadas três extrações a exaustão. Posteriormente, todo o material filtrado foi submetido à evaporação rotativa, a 50°C, para eliminação do etanol e obtenção do extrato bruto. O conteúdo final teve seu rendimento determinado (1g) e o extrato foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% em água. Em seguida o extrato diluído foi mantido em refrigeração no freezer (-19°C) até o momento dos experimentos.

#### 3.2 Obtenção da linhagem celular de carcinoma pulmonar (A549) e da linhagem de rim de macaco-verde (VERO)

As células selecionadas para o estudo foram gentilmente cedidas pela Doutora Alessandra Saliba, do Departamento de Patologia e Laboratórios da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ. Amostras previamente armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em água estéril a 37°C por 10 minutos. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> acrescido de 5 mL de meio F12 para a linhagem A549 e 5 mL de meio MEM para a linhagem VERO e incubados a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Ambos os meios nutritivos foram acrescidos de fungizona e gentamicina e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após este período foi feita a troca do meio de cultura. A composição das soluções e dos meios de cultura utilizados encontram-se descritas no Apêndice.

Para as subculturas, o meio nutriente foi retirado e as garrafas lavadas duas vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS). Em seguida foi adicionada solução de tripsina-EDTA (ver quadro 4 no apêndice) e as culturas foram incubadas a 37°C até que as células se soltassem da superfície da garrafa. A seguir foi acrescentado meio de cultura suplementado, para inativação da tripsina. Após homogeneização, as células foram transferidas para o tubo cônico e centrifugadas a 1500 rpm, 37°C, por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante o precipitado foi suspenso em 1mL de meio de cultura. Na sequência, o número de células foi quantificado com o auxílio de câmara de Neubauer e 1x10<sup>6</sup> células foram distribuídas em novas garrafas de cultura, as quais foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, (*American Type Culture Collection ATCC*, 2016).

### **3.3 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma pulmonar (A549) e da linhagem de rim de macaco-verde (VERO)**

#### **3.3.1 Tratamento das células com o extrato etanólico de folhas de *P. alliacea***

As células foram submetidas ao tratamento com tripsina-EDTA (ver item 3.2) e uma alíquota (10 µL) foi retirada e incubada, com 10 µL de azul de tripan (0,4%), para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram depositadas em placas de 24 poços, onde a concentração inicial foi de 1x10<sup>5</sup> células por poço, acrescidas de 500 µL de meio de cultura. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para a

ocorrência da adesão celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, a 37°C. Células da linhagem A549 foram incubadas com o extrato de folhas de *P. alliacea* em diferentes concentrações (10; 15; 20; 25; 30; 35; 40µg/mL) para determinação da viabilidade celular com azul de tripan. A partir dos resultados obtidos neste experimento foi calculada a IC<sub>50</sub> (concentração que reduz a viabilidade em 50%) e esta concentração foi testada na linhagem VERO. A doxorrubicina na concentração de 10nM foi utilizada como controle positivo por ser um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia de tumores sólidos (KIM et al., 2010). A fim de comprovar que os efeitos observados fossem provenientes unicamente dos componentes do extrato vegetal, foi realizado um controle com DMSO 1% em meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> (MORAES et al., 2011).

#### 3.3.1.1 Ensaio de viabilidade celular por exclusão em azul de tripan

Após o tratamento descrito no item 3.3.1, o sobrenadante foi recolhido e as células lavadas com PBS a 37°C. Em seguida, foi acrescentada a solução de Tripsina-EDTA, a 37°C, e, após 2 minutos, foi adicionado meio com SFB (10%), realizando-se fluxo-refluxo com o pipetador para que as células soltassem do fundo da placa. A suspensão celular, foi recolhida e centrifugadas (1500 rpm), por 10 minutos a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em meio de cultura, sendo retirada uma alíquota (10µL) de cada tubo e incubada com 10µL de azul de tripan (0,4%). A seguir, uma alíquota (10µL) foi aplicada na câmara de Neubauer, para contagem de células viáveis e inviáveis em microscópio óptico invertido. A distinção foi feita pela coloração, uma vez que as células viáveis excluem o corante, pois o mesmo não atravessa membranas íntegras, devido à permeabilidade seletiva das mesmas, e as inviáveis assumem a coloração azul, pois têm as suas membranas danificadas, ocorrendo o fluxo de corante para o interior das mesmas (FIDALGO et al., 2009). Foram feitos três experimentos em quintuplicata.

#### 3.3.2 Ensaio de viabilidade por WST-1

As células foram submetidas ao tratamento com tripsina (ver item 3.3.1) e uma alíquota (10 µL) foi retirada e incubada com 10 µL de azul de tripan (0,4%), para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram depositadas em placas de 96 poços, onde a concentração inicial foi de  $1 \times 10^5$  células por poço, acrescidos de 150µL do meio de cultura. As culturas foram então incubadas a 37°C, por 48 horas, para ocorrência da adesão celular. Após esse período, foi feito o tratamento com o extrato de *P. alliacea* L. nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente. As células foram novamente incubadas em estufa por 24 horas. Posteriormente, foi acrescentado 10 µL do reagente WST-1 e a placa foi levada para a estufa por 30 minutos. Logo após, a placa foi lida com o auxílio de um espectrofotômetro (leitor de Elisa) (Polaris leitora de microplacas), onde o comprimento de onda primário foi de 450 nm e o secundário de 630 nm. Neste ensaio colorimétrico, avalia-se a capacidade da mitocôndria de transformar o sal tetrazolium (4-[3-(4-iodophenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato) no corante formazam. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial succinato-tetrazolium redutase e somente ocorre em células viáveis. Para o ensaio foi utilizado o protocolo do fabricante (com modificações) (ROCHE APPLIED SCIENCE. Cell proliferation reagente WST-1,2016). Foram feitos três experimentos em quintuplicata.

### 3.3.3 Recuperação clonogênica

Para a avaliação do potencial antineoplásico do extrato de *P. alliacea* L., foram selecionadas 300 células viáveis a partir dos ensaios de viabilidade por azul de tripan. Essas células foram incubadas na estufa, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por dez dias, em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com meio de cultura suplementado. No quinto dia, o meio de cultura foi retirado e acrescentou-se mais 5mL de meio. Logo após esse período, o meio foi vertido e as células foram lavadas, duas vezes, com PBS, a 37°C. Em seguida, foram adicionados em cada garrafa 5 mL de solução de fixação, por 30 minutos. Posteriormente, a solução de fixação foi vertida, sendo adicionados 5 mL de solução corante, por 30 minutos (ver Apêndice). Subsequentemente, a solução corante foi descartada e as garrafas foram mantidas à temperatura ambiente por 24 horas, para a total evaporação da solução corante. Em seguida, foi realizada a contagem dos aglomerados celulares com o auxílio de uma lupa (SANTOS, 2011). Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Através deste ensaio,

avaliou-se a capacidade mitogênica celular após o tratamento, mostrando um efeito biológico mais amplo, para avaliação da citotoxicidade.

#### 3.3.4 Detecção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA

As linhagens celulares foram tratadas durante 24 horas com a  $IC_{50}$  obtida nos ensaios de viabilidade. Logo após, foram submetidas ao tratamento com a solução de tripsina- EDTA, inativadas com meio suplementado com SFB e centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos, a 25°C. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e acrescentado PBS ao precipitado. As células foram filtradas duas vezes em membrana de nylon 70  $\mu$ m (Corning) e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, foi transferido um volume correspondente a  $1 \times 10^5$  células para um tubo FACS e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, 25°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo FACS foi mantido na vertical, com a abertura voltada para baixo, até que o excesso de PBS seja retirado. Posteriormente foram adicionados 10  $\mu$ L de DCFH-DA (BioLegend) e o tubo foi incubado por 10 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz, pois o marcador é fotossensível. Passado esse período, foram adicionados 500  $\mu$ L de PBS e a amostra foi avaliada por citometria de fluxo com 10.000 eventos sendo contados no citômetro de fluxo FACScan (BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados no programa CELL Quest (BD Biosciences). Neste ensaio, o reagente diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen) que é permeável à membrana celular e na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) é oxidado no interior da célula, produz um composto fluorescente, 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF) que é detectada pelos sensores do citômetro (SRIVASTAVA et al., 2010).

#### 3.4 Cepas FF18733 e CD138 de *Saccharomyces cerevisiae*

Neste trabalho foram utilizadas duas cepas de levedura, a cepa selvagem FF18733 que é proficiente nos mecanismos de reparo e a cepa mutante CD138 que possui deficiência no gene *OGG1* que codifica a DNA glicosilase ogg1 que faz a remoção de lesões do tipo 8-oxo-



G. As características genéticas de relevância para este trabalho e respectivas referências bibliográficas estão relacionadas no Quadro 1.

Quadro 1: Cepas de leveduras utilizadas no presente trabalho

<b>Designação da cepa de <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>Genótipo</b>	<b>Origem</b>
<b>FF18733</b>	MATa, <i>leu2-3-112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his7-2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys1-1</i>	HEUDE; FABRE, 1993
<b>CD138</b>	FF18733 com <i>ogg1Δ::TRP1</i>	THOMAS et al., 1997

As cepas foram mantidas em estoque contendo a cultura na fase estacionária, em glicerol estéril 87% (Merck) na proporção de 1:1, a -70°C, sendo renovadas a cada 12 meses.

#### 3.4.1 Obtenção das culturas de *S. cerevisiae*

Inicialmente, as culturas foram transferidas do estoque a -70°C para *Erlenmeyers* contendo meio YPG líquido, durante 24 horas a 28°C e mantidas sob agitação (120rpm) até alcançarem a fase estacionária de crescimento ( $10^7$  células/mL).

Para obtenção das culturas utilizadas nos experimentos, foram feitos repiques a partir da amostra já crescida, na proporção de 1:100 em meio YPG líquido, mantidos a 28°C, sob agitação, por 48h. A densidade ótica da cultura foi medida no comprimento de onda de 600nm ( $DO_{600nm}$ ) e o número de células viáveis foi determinado ( $DO_{600nm} = 1$ , corresponde a  $\sim 10^7$  células/ml). As células foram lavadas duas vezes, por centrifugação durante 10 minutos a 200xg, 20°C e suspensas em PBS.

#### 3.5 Efeito do extrato etanólico de *P. alliacea* na sobrevivência de *S. cerevisiae*

Para avaliar a capacidade citotóxica do extrato, alíquotas (2mL) de suspensões das cepas de *S. cerevisiae*, na fase estacionária de crescimento, foram suspensas em PBS e incubadas com o extrato vegetal nas concentrações de 5; 7,5 e 10µg/mL, ou com os controles DMSO

1%, PBS, ou 4-nitroquilonina 1-óxido (4NQO) na concentração de 1 µg/mL, um agente citotóxico, genotóxico e mutagênico (FRONZA et al., 1992).

A incubação das cepas, tratadas ou não, foi realizada a 28°C, sob agitação constante, por 60 minutos. Após o tempo de incubação, alíquotas foram diluídas em PBS e semeadas (100µL) em placas contendo meio YPG gelificado (2,2% agár). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 28°C, ao abrigo da luz, por 48 horas. Posteriormente foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

Uma vez obtido o número de sobreviventes para cada tempo de incubação, as frações de sobrevivência ( $FS = N/N_0$ ) foram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis após o tempo de tratamento (N), pelo número de células viáveis no tempo zero ( $N_0$ ).

### **3.6 Efeito do extrato etanólico de *P. alliacea* no crescimento de *S. cerevisiae***

Este ensaio tem como objetivo verificar se na presença do extrato etanólico de *P. alliacea* ocorre uma alteração no crescimento normal das cepas *S. cerevisiae*. Após a obtenção das culturas na fase estacionária de crescimento (ver item 3.4.1), foi realizado um pernoite de 24 horas para obtenção das culturas para este ensaio. Após a leitura da DO conforme descrito no item 3.5.1, foi realizada uma diluição (1:10) com o objetivo de iniciar o experimento sempre com mesmo número de células e, a partir desta diluição, foram retirados 5µL e colocados em tubos de ensaio, contendo 2mL de meio YPG (~10<sup>3</sup>células/mL). Cada tubo com a cultura diluída foi incubado com 3µL do extrato (IC<sub>50</sub>) ou com o controle. As amostras foram submetidas a agitação (120 rpm), por 48 horas, a 28°C. Para o estabelecimento da curva de crescimento, alíquotas foram retiradas após 48h, diluídas e semeadas em meio YPG gelificado e incubadas por 48 horas, a 28°C, para crescimento das colônias, contagem e construção da curva de viabilidade celular.

### **3.7 Avaliação da potencialidade mutagênica do extrato etanólico de *P.alliacea***

Para a avaliação da capacidade mutagênica do extrato nas culturas de *S. cerevisiae*, as células foram tratadas com extrato (IC<sub>50</sub>), em PBS estéril (ver item 3.6). Depois de 48 horas,

alíquotas de 1mL ( $\sim 10^7$  células/mL) foram centrifugadas e suspensas em 250 $\mu$ L de PBS. Em seguida foram semeadas em placas de Petri contendo meio YNBD gelificado e suplementado com aminoácidos e bases nitrogenada (uracila) requeridos pela cepa em estudo e com canavanina (60mg/L). Após esta etapa, as placas foram incubadas em estufa (28°C), por 48h, e posteriormente, as UFC foram quantificadas para ser feito o cálculo da mutagênese (SILVA et al., 2015b).

O número de colônias mutantes (Can<sup>R</sup>) foi calculado pela a razão entre as médias dos números de mutantes em  $10^7$  células e a média da sobrevivência. O valor foi expresso como a frequência de mutantes em  $10^7$  células (Can<sup>R</sup>/ $10^7$  células).

### **3.8 Avaliação de perda da atividade mitocondrial em presença do extrato de *P. alliacea* em *S. cerevisiae***

As culturas de *S. cerevisiae*, tratadas, ou não, com diferentes concentrações do extrato, foram semeadas em placas de Petri contendo YPG gelificado e incubadas a 28°C. Após 5 dias, as UFC foram contadas e, logo em seguida, cuidadosamente vertidos 7 mL de tampão fosfato com agar (0,7%) contendo TTC (2,3,5-trifenil-tetrazólio) (0,05%), a 55°C, sobre as colônias de células. Após 15-20 minutos, tempo necessário para gelificação do ágar, as colônias que apresentaram cor branca foram contadas.

Este ensaio tem como objetivo verificar a frequência de indução de colônias *petites* na cepa de *S. cerevisiae*, empregando o teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). Neste teste, através da diferença de coloração, colônias que perderam a função mitocondrial chamada *petites* (apresentam cor branca) serão distinguidas daquelas que apresentarem seu metabolismo respiratório intacto (apresentam cor vermelha) (CHEN; CLARK-WALKER, 2000; OGUR; JOHN; NAGAI, 1957).

### **3.9 Análise estatística**

A análise estatística em cada um dos ensaios experimentais, foi realizada utilizando o programa Graphpad InStat 4.0 adotando um nível de confiança de 95%. Os dados obtidos em

cada experimento foram testados quanto à sua normalidade e, em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA *oneway*) para comparar mais de duas amostras e o pós teste de comparações múltiplas de Tukey. O teste t de Student foi utilizado afim de comparar apenas duas amostras.

Para a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> (concentração que reduz a viabilidade em 50%) foi utilizado o software Excel®.

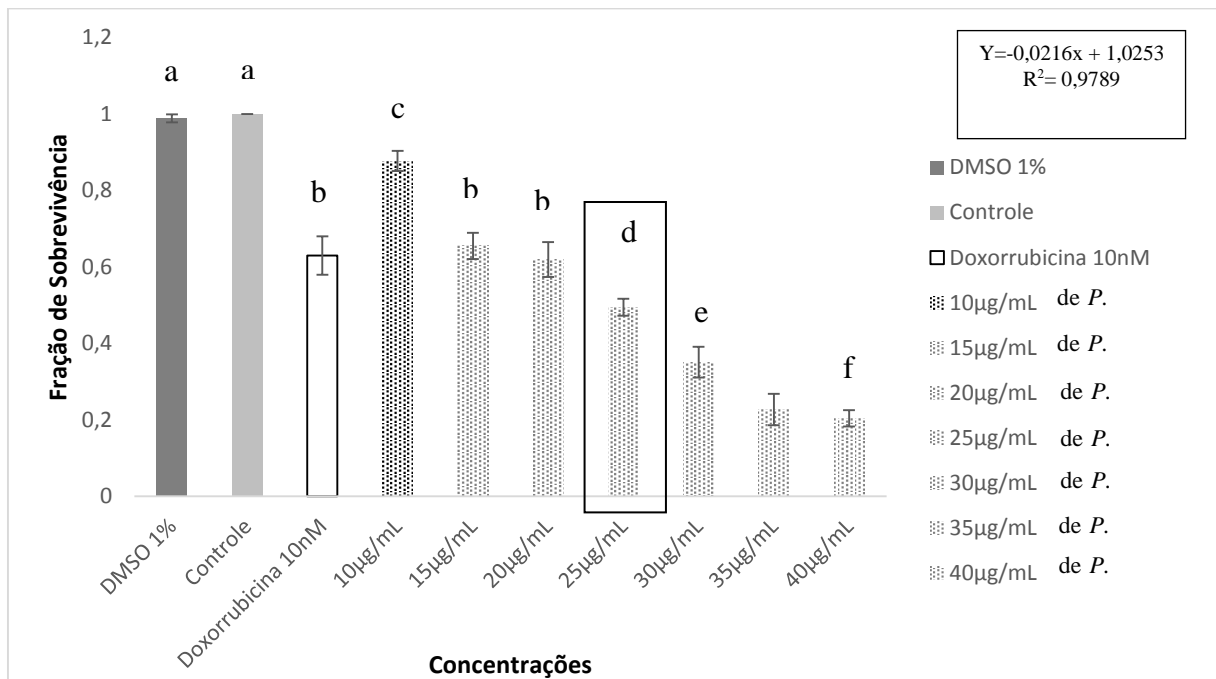
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimentos com as linhagens celulares de carcinoma pulmonar (A549) e de rim de macaco-verde (VERO)

#### 4.1.1 Exclusão por azul de tripan na linhagem A549

Os resultados obtidos mostram a diminuição estatisticamente significativa da taxa de sobrevivência das células A549 tratadas com o extrato etanólico de *P. alliacea*, em relação ao controle, em todas concentrações testadas. Uma amostra de células incubadas com doxorrubicina (10nM) foi usada como controle positivo. Não houve diferença significativa entre as concentrações de 15µg/mL, 20µg/mL e doxorrubicina 10nM; e também entre as de 35µg/mL e 40µg/mL (Figura 3). Para calcular a concentração que inibe 50% (IC<sub>50</sub>) da viabilidade celular, foi utilizado o *software* Excel no qual foi determinado a equação da reta (ver figura), e o resultado foi um R= 0,9789. A IC<sub>50</sub> calculada (25µg/mL) foi igual ao IC<sub>50</sub> experimental. O DMSO 1%, utilizado para diluir o extrato, também foi testado nas células e não se mostrou citotóxico em relação ao controle.

Figura 3 - Fração de sobrevivência da linhagem celular A549, tratada com extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*.

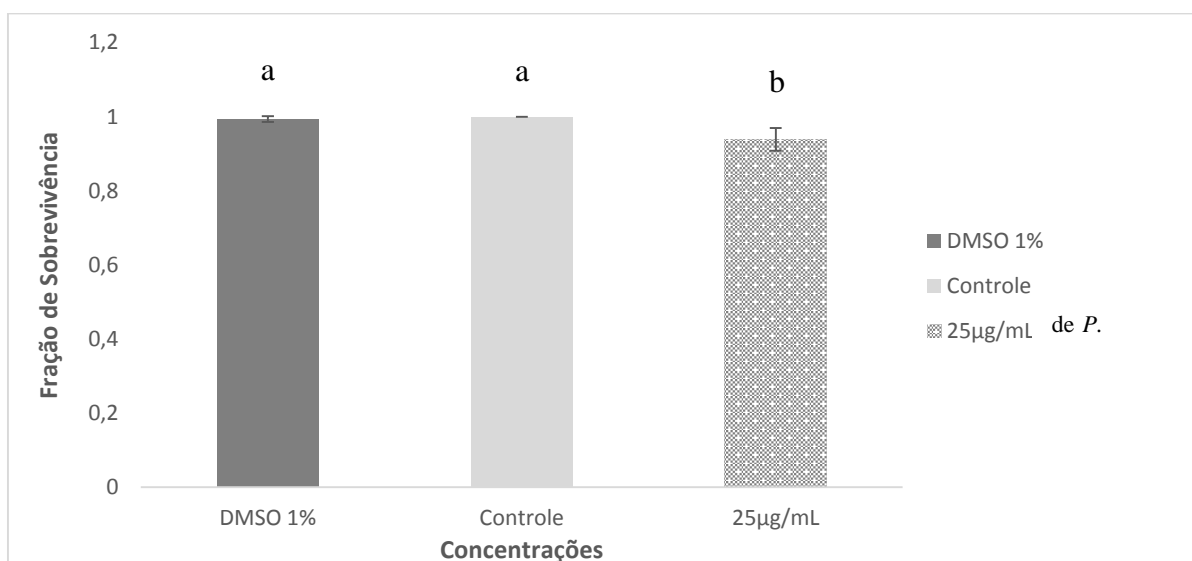


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de exclusão pelo azul de tripan após 24h de tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Exclusão por azul de tripan na linhagem VERO

Os resultados demonstram que houve uma diminuição estatisticamente significativa da taxa de sobrevivência da linhagem VERO tratada com a  $IC_{50}$  (25µg/mL) que foi obtida no ensaio de exclusão com azul de tripan para a linhagem A549, quando comparada ao controle (Figura 4). O DMSO 1%, utilizado para diluir o extrato, também foi testado nas células e não se mostrou citotóxico em relação ao controle.

Figura 4 - Fração de sobrevivência da linhagem celular VERO tratada com extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*.

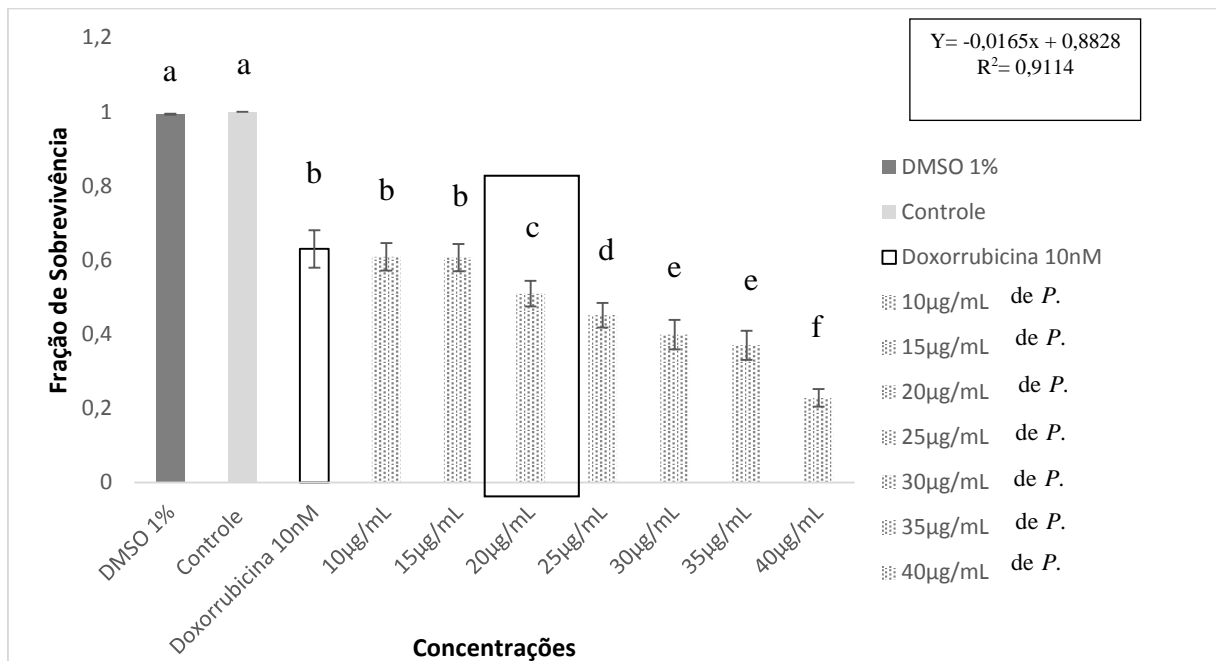


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de exclusão pelo azul de tripan após 24h de tratamento com a  $IC_{50}$  (25µg/mL) do extrato de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3 Ensaio de viabilidade WST-1 na linhagem A549

Através dos resultados obtidos, foi possível observar a diminuição estatisticamente significativa da taxa de sobrevivência das células A549, tratada com o extrato etanólico de *P. alliacea*, em relação ao controle, em todas as concentrações testadas. Não houve diferença significativa entre as concentrações de 10µg/mL e 15µg/mL; o mesmo foi observado para as concentrações de 30µg/mL e 35µg/mL. Porém as concentrações de 10µg/mL e 15µg/mL não são diferentes do controle positivo, doxorrubicina 10nM (Figura 5). Para calcular a  $IC_{50}$  foi utilizado o *software* Excel com aplicação da equação da reta, onde  $R=0,9114$  e a  $IC_{50}$  calculada foi 23,875µg/mL e a  $IC_{50}$  experimental foi de 20µg/mL. Esta concentração apresentou-se mais citotóxica do que o controle positivo. O DMSO 1%, mesma concentração utilizada para diluir o extrato, também foi testado nas células A549 e não se mostrou citotóxico em relação ao controle.

Figura 5 - Fração de sobrevivência da linhagem celular A549 tratada com extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*.



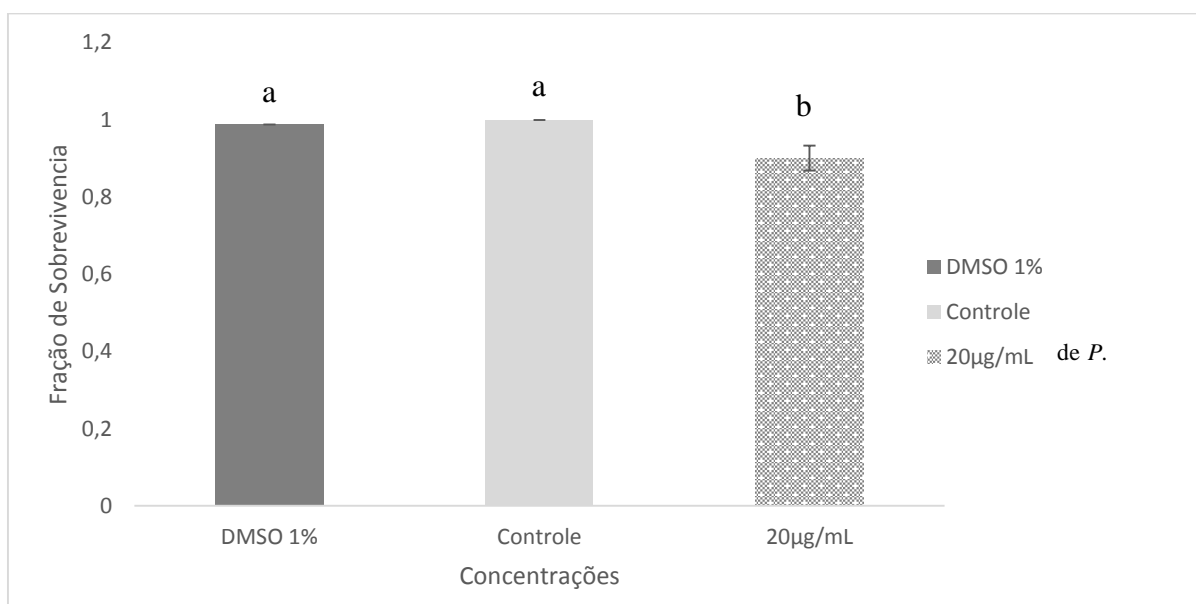
Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de WST-1 após 24h de tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4 Ensaio de viabilidade WST-1 na linhagem VERO

De acordo com a figura 6, os resultados obtidos demonstram que houve uma diminuição estatisticamente significativa da taxa de sobrevivência da linhagem VERO tratada com a  $IC_{50}$  (20µg/mL), obtida no experimento anterior, quando comparadas ao controle (Figura 6). O DMSO 1%, na concentração utilizada para diluir o extrato também foi testado nas células A549, não se mostrou citotóxico em relação ao controle.



Figura 6 - Fração de sobrevivência da linhagem celular VERO tratada com extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*.

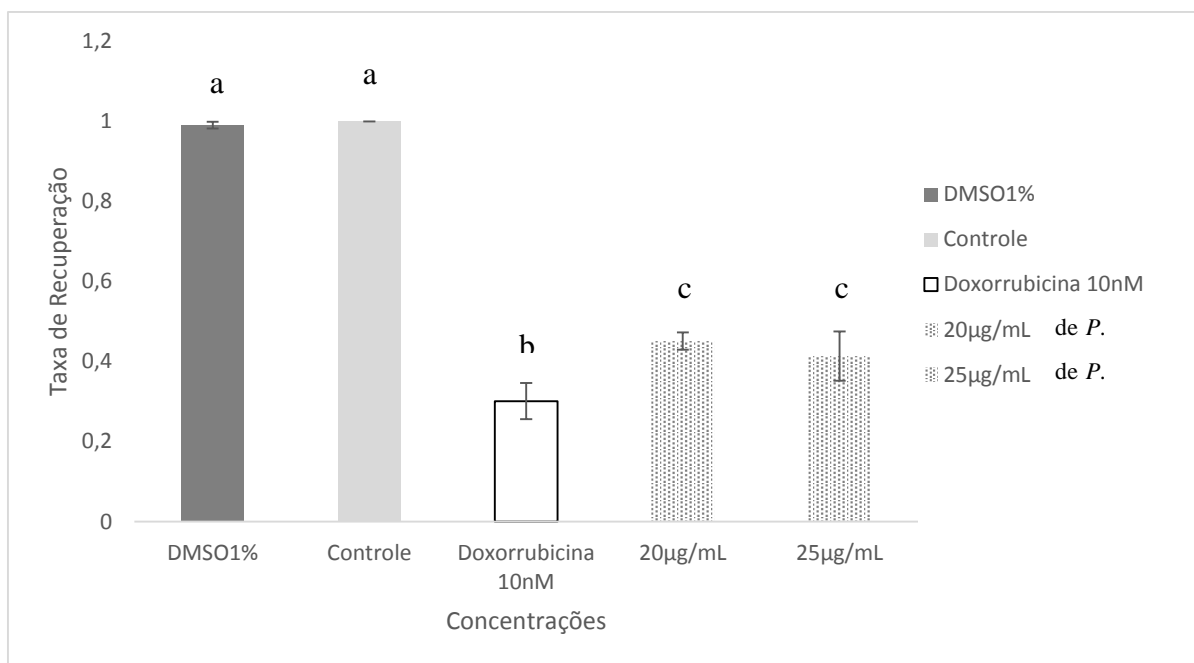


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de WST-1 após 24h de tratamento com a  $IC_{50}$  (20µg/mL) do extrato de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.5 Recuperação clonogênica com a linhagem A549

Os experimentos de recuperação clonogênica foram realizados incubando as células com o extrato de folhas de *P. alliacea* nas concentrações de  $IC_{50}$  obtidas nos ensaios de viabilidade. Os resultados demonstram que a concentração de 20µg/mL, quando comparada com a concentração de 25µg/mL, ( $IC_{50}$  obtidas no ensaio de exclusão por azul de tripan e WST-1 respectivamente), não possuem diferenças estatisticamente significativas. Porém quando comparadas ao controle as diferenças são significativas (Figura 7). As células tratadas com o DMSO 1%, concentração utilizada para diluir o extrato, não apresentaram diminuição da capacidade mitogênica.

Figura 7 - Avaliação da capacidade mitogênica da linhagem celular A549 tratada com o extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*.

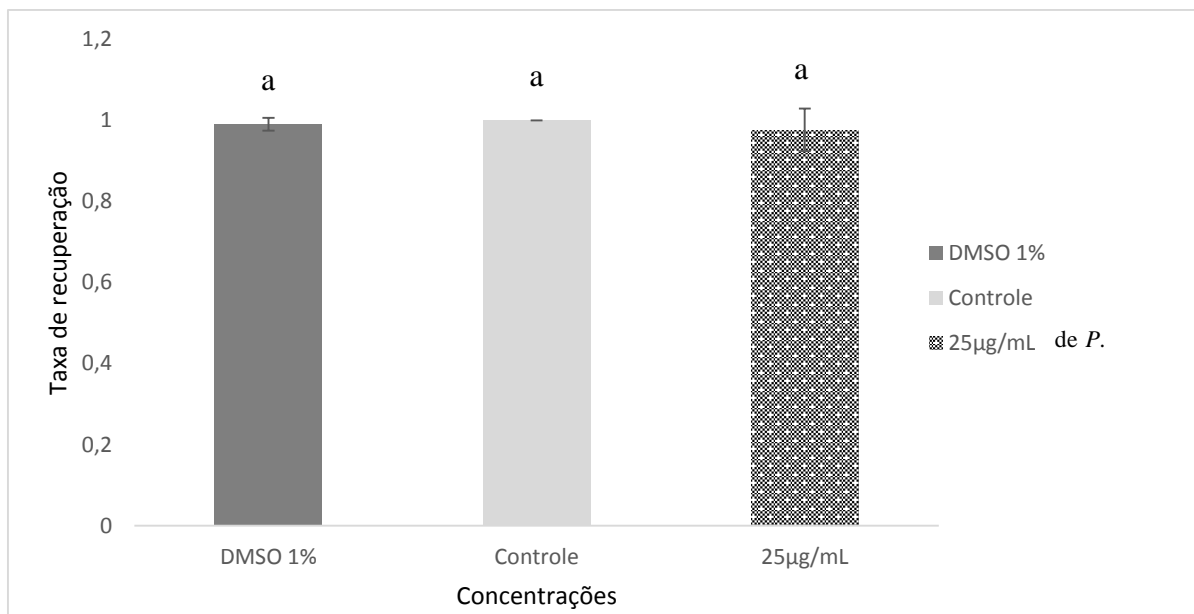


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de recuperação clonogênica 10 dias após tratamento com as concentrações de  $IC_{50}$  do extrato de *P. allieacea* encontradas nos ensaios de viabilidade. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.6 Recuperação clonogênica com a linhagem VERO

Os resultados obtidos demonstram que não há diferença estatisticamente significativa, 10 dias após o tratamento com a maior concentração de  $IC_{50}$  do extrato etanólico de *P. allieacea*, quando comparada ao controle (Figura 8). As células tratadas com o DMSO 1%, concentração utilizada para diluir o extrato, não apresentaram diminuição na capacidade mitogênica.

Figura 8 - Avaliação da capacidade mitogênica da linhagem celular VERO, tratada com o extrato etanólico de folhas de *P. allieacea*.

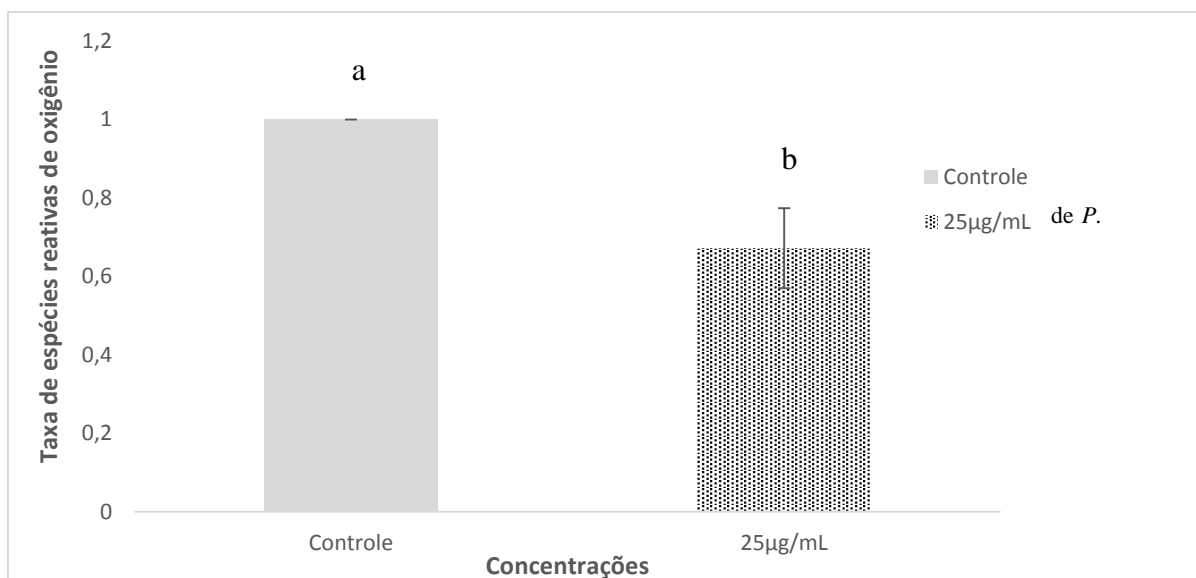


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de recuperação clonogênica após 10 dias de tratamento com a maior concentração de  $IC_{50}$  do extrato de *P. alliacea* encontrada nos ensaios de viabilidade. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.7 Produção de espécies reativas oxigênio na linhagem A549

De acordo com figura 9, foi possível observar a diminuição estatisticamente significativa da taxa de produção de espécies reativas de oxigênio nas células A549, quando tratadas com o extrato de etanólico de *P.alliacea* na concentração 25µg/mL.

Figura 9 - Detecção da taxa de produção de espécies reativas oxigênio na linhagem A549 tratada com o extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*.

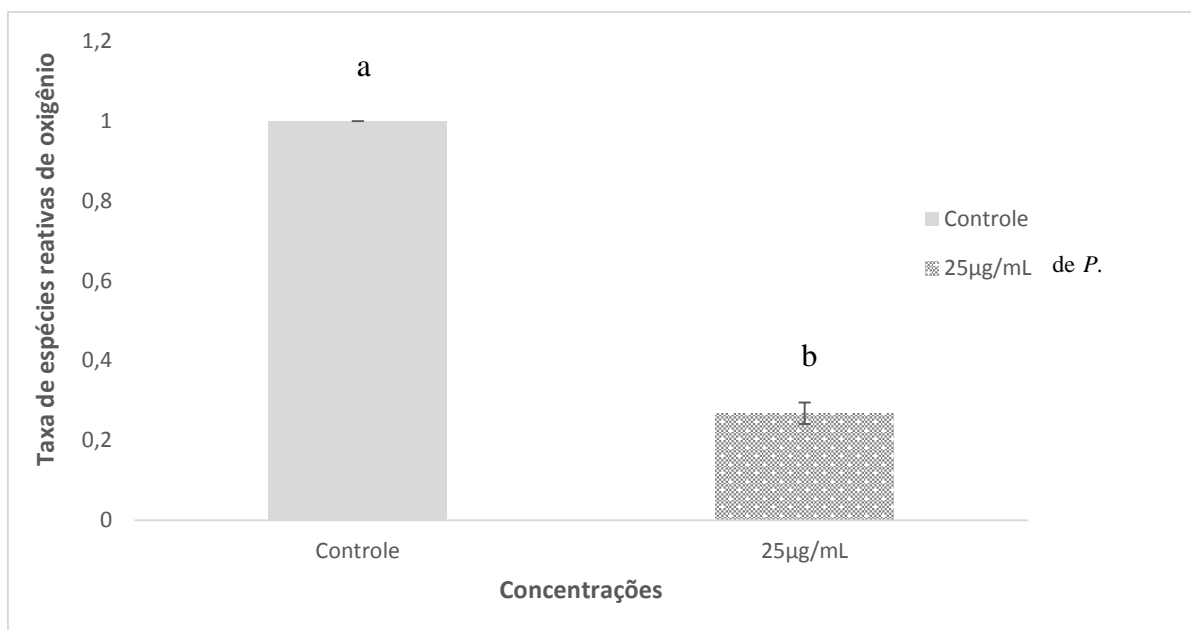


Legenda: Taxa de produção de espécies reativas de oxigênio detectadas pelo corante DCFH-DA, por citometria de fluxo, na linhagem A549 tratada com o extrato etanólico de *P. aliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.8 Produção de espécies reativas oxigênio na linhagem VERO

De acordo com a figura 10, foi possível observar a diminuição estatisticamente significativa da taxa de produção de espécies reativas de oxigênio nas células VERO, quando tratadas com o extrato de etanólico de *P. aliacea* na concentração 25µg/mL.

Figura 10 - Detecção da taxa de espécies reativas oxigênio na linhagem VERO, tratada com o extrato etanólico de folhas de *P. aliacea*.



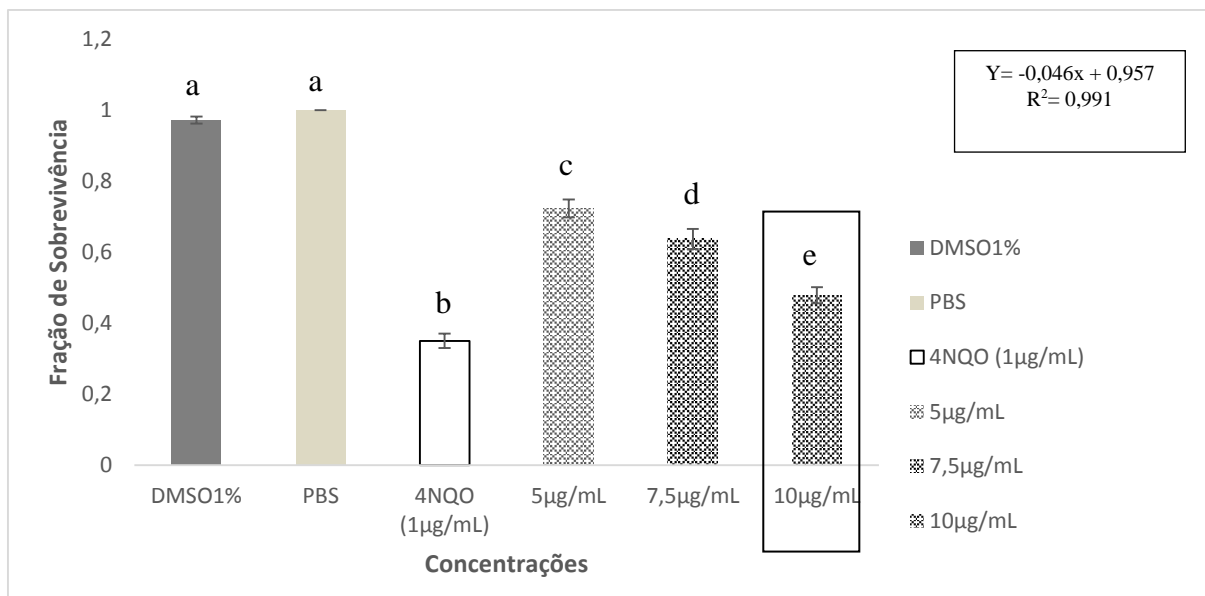
Legenda: Taxa de produção de espécies reativas de oxigênio detectadas pelo corante DCFH-DA, por citometria de fluxo, na linhagem VERO tratada com o extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Experimentos com as cepas FF18733 e CD138 de *Saccharomyces cerevisiae*

### 4.2.1 Estudos para avaliar a sobrevivência da cepa FF18733 após exposição ao extrato de *P. alliacea*

Na figura 11, é possível observar a diminuição significativa da fração de sobrevivência da cepa FF18733 (selvagem) de *S. cerevisiae*, tratada com diferentes concentrações do extrato etanólico de *P. alliacea*, quando comparadas aos controles (DMSO1%, PBS e 4NQO (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )). Para calcular a  $\text{IC}_{50}$  foi utilizado o *software* Excel com aplicação da equação da reta, onde  $R=0,991$  e a  $\text{IC}_{50}$  calculada foi  $9,93\mu\text{g}/\text{mL}$  e a  $\text{IC}_{50}$  experimental foi  $10\mu\text{g}/\text{mL}$ . O DMSO 1%, concentração utilizada para diluir o extrato, também foi testado na cepa e não se mostrou citotóxico, em relação ao controle com PBS ( $p < 0,05$ ).

Figura 11 - Fração de sobrevivência da cepa FF18733 de *S. cerevisiae* submetida ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de *P. alliacea*.

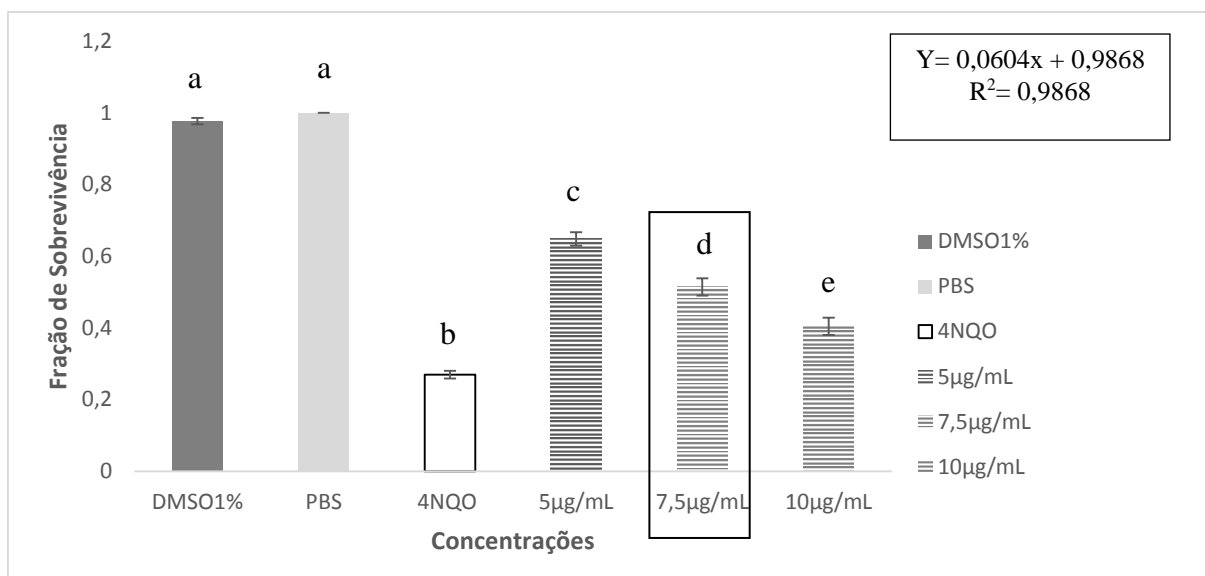


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de sobrevivência da cepa FF18733 após 60 min de tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Estudos para avaliar a sobrevivência da cepa CD138 após exposição ao extrato de *P. alliacea*

De acordo com a figura 12, foi possível observar a inativação celular, estatisticamente significativa, da cepa CD138 (mutante) de *S. cerevisiae* tratada com as diferentes concentrações do extrato. Também foram observados diferenças quando comparadas ao controle e ao 4NQO. O DMSO 1% não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle com PBS. A  $IC_{50}$  calculada foi 7,13µg/mL e a  $IC_{50}$  experimental foi 7,5µg/mL.

Figura 12 - Fração de sobrevivência da cepa CD138 de *S. cerevisiae* submetida ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de *P. alliacea*.

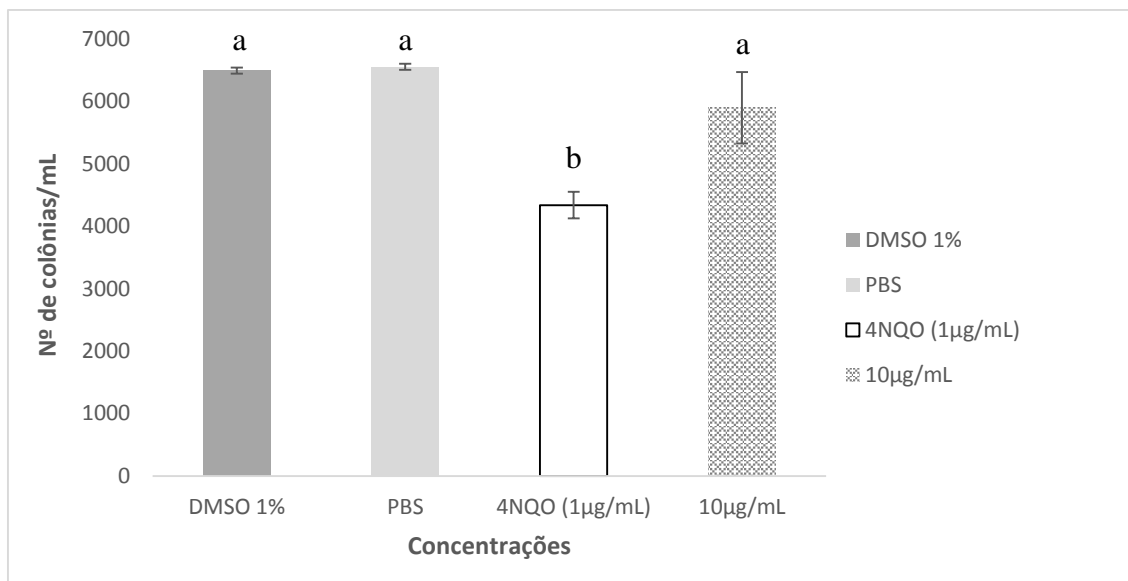


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de sobrevivência da cepa CD138 após 60 min de tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Estudo para avaliar o crescimento na cepa FF18733 de *S. cerevisiae* em presença do extrato de *P. alliacea*

Os resultados apresentados na figura 13 mostram que não houve alteração significativa na taxa de crescimento induzida pelo extrato ( $IC_{50}$  10µg/mL), quando comparado aos controles (PBS, DMSO 1%).

Figura 13 - Crescimento da cepa FF18733 *S. cerevisiae* (selvagem) na presença do extrato etanólico de *P. alliacea*.



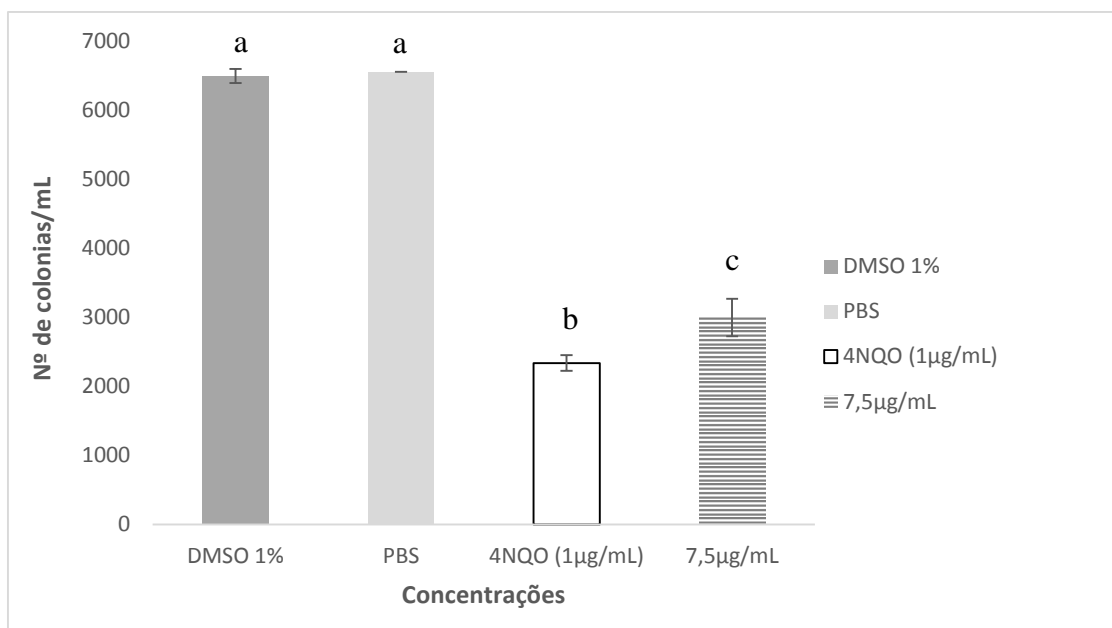
Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de crescimento da cepa FF18733 após 48h de tratamento com a  $IC_{50}$  (10µg/mL) do extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.4 Estudo para avaliar o crescimento na cepa CD138 de *S. cerevisiae* em presença do extrato de *P. alliacea*

Os resultados obtidos demonstram que, em presença do extrato etanólico de *P. alliacea* ( $IC_{50}$ ), houve uma diminuição estatisticamente significativa na taxa de crescimento induzida pelo extrato, quando comparado aos controles (PBS, DMSO 1%) e ao 4NQO (Figura 14).

Figura 14 - Crescimento da cepa *S. cerevisiae* CD138 (mutante) na presença do extrato etanólico de *P. alliacea*.



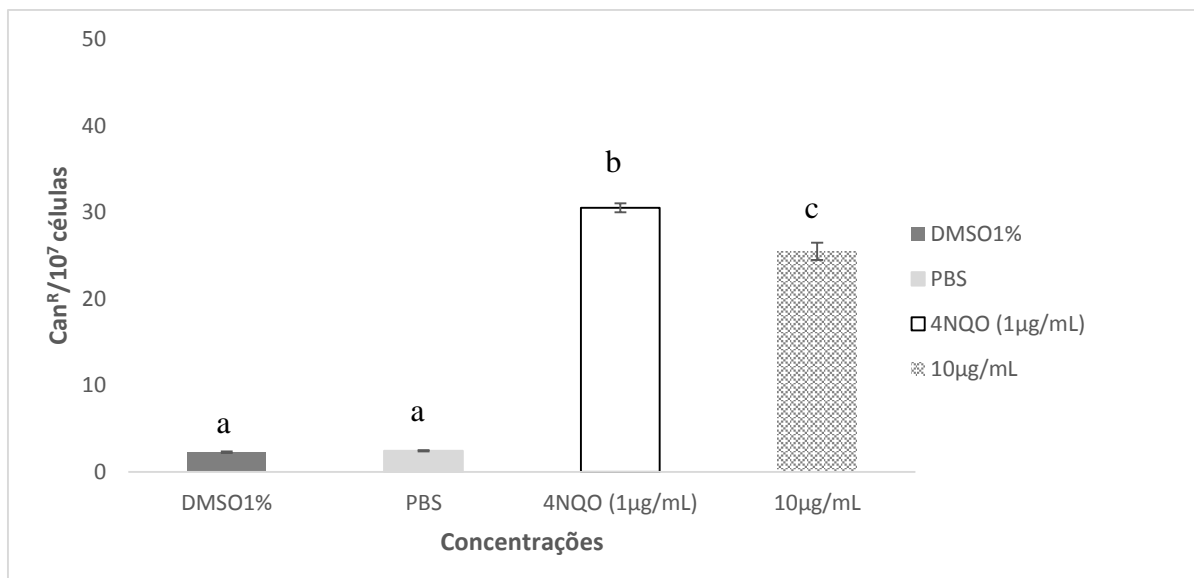


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de crescimento da cepa CD138 após 48h de tratamento com a IC<sub>50</sub> (7,5µg/mL) do extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média ± desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

#### 4.2.5 Estudo para avaliar mutagênese na cepa FF18733 de *S. cerevisiae* em presença do extrato de *P. alliacea*

Na figura 15 encontram-se os dados referentes aos experimentos sobre mutagênese espontânea e/ou induzida pelo extrato etanólico de *P.alliacea* (IC<sub>50</sub>). Com base nesses resultados, é possível observar que houve um aumento significativo na taxa de mutagênese induzida pelo extrato, quando comparada com a taxa de mutagênese espontânea e a induzida pelo 4NQO. A cepa tratada com o DMSO 1%, para controle, não apresentou diferença significativa, quando comparada ao PBS.

Figura15 - Frequência de mutagênese espontânea e induzida pela exposição ao extrato etanólico de *P.alliacea* da cepa *S. cerevisiae* FF18733 (selvagem).

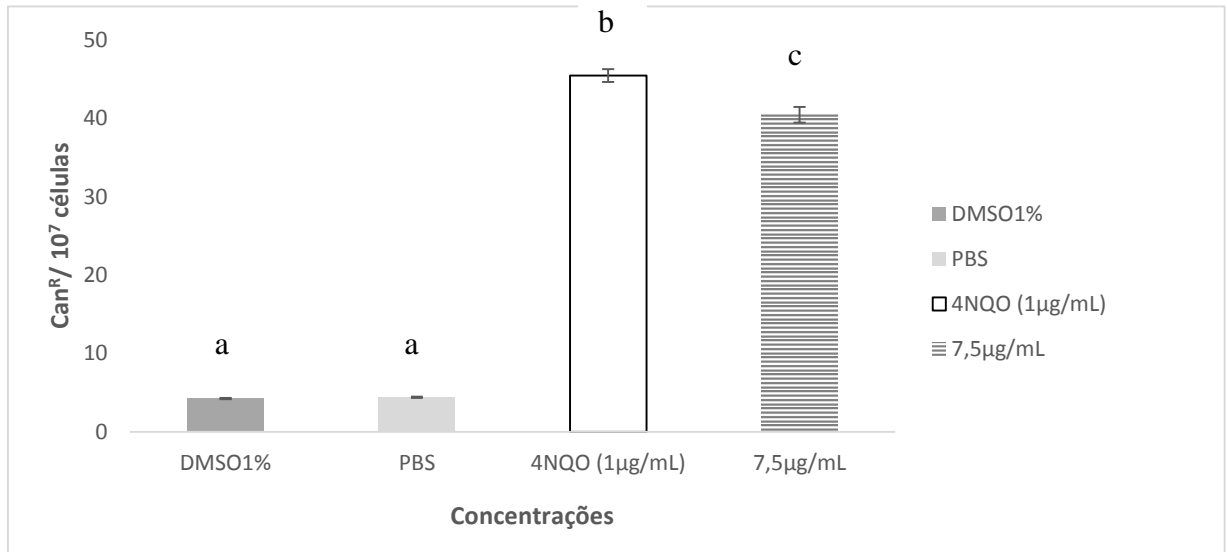


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de resistência a L-canavanina da cepa FF18733 após 48h de incubação com a IC<sub>50</sub> (10µg/ml) do extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média ± desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.6 Estudo para avaliar mutagênese na cepa CD138 de *S. cerevisiae* em presença do extrato de *P. alliacea*

Na figura 16 é possível observar um aumento significativo na taxa de mutagênese induzida pelo extrato, quando comparada com a taxa de mutagênese espontânea e a induzida pelo 4NQO na cepa CD138. A cepa tratada com o DMSO 1%, para controle, não apresentou diferença significativa, quando comparada ao PBS.

Figura 16 - Frequência de mutagênese espontânea e induzida pela exposição ao extrato etanólico de *P. alliacea* da cepa CD138 *S. cerevisiae* (mutante).

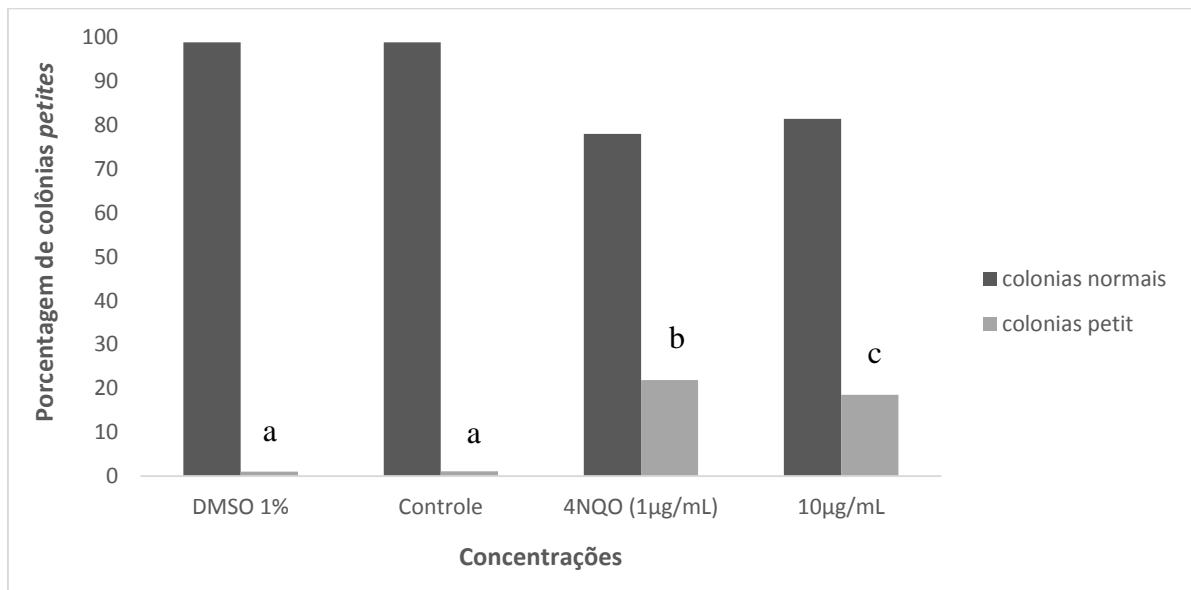


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de resistência a L-canavanina da cepa CD138 após 48h de incubação com a IC<sub>50</sub> (7,5µg/ml) do extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam a média ± desvio padrão de três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.7 Estudo para avaliar a frequência de colônias *petites* na cepa FF18733 de *S. cerevisiae* na presença do extrato de *P. alliacea*

O tratamento da cepa com o extrato etanólico de *P. alliacea* (10µg/mL) causou instabilidade no DNA mitocondrial (mtDNA) na cepa selvagem de 18%. Indicando que houve alteração no metabolismo respiratório (Figura 17). Neste estudo, o 4NQO (controle positivo) confirmou seu potencial oxidativo. O PBS e o DMSO 1%, ambos empregados como controle negativo, não induziram a mutagênese mitocondrial.

Figura 17 - Frequência de colônias *petites* após a exposição ao extrato etanólico de *P. alliacea* da cepa FF18733 *S. cerevisiae*.

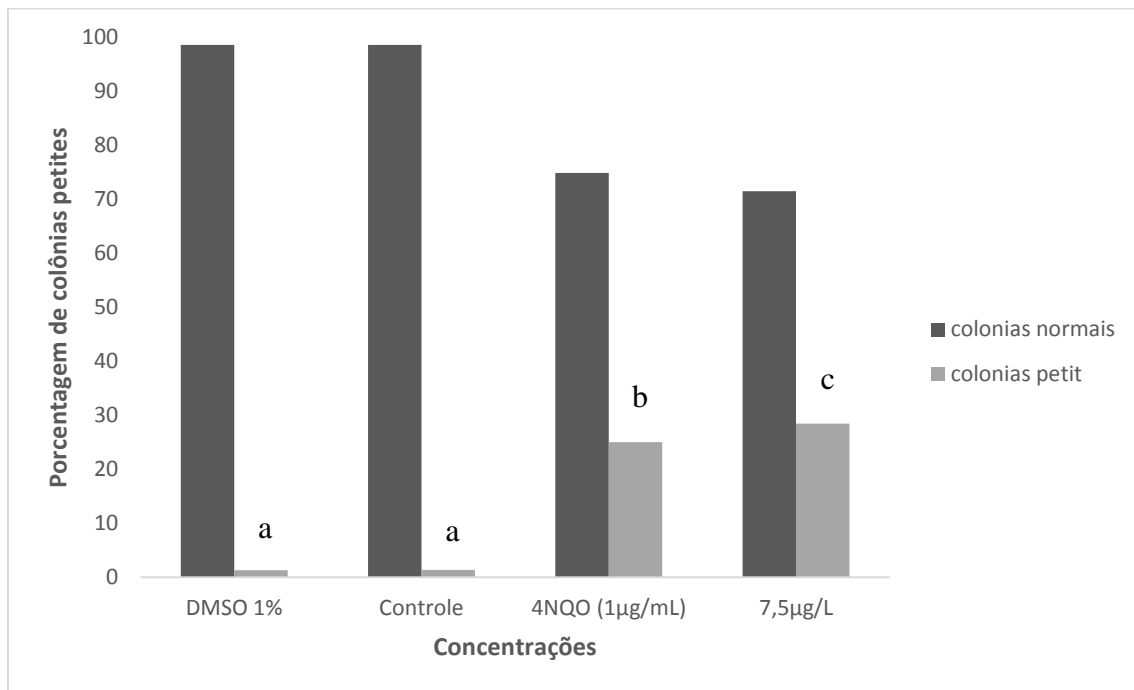


Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de coloração com TTC com a cepa FF18733 durante 24 horas de incubação com a IC<sub>50</sub> (10µg/mL) do extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam o percentual de colônias *petites* induzidas pelo extrato

#### 4.2.8 Estudo para avaliar a frequência de colônias *petites* na cepa CD138 de *S. cerevisiae* na presença do extrato de *P. alliacea*

O tratamento da cepa CD138 com o extrato etanólico de *P. allicea* (IC<sub>50</sub> 7,5µg/mL) causou instabilidade no mtDNA na cepa mutante de 29% e indicando que houve alteração no metabolismo respiratório (Figura 17). Neste estudo, o 4NQO (controle positivo) confirmou seu potencial oxidativo. O PBS e o DMSO 1%, ambos empregados como controle negativo, não induziram a perda da atividade mitocondrial

Figura 18 - Frequência de colônias *petites* após a exposição ao extrato etanólico de *P. alliacea* da cepa CD138 *S. cerevisiae*.



Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de coloração com TTC com a cepa FF18733 durante 24 horas de incubação com a IC<sub>50</sub> (10µg/mL) do extrato etanólico de *P. alliacea*. Os resultados expressam o percentual de colônias *petites* induzidas pelo extrato.

## 5 DISCUSSÃO

Alguns trabalhos têm demonstrado a importância do estudo com plantas que possuem propriedades medicinais. Essas plantas contêm uma complexa mistura de substâncias que podem exercer sua ação separada ou sinergisticamente. Em alguns desses estudos, têm sido empregado extratos brutos e outros têm analisado substâncias isoladas (ANDRADE et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2014; MURRAY et al., 2016; SILVA et al., 2015b; SILVA et al., 2016). Os efeitos biológicos observados (antimutagênicos, antioxidantes, anti-inflamatório, analgésico, etc), nem sempre esclarecem totalmente o mecanismo de ação das plantas medicinais, sendo necessário muitos estudos para este fim. Uma vez que não há limites para o uso destas plantas e o seu consumo, da maneira como vem sendo feita pelos usuários, pode representar risco para a saúde humana (SILVA, 2006).

Relatos etnofarmacológicos mostram que *P. alliacea* é uma das muitas espécies utilizadas pela população para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo o câncer, mal este que tem acometido uma grande parcela da população. Porém, os mecanismos de ação do extrato e de seus componentes ainda não são totalmente elucidados (LUZ et al., 2016).

Estudos utilizando diferentes extratos ou substâncias isoladas de uma planta são realizados empregando ensaios *in vitro* e *in vivo*. Estes ensaios podem ter como alvo as membranas, as mitocôndrias e o DNA (CRUZ, 2015; SILVA, 2006).

Dentre os testes de viabilidade celular está o ensaio de exclusão por azul de tripan, que avalia a integridade da membrana plasmática quando submetida a tratamentos com substâncias isoladas ou com extratos vegetais. Por meio deste ensaio foi verificado que o extrato etanólico de folha e a fração acetato de etila de *P. alliacea* reduziram em 50% a viabilidade celular das linhagens K562 (leucemia mielóide crônica) e NB-4 (leucemia promielocítica humana) nas concentrações de 37µg/mL e 45µg/mL respectivamente (CIFUENTES et al., 2009).

O extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* reduziu a viabilidade celular das linhagens A357 (melanoma humano), Mel Rel (melanoma murino) e K562 (leucemia mielóide crônica), com IC<sub>50</sub> igual a 35,2µg/mL; 36,3µg/mL; 32µg/mL respectivamente (URUENÃ et al., 2008). Estes trabalhos estão em conformidade com os resultados apresentados no presente estudo. Onde a IC<sub>50</sub> foi de 25µg/mL.

Dados da literatura mostraram pelo ensaio de viabilidade por MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), que a fração metanólica do extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* apresentou citotoxicidade em concentrações que

variaram de 7,8 a 125µg/mL para a linhagem celular 4T1 (adenocarcinoma de mama). Esta linhagem é utilizada como modelo para estudo de tumores que fazem metástase, e a IC<sub>50</sub> foi obtida na concentração de 29,3µg/mL (HERNANDES et al., 2014). O extrato metanólico também foi capaz de induzir toxicidade a 60% da linhagem HEP (carcinoma hepatocelular) (HERNANDES et al., 2014). Estes dados da literatura estão em acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, onde o extrato etanólico de *P. alliacea* inibiu o crescimento (IC<sub>50</sub> 20 µg/mL) das células A549. Vale ressaltar que os resultados de avaliação da atividade citotóxica apresentados nessa dissertação foram realizados através do ensaio de WST-1 que, assim como o ensaio MTT, avalia a atividade mitocondrial.

Na literatura a fração metanólica do extrato etanólico de *P. alliacea* reduziu a capacidade mitogênica das células após quatorze dias de tratamento na linhagem 4T1(adenocarcinoma de mama) utilizando a IC<sub>50</sub> 29,3µg/mL obtida nos ensaios de viabilidade. O mesmo ocorreu com a linhagem A357 (IC<sub>50</sub> 35µg/mL) e K562 (IC<sub>50</sub> 32µg/mL) quando tratada com a IC<sub>50</sub> do extrato etanólico de folhas (HERNANDEZ et al., 2014). No presente estudo, também houve uma diminuição da capacidade mitogênica das células A549 após o tratamento com as IC<sub>50</sub> 20 e 25µg/mL, determinadas nos ensaios de viabilidade por WST-1 e exclusão por azul de tripan respectivamente. Neste caso encontrou-se inibição da atividade mitogênica em concentrações menores das encontradas nos estudos citados acima. Segundo Uruenã e colaboradores (2008), alterações nas concentrações de proteínas envolvidas no metabolismo celular e nos processos de tradução, podem explicar a diminuição da capacidade clonogênica das células tumorais.

As concentrações de IC<sub>50</sub> que foram obtidas nos ensaios com a linhagem tumoral A549 foram testadas na linhagem normal VERO, onde estas reduziram apenas 10% da viabilidade das células saudáveis. Estes resultados são interessantes, pois o extrato apresenta-se mais citotóxico para a linhagem tumoral, sendo assim, um composto promissor para identificação de um agente antineoplásico.

As células tumorais apresentam uma alta taxa de espécies reativas de oxigênio que contribuem para o início e progressão do tumor (FOGG; LANNING; MACKEIGAN, 2016). De acordo com os resultados obtidos por citometria de fluxo para avaliação da taxa de produção de ERO, foi possível observar um efeito antioxidante do extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* em ambas as linhagens testadas. No caso da linhagem A549, essa diminuição causa um desequilíbrio da homeostase celular, podendo desencadear a ativação de alguma via de morte. Em uma revisão recente na literatura, foi descrito que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induz mutações que ativam o protooncogene C-Ha-ras. Nesta mesma revisão foi

descrito que essa mesma ERO produz uma mutação que inativa o gene supressor de tumor p53 (GALADARI et al., 2017), demonstrando assim que a diminuição de ERO na célula tumoral pode ser uma das vias de ativação do processo de morte celular.

Um outro modelo eucarioto que vem sendo utilizado na determinação de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos são as leveduras. Para o nosso estudo, uma das cepas escolhidas foi a de *S. cerevisiae* FF18733 que possui características tais como: possuir a proteína OGG1 e ter DNA mitocondrial (mtDNA) mais vulnerável aos danos oxidativos do que o DNA nuclear, principalmente 8-oxoG (SINGH et al., 2001).

Dados da literatura mostram que o extrato aquoso de *Cassia angustifolia* Vahl. (Senne) quando testado nas cepas FF18733 de *S. cerevisiae* e na mutante CD138 não reduziu a sobrevivência das células de leveduras após 60 min de tratamento (SILVA, 2014b). Em nossos estudos com a cepa FF18733, o extrato etanólico de *P. alliacea* causou inativação celular em todas as concentrações testadas. A concentração de 10µg/mL correspondeu à IC<sub>50</sub>. Em outro ensaio, quando a cepa foi crescida por 48h em meio rico (YPG), na presença do extrato não apresentou diferença significativa no crescimento ( $p > 0,05$ ), quando comparada aos controles (PBS e DMSO 1%). Diferente do que foi encontrado nos estudos de Silva (2013) onde já nas primeiras 24h foi observado a toxicidade induzida pelo Senne na cepa FF18733.

O Senne também foi testado em outras cepas de *S. cerevisiae* além da FF18733 e CD138 tais como BPS 1031 e BPS 1050 e foi capaz de aumentar a mutagênese apenas na cepa BPS 1050 (SILVA et al., 2014). No presente estudo, foi observado que o extrato de *P. alliacea* (10µg/mL) mostrou-se mutagênico (em relação aos controles PBS e DMSO 1%) para a cepa de *S. cerevisiae* FF18733. O que sugere que a o extrato de *P. alliacea* possui substâncias capazes de induzir mutações no DNA nuclear, semelhante a ação de quimioterápicos, como por exemplo a bleomicina (ALMEIDA et al., 2005).

Dando continuidade com os experimentos com *S. cerevisiae* foram realizados estudos com a cepa CD138 (-ogg1). O gene ogg1 codifica a proteína DNA glicosilase OGG1 que faz a remoção das lesões 8-OxoG e Fapy do DNA. Estas lesões levam a mutagênese e a morte celular (SILVA, 2015b). No ensaio de sobrevivência utilizando a cepa mutante CD138 foi possível observar que está se apresentou mais sensível (IC<sub>50</sub> 7,5µg/mL) ao tratamento com extrato etanólico de *P. alliacea* quando comparada a cepa selvagem (IC<sub>50</sub> 10µg/mL). No ensaio de crescimento, aonde ambas as cepas foram tratadas com as suas respectivas IC<sub>50</sub>, foi observado uma alteração no crescimento somente na cepa CD138. Já no ensaio de



mutagênese observou-se um aumento na frequência de mutações da cepa mutante CD138 quando comparada a cepa selvagem FF18377. Estes resultados sugerem que um ou mais componentes do extrato produzem lesões do tipo 8-oxoG, e outras lesões ainda não identificadas.

Nos experimentos que avaliam a indução de colônias *petites* foi possível observar um aumento na porcentagem desse tipo de colônia em ambas as cepas, sendo que esse efeito foi maior na cepa mutante CD138. Isso sugere que um dos componentes do extrato produzem lesões no mtDNA e conseqüentemente alteram a atividade desta organela.

Analisando os resultados observados em leveduras e linhagens celulares, observamos que em ambos os casos ocorreu uma alteração nas vias oxidativas que afetam o metabolismo mitocondrial, sugerindo que esta organela é mais afetada pelos produtos gerados pela metabolização do extrato de *P. alliacea*.

Nestas condições experimentais os resultados observados demonstram a versatilidade do extrato etanólico de *P. alliacea* de acordo com o modelo biológico no qual está atuando. Sugere-se que essa diferença, possa estar relacionada com as substâncias presentes no extrato. Para confirmar essa hipótese devem-se aprofundar os estudos acerca da composição química e dos efeitos biológicos.

Neste trabalho demonstramos que no extrato etanólico de *P. alliacea* existem substâncias promissoras para a identificação de um quimioterápico. Por outro lado, o fato de gerar uma inativação em uma linhagem selvagem e mutações em leveduras, reforça a ideia de que não devemos utilizar as chamadas “plantas medicinais” sem ter o conhecimento completo dos efeitos tóxicos.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que o extrato de *P. alliacea*:

- produz lesões no mtDNA e no DNA genômico;
- possui componentes que produzem morte celular diferenciada em uma célula tumoral;
- possui substâncias promissoras para a identificação de um quimioterápico.

## REFERÊNCIAS

- ABREU MATOS, F. J.; LORENZI, H.; SANTOS, L. F. L.; MATOS, M. E. O.; SILVA, M. G. V.; SOUSA, M. P. Plantas tóxicas: estudo de fitotoxicologia química de plantas brasileiras. *São Paulo: Instituto plantarum de estudos da flora LTDA*, p. 256, 2011.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 22 de Julho de 2016.
- ABID-ESSEF, S.; OUANES, Z.; HASSEN, W.; BAUDRIMONT, I.; CREPPY, E.; BACHA, H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and proteins syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology*, v.18, n. 40, p. 467-674, 2004.
- ALBA, L.; MEDINA-ENRÍQUEZ, M. M.; CORDERO-RODRÍGUEZ, N. L.; RUIZ-CUELLO, T.; AGUILAR-FAISA, L.; TRUJILLO-FERRARA, J. G.; ALCÁNTARA-FARFÁN, V.; RODRÍGUEZ-PÁEZ, L. N- $\omega$ -chloroacetyl-L-ornithine has in-vitro activity against cancer cell lines and in-vivo activity against ascitic and solid tumors. *Copyright*, v. 32, n. 43, p. 508-518, 2016.
- AL-OQAIL, M. M.; FARSHORI, N. N.; AL-SHEDDI, E. S.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; SIDDIQUI, M. A. In Vitro Cytotoxic Activity of Seed Oil of Fenugreek Against Various Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.14, n.209, p. 1829-1832, 2013.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-185.aspx?slp=1>>. Acesso em: 2 de agosto de 2016.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. B.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, n.1, p.118-129, 2005.
- ANDRADE, T. M.; MELO, A. S.; DIAS, R. G. C.; VARELA, E. L. P.; OLIVEIRA, F. R.; VIEIRA, J. L. F.; ANDRADE, M. A.; BAETAS, A. C.; MONTEIRO, M. C.; MAIA, C. S.F. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, p. 604–610, 2012.
- ANTUNES, T. V.; FREITAS, R. F.; ROYO, V. A. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae). *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 14, n. 1, p. 448-457, 2016.

- AZEVEDO, J. L. Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, v.13, p. 12–15, 1997.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BEZERRA, J. N. F. *Composição química, atividade fitonemática e inseticida de tipi (Petiveria alliacea)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- BIOLEGEND. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI. Disponível em: <[http://www.biolegend.com/pop\\_pdf.php?id=8230](http://www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=8230)>. Acesso em: 22 de junho de 2016.
- BLAINSKI, A.; PICCOLO, V. K.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v.128. n.2, p.541-544, 2010.
- BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; HICKS, J. B. Transformatio in yeast: development of a hybridcloning vector and isolation of the CAN1 gene. *Gene*, v.8, p. 121- 133, 1979.
- CAMARGO, M. T. L. A. Amansa Senhor: A arma dos negros contra seus senhores. *Revista Pós Ciências Sociais*, v.4, n.8, 2007.
- CIFUENTES, M. C.; CASTAÑEDA, D. M.; URUEÑA, C. P.; FIORENTINO, S. A fraction from *Petiveria alliacea* induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and regulates HSP70 expression. *SCIENTIARUM*, v. 14, n. 2-3, p. 125-134, 2009.
- CHEN, T.; CHEN, K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. *International Journal of Biology*, v. 1, n. 2, p. 41-47, 2009.
- CHEN, X. J., CLARK-WALKER, D. The *petite* mutation in yeasts: 50 years on. *In tRev Cytol*, v. 194, p. 197-238, 2000.
- CRUZ, L. O. *Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do extrato metanólico de folhas de Chrysobalanus icaco L.* 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- DEVIENNE K. F.; RADDI M. S. G.; POZETTI G. L. Das plantas medicinais ao fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 6, n.3, p. 11-14, 2004.
- DOMÍNGUEZ, D. R.; HEREDIA, L. B.; MARTÍNEZ, E. C.; LORES, R. I. Efecto del extracto hipoglicémico de *Petiveria alliacea* L sobre el consumo de glucosa por los eritrócitos. *Revista Cubana Invest Biomed*, v.21, n. 3, 2002.
- FERNÁNDEZ FREIRE, P.; LABRADOR, V.; PÉREZ MARTÍN J. M.; HAZEN, M. J. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*, v. 210, n. 1, p. 37-44, 2005.

- FIDALGO, T. K. S.; BARCELOS, R.; PETRÓPOLIS, D. B.; AZEVEDO, B. R.; PRIMO, L. G.; SILVA FILHO, F. C. Citotoxicidade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. *Revista Gaúcha de Odontologia*. Porto Alegre. v. 57, n.3, p. 317-321, 2009.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multi Ciência: construindo a história dos produtos naturais*, v. 7, 2006.
- FOGG, V. C.; LANNING, N. J.; MACKEIGAN, J. P. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese of Journal of Cancer*, v.30, n.8, p.526-539, 2016.
- FOURY, F. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, v. 1, n. 195, p. 1-10, 1997.
- FUMAGALI, E.; APARECIDA C. G., R.; DE FÁTIMA, P. S. M. M; JOSÉ, V., G; JOSÉ B. O., A. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- FRIÓN-HERRERA, Y.; DÍAZ-GARCÍA, A.; RUIZ-FUENTES, J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, H.; SFORCIN, J. M. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *Journal of Pharmacy*, v. 67, n. 121, p. 1448-1456, 2015.
- FRONZA, G.; CAMPOMENOSI, P.; IANNONE, R.; ABBONDANDOLO, A. The 4-nitroquiniline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res*, v. 6, n. 6, p. 1283-1287, 1992.
- GADELHA, C. S.; PINTO JR, V. M; BEZERRA, K. K. S.; PEREIRA, B. B. M.; MARACAJÁ, P. B. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. *Revista Verde (Mossoró – RN)*, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.
- GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta botânica brasílica*, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.
- GLADARI, S.; RAHMANA, A.; PALLICHANKANDYA, S. THAYYULLATHILA, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 104, p. 144-168, 2017.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. Plantas Mediciniais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GUEDES, R. C. M.; NOGUEIRA, N. G. P.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Atividade Antimicrobiana de Extratos Brutos de *Petiveria alliacea* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 4, p. 520-524, 2009.
- GUERRA, M. P.; NORADI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográfico, legais e éticos. *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*, 3ª edição. p.13-26, 2001.
- GUTIÉRREZ, R. M. P. Antiallergic activity of ethanol extract from *Petiveria alliacea*. *Journal of Natural Remedies*, v. 5, n. 2, p. 165 – 169, 2005.
- GUO, G.; YUE, L.; FAN, S.; JING, S.; YAN, L. J. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Purslane Seed Oil. *Public Health & Safety*, v. 32. n. 98. p. 1-19, 2016.
- HERNÁNDEZ, J. F.; URUEÑA C. P.; CIFUENTES, M. C.; SANDOVAL, T. A.; POMBO, L. M.; CASTAÑEDA, D.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. A *Petiveria alliacea* standardized fraction induces breast adenocarcinoma cell. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, p. 641–649, 2014.
- HEUDE, M.; FABRE, F. Alpha-control of DNA repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and physiological aspects. *Genetics*, v. 133, p. 489–498, 1993.
- JÚNIOR, C. V. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. *Química Nova*, v. 26, n. 3. São Paulo, 2003.
- KIM, J. H.; LEE, S. C.; RO, J.; KANG, H. S.; KIM, H. S.; YOON, S. Jnk signaling pathway-mediated regulation of Stat3 activation is linked to the development of doxorubicin resistance in cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology*, v. 3 n. 79, p. 373-80, 2010.
- KIM, S.; KUBEC, R.; MUSAH, R.A. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 188–192, 2006.
- KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R. A. S-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea*—part II. *Phytochemistry*, v. 61, p. 675–680, 2002.
- LOPES-MARTINS, R. A. B.; PEGORARO, D. H.; WOISKY, R.; PENNA, S. C.; SERTIÉ, J. A. A. The anti-Inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine*, v. 84, p.245-248, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

LOWE, H. I. C.; FACEY, C. O. B.; TOYANG, N. J.; BRYANT, J. L. Specific RSK Kinase Inhibition by Dibenzyl Trisulfide and Implication for Therapeutic Treatment of Cancer. *Anticancer Research*, v. 34, p. 1637-1642, 2014.

LUZ, D. A.; PINHEIRO, A. M.; SILVA, M. L.; MONTEIRO, M. C.; PREDIGER, R. D.; MAIA, C. S. F.; FONTES- JUNIOR, E. A. Ethnobotany, phytochemistry and neuro pharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, n.185, p.182–2016, 2016.

MAGER, W. H.; WINDERICKX, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacological Sciences*, v. 5, n. 26, p. 265-273, 2005.

MAIA, C. S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C. & PONTES FILHO, N. T. Analysis of fetal and placental development in rats after administration of hydroalcoholic extract from the root of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *International Journal of Morphology*, v. 28, n. 1, p. 165-169, 2010.

MATIJEKOVÁ, A.; SYCHROVÁ, H. Biogenesis of *Candida albicans* Can 1 permease express in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letter*, v. 408, p. 89- 93, 1997.

MELO, R. G.; LEITÃO, A. C.; PÁDULS, M. Role of OGG1 and NTG2 in the repair of oxidative DNA damage and mutagenesis induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: relationships with transition metals iron and copper. *Yeast*, v. 21, n. 12, p. 991-1003, 2004.

MORAES, K. S.; GIUBEL, S. R.; SILVEIRA, G. F.; COMUNELLO, L.; OLIVEIRA, C. B.; GOSMANN, G.; BUFFON, A.; BRUNO, A. N. Inibição da viabilidade de células tumorais de câncer de útero humano após tratamento com extratos vegetais nativos brasileiros. *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Campus Porto Alegre*, 2011.

MURRAY, J.; PICKING, D.; LAMM, A.; MCKENZIE, J.; HARTLEY, S.; WATSON, C.; WILLIAMS, L.; LOWE, H.; DELGODA, R. Significant inhibitory impact of dibenzyl trisulfide and extracts of *Petiveria alliacea* on the activities of major drug-metabolizing enzymes in vitro: An assessment of the potential for medicinal plant-drug interactions. *Fitoterapia*, v. 111, n. 14, p. 138-146, 2016.

OGUR, M.; JOHN, R.; NAGAI, S. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration efficiency in yeast. *Science*, v. 321, p. 928-929, 1957.

- OLIVEIRA, F. G. *Avaliação antifúngica, farmacognóstica e toxicológica sazonal de *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)*. 2012. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Univeridade Federal do Pará, 2012.
- OPEKAROVÁ, M.; CASPARI, T.; PINSON, B.; BRÉTHES, D.; TANNER, W. Post-translational fate of CAN1 permease of *Saccharomyce scerecisiae*. *Yeast*, v. 14, p. 215-224, 1998.
- PÁDULA, M.; SLEZAK, G.; AUFFRET VAN DER KEMP, P.; BOITEUX, S. The port-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerecisiae*. *Nucleic Acids Research*, v. 17, n. 32, p. 5003-5010, 2004.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.
- ROCHE APPLIED SCIENCE. Cell proliferation reagente WST-1. Disponível em: <<http://www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-2/J2-2.pdf>> Acesso em: 02 de Agosto de 2016.
- RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human Hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 335–339, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Extraction and purification of plasmid DNA. In *Molecular cloning: a laboratory manual. Book 3, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Habor Laboratory*, 1989.
- SANTANDER, S. P.; HERNÁNDEZ, J. F.; CIFUENTES, C. B.; AOKI, M.; MOINS-TEISSERENC, H.; FIORENTIN, S. Immunomodulatory Effects of Aqueous and Organic Fractions from *Petiveria alliacea* on Human Dendritic Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 40, n. 4, p. 833–844, 2012.
- SANTOS, F. J. B.; MOURA, D. J.; PERES, V. F.; SPEROTTO, A. R. M.; CARAMÃO, L. B.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; SAFFI, J. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 144, p. 474–482, 2012.
- SANTOS, G. S. *Avaliação do efeito radio modificador da própolis em células de ovário de hamster chinês (cho-k1) e em células tumorais de próstata (pc3), irradiadas com co-60*. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2011.



- SANTOS, J. B., SILVEIRA, T. P., COELHO, P. S., COSTA, O. G., MATTA, P. M., SILVA, M. B., DRUMOND NETO, A. P. Interferências de plantas daninhas na cultura do quiabo. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 28, n. 2, p. 255-262, 2010.
- SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. *Cancer Journal for Clinicians*, v. 66, p. 7–30, 2016.
- SILVA, C. R. *Avaliação dos efeitos biológicos da Caricapapaya L. (papaína), Cassia angustifolia (Sene), Bauhinia forficata (Pata de vaca) e Uncaria tomentosa Willd. DC (Unha de gato) em sistemas in vitro e in vivo*. 2006. Tese (Doutorado em Biociências nucleares) - Universidade de do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- SILVA, C. R.; ALMEIDA, G. S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; LEITÃO, A. C.; PADULA, M. Influence of Ogg1 repair on the genetic stability of ccc2 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* chemically challenged with 4-nitroquinoline-1- oxide (4-NQO). *Mutagenesis Advance*, 2015b.
- SILVA, J.P.B.; OLIVEIRA, F.R.; PAIXÃO, T.P.; MALCHER, N.S.; SANTOS, P.C.; BAETAS, A.C.; BATITTUCI, M.C.P.; MONTEIRO, M. C.; ANDRADE, M. A. In vitro and in vivo assessment of genotoxic activity of *Petiveria alliacea*. *Pharmacy and Pharmacology*, v.10, n. 34, p. 718-727, 2016.
- SILVA, M. L.; LUZA, D. A.; PAIXÃO, T. P.; SILVA, J. P.; BASTOS B.; BELÉM-FILHO, I. J. A.; FERNANDES, L. M. P.; GONÇALVES, A. C. B.; FONTES-JÚNIORA, E. A.; ANDRADE, M. A.; MAIA, C. S. F. *Petiveria alliacea* exerts mnemonic and learning effects on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 169 p. 124–129, 2015a.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. *Porto Alegre/Florianópolis*, 5<sup>th</sup>. ed. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.
- SINGH, K. K.; SIGALA, B. SIKDER, H. A.; SCHWIMMER, C. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* OGG1 DNA repair gene leads to an increased frequency of mitochondrial mutants. *Nucleic Acids Reserach*, v. 6, n. 29, p. 1381- 1388, 2001.
- SLETTA, H.; KLINKENBERG, G.; WINNBERG, A.; KVITVANG, H. F. N.; NILSEN, M. B.; KROKAN, H. E.; OTTERLEI, M.; BRUHEIM, P. A new high resolution screening method for study of phenotype stress responses of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Journal of Microbiological Methods*, v. 87, p. 363–367, 2011.

SRIVASTAVA, R. K.; LOHANI, M.; PANT, A. B.; RAHMAN, Q. Cyto-genotoxicity of amphibole asbestos fibers in cultured human lung epithelial cell line: role of surface iron. *Toxicol Ind Health*, v. 26, n. 9, p. 575-82, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TERZIYSKA, A.; WALTSCHWA, L.; VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environ Pollut*, v. 1, p. 43- 52, 2000.

THOMAS, D.; SCOT, A. D.; BARBEY, R.; PÁDULA, M.; BOITEUX, S. Inactivation of OGG1 increases the incidence of G-C: T- A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet*, v. 254, p. 171-178, 1997.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit Growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 45, p. 1-17, 2008.

WHELAN, W. L.; GOCKE, E.; MANNEY, T. R. The Can 1 Locus of *Saccharomyces cerevisiae*: five structure analysis and forward mutation rate. *Genetics*, v. 91, p. 35-51, 1979.

## APÊNDICE - Preparo de soluções e meios de cultura

Todos os reagentes para o cultivo da linhagem celular em estudo foram das marcas Gibco, Cultilab e Invitrogen. Os reagentes foram preparados conforme exposto nos Quadros 1 a 6.

Já os meios e soluções empregados na cultura de levedura, foram preparados conforme orientações contidas em Melo; Leitão; Pádula (2004), Pádula et al., 2004, Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989), Silva et al, (2015b). Suas composições encontram-se listadas nos Quadros 7 ao 13. Os reagentes foram adquiridos da “DifcoLab” e/ou Sigma (EUA) e da ReagenQuimibrás Indústrias Químicas S.A. (Brasil).

**Quadro 2: Meio F12 e MEM**

Reagentes	Quantidade
F12 desidratado / MEM desidratado	1 pacote/1000 mL
Bicarbonato de sódio	2,2g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Pesar 2,2 g de bicarbonato de sódio para cada litro de meio, logo em seguida medir o pH, que deve estar entre 7,2 e 7,4 e depois filtrar o meio. Conservar em geladeira.

**Quadro 3: Tampão PBS**

Reagentes	Quantidade
PBS	1000 g
Água destilada(q.s.p.)	1000 mL

Medir o pH para que esteja entre 7,2 a 7,4. Distribuir 250mL/garrafa e submeter a esterilização em autoclave por 20 minutos, a 121°C. Após a esterilização, conservar em geladeira.

**Quadro 4: Tripsina-EDTA (0,1%:0,01%)**

Reagentes	Quantidade
Tripsina	1,0 g
Base Dulbecco	100 mL
EDTA	0,1 g
Vermelho fenol	100 µL
Água destilada (q.s.p.)	1000mL

Acrescentar todos os reagentes, ajustar o pH para 7,5 e em seguida filtrar. Conservar em geladeira.

**Quadro 5:** Suplementação do meio F12 e MEM

Reagentes	Quantidade
Soro fetal bovino (SFB)	10%
Gentamicina	5 mg/mL
Fungizona	0,0025 mg/mL
qsp F12 / MEM	20mL

Descongelar os materiais armazenados no freezer (-20°C) em banho Maria a 37°C. Na sequência, deve-se verter no frasco que contém o meio de cultura.

**Quadro 6:** Soluções para Ensaio de Recuperação Clonogênica

Soluções	Reagentes	Quantidade
Fixação	Metanol	20mL
	Ácido acético	20mL
	Água destilada	200mL
Solução A	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35g
	Água destilada	250mL
+ Solução B	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35,49g
	Água destilada	250mL
	Giensa	10mL

Preparar as soluções (A e B) e retirar 50,8mL e 49,2mL respectivamente. Misturar esses volumes com 10mL de Giensa para obter a solução corante. Ajustar o pH para 7,4.

**Quadro 7:** Solução de Glicose 20%

Reagentes	Quantidade
Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	100 g
Água destilada (q.s.p)	500 mL

Distribuir 100mL/garrafa e submeter a esterilização em autoclave por 20 minutos, a 121°C. Após a esterilização, manter em temperatura ambiente.

**Quadro 8:** Meio de Cultura – YPG líquido

Reagentes	Quantidade
Bacto-Peptona	10 g
Extrato de levedura	10 g
Água destilada (q.s.p)	900 mL

Distribuir 90mL/frasco e submeter a esterilização em autoclave por 20 minutos, a 121°C. Para utilização de meio YPG líquido, acrescentar ao frasco de 90mL, 10mL de solução de glicose 20% estéril.

**Quadro 9:** Meio de Cultura – YPG gelificado

Reagentes	Quantidade
Bacto-Peptona	10 g
Extrato de levedura	10 g
Agar	20g
Água destilada (q.s.p)	900 mL

Submeter a esterilização em autoclave por 20 minutos, a 121°C. Após a esterilização, os 900mL de meio são mantidos a 60°C, suplementado com 100mL de solução estéril de glicose (20%) e distribuído em placas de Petri estéreis descartáveis (~20mL/placa).

**Quadro 10:** Meio de Cultura – YNBD sólido

Soluções	Reagentes	Quantidade
1	YNB	7 g
	Água destilada (q.s.p)	200 mL
2	Agar	20 g
	Água destilada	500 mL
3	Glicose	20 g
	Água destilada (q.s.p)	250 mL

Obs: Submeter as soluções à esterilização em autoclave separadamente por 20 minutos, a 121°C. Para preparação do meio YNBD-canavanina, após esterilização em autoclave, as soluções 1, 2 e 3, mantidas a 45°C, foram misturadas. Em seguida, foram acrescentadas 10mL das soluções de aminoácidos e/ou base (de acordo com as auxotrofias da cepa de levedura) e 60mg de canavanina. Agitar o meio até a canavanina estar completamente dissolvida e distribuir em placas de Petri estéreis descartáveis (~20ml/placa).

**Quadro 11:** Soluções de aminoácidos e base para suplementar meio de cultura YNBD-canavanina

Soluções	Reagentes	Quantidade
Ura	Uracila	0,2 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,5 g
	Água destilada	100 mL
His	Histidina	2 g
	Água destilada	100 mL
Leu	Leucina	1 g
	Água destilada	100 mL
Lis	Lisina	0,4 g
	Água destilada	100 mL
Trp	Triptofano	0,2 g
	Água destilada	100 mL

Obs: Colocar cada solução em um frasco escuro e submetida a esterilização em autoclave por 15 minutos, a 121°C. Após a esterilização, manter os frascos a temperatura ambiente e protegido da luz.

**Quadro 12:** Tampão fosfato gelosado para visualização de mutantes respiratórios  
(colônias *petites*)

Reagentes	Quantidade
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,55 g
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	14,64 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Obs: Aliquotar 900mL em cada frasco e adicionar 1g de agar. Autoclavar por 20 minutos, a 121°C. Para a visualização de mutantes respiratórios, acrescentar 10mL de TTC a 90mL de tampão fosfato gelosado, mantido a 60°C e distribuir 6-8mL/tubo.

**Quadro 13:** Solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para detecção  
de mutantes respiratórios (colônias *petites*)

Reagentes	Quantidade
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,355 g
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	1,464 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Obs: Autoclavar em frasco escuro, por 20 minutos, a 121°C. Acrescentar 1g de cloreto 2,3,5-trifeniltetrazolio e dissolver em banho maria.