



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

Verônica Botelho Maciel

**Avaliação da toxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos de folhas de
Petiveria alliacea Linnaeus em *Escherichia coli* e DNA plasmidial**

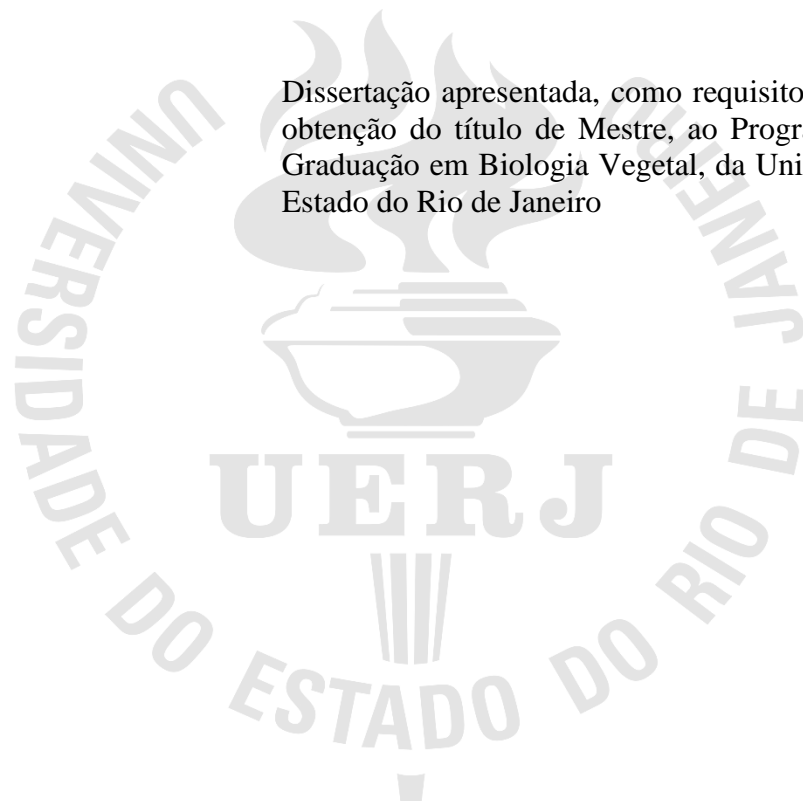
Rio de Janeiro

2017

Verônica Botelho Maciel

**Avaliação da toxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos de folhas de
Petiveria alliacea Linnaeus em *Escherichia coli* e DNA plasmidial**

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. José Carlos Pelielo de Mattos

Coorientadora: Prof.^a Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araujo

Rio de Janeiro

2017

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

M152 Maciel, Verônica Botelho.
Avaliação da toxicidade de extratos etanólicos de folhas de *Petiveria alliacea* Linnaeus em *Escherichia coli* e DNA plasmidial. / Verônica Botelho Maciel. – 2017.
74 f. : il.

Orientadores: José Carlos Pelielo de Mattos, Rachel Fátima Gagliardi Araujo

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

1. *Petiveria alliacea* - Teses. 2. Toxicidade - Teses. 3. *Escherichia coli* - Teses. I. Mattos, José Carlos Pelielo de. II. Araujo, Rachel Fatima Gagliardi. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. V. Título.

CDU 582.664.3

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

09 / 11 / 2022

Data

Verônica Botelho Maciel

**Avaliação da toxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos de folhas de
Petiveria alliacea Linnaeus em *Escherichia coli* e DNA plasmidial**

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: 05 de julho de 2017.

Orientadores:

Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araujo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

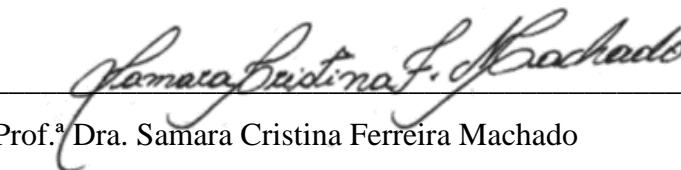
Banca examinadora:



Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



Prof.^a Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



Prof.^a Dra. Samara Cristina Ferreira Machado
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família,
Elizete, Jorge e Marcelo,
pelo apoio, dedicação, amor e ensinamentos.
Se aqui estou, devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo sopro de vida.

Ao orientador, José Carlos Pelielo de Mattos, que com muita paciência me ensinou e me conduziu no mundo científico, desde a iniciação científica. Sempre presente e disposto a me ajudar no decorrer de toda a jornada. Muito obrigada ZKK!

À coorientadora, Rachel Fátima Gagliardi Araujo, por ter confiado a mim a parte dos efeitos biológicos com *E. coli* do projeto *Petiveria alliacea*. E por me acalmar quando achava que estava perdendo as rédeas do controle; após nossas conversas sempre ficava mais tranquila e confiante. Valeu Rachelzinha!

Ao Adriano Caldeira de Araújo (*in memoriam*), por todos os ensinamentos.

Aos Professores que aceitaram o convite para participar da banca examinadora deste trabalho.

À minha família e familiares pelo apoio, incentivo nas minhas decisões, permanecendo sempre presentes nos momentos difíceis e me ajudando a superar todos os obstáculos.

Ao Vitor Ikawa, Amorzinho, obrigada pelo incentivo, apoio, carinho e parceria. Agradeço também pelo ótimo acolhimento pela família Ikawa.

À Renata Sarkis que me incentivou bem no início desta jornada, ainda na graduação, e me indicou ao Laboratório de Radio e Fotobiologia.

Aos amigos do laboratório Murata, Eduardo, Thaís, Nathalia, Mariana, Maurício, Gabriel, Bruna, Luana, Letícia, Laís, Simone, Márcia, Claudia, Flávio pela amizade, pelos momentos de descontração, divisão de bancadas e tarefas, ajuda nos experimentos e também com ideias, críticas e puxões de orelha. Que o espírito do coleguismo perdure e só aumente no ambiente de trabalho.

À Bianka Soares e Jamine Pettinelli, obrigada por sempre estarem dispostas a ajudar e pelos ensinamentos. Vocês são anjos no assunto *Petiveria alliacea*. Estendo minha gratidão a todos os membros do Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais e do Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas.

Aos farmacêuticos, Eduardo Fonseca e Iranilda Calado, pela ajuda com os extratos e partições.

À Raphaela Tierno, realizar as disciplinas e compartilhar as novidades burocráticas com você deixou o mestrado mais ameno. Obrigada pelas gargalhadas e por ouvir meus desabafos.

À Paulo Thiago, grata pela ajuda nos momentos de desespero com as análises dos resultados. Você é um fofo.

À Paulo Vinicius, figura impar, pelo apoio em diversos momentos. Como faz falta a convivência diária contigo e ouvir as histórias com situações que só acontecem com você.

Aos amigos Monique e Eduardo parceiros desde o Ensino Médio, que geraram bons frutos, como o sobrinho amado, Daniel, e a amizade com Liliane e Tadeu. No final das contas viramos uma grande família! Obrigada pela compreensão de algumas vezes “tenho experimento”, “estou no laboratório contando bactérias” ou “estou escrevendo”. Nessa grande família têm muitos outros nomes envolvidos, minha gratidão a todos.

Aos amigos que a FFP me deu Ana Angélica, George Azevedo, Stephanie Maia e Guilherme Tavares.

Aos meus amores felinos, Fred e Siegfried, por serem gatos tão amáveis e por encherem minha vida de alegrias e pelos. Nos momentos em que escrevi este trabalho, por inúmeras vezes, Siegfried dividiu a bancada com o teclado e Fred aqueceu meus pés.

As agências de fomento, CAPES, pela bolsa concedida e FAPERJ, pelo auxílio financeiro ao projeto.

Agradeço quem mais possa ter passado pela minha vida, que tenha colaborado em qualquer etapa da minha formação e, por ventura, eu possa ter esquecido de mencionar.

A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original

Albert Einstein

RESUMO

MACIEL, V.B. **Avaliação da toxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos de folhas de *Petiveria alliacea* Linnaeus em *Escherichia coli* e DNA plasmidial.** 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Petiveria alliacea L. é uma planta herbácea pertencente à família Phytolaccaceae, nativa da região amazônica e conhecida popularmente como amansa-senhor, piu-piu e guiné. É amplamente utilizada na medicina popular com diversas atividades terapêuticas, tais como, analgésica, antibacteriana, propriedades antifúngicas e hipoglicêmicas. No entanto, seus efeitos toxicológicos não estão bem elucidados, havendo necessidade de mais investigações nesta área. O objetivo do presente trabalho é avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de extratos brutos etanólicos de folhas de *P. alliacea* em *Escherichia coli* e DNA plasmidial. As folhas de plantas coletadas no Rio de Janeiro (22° 53' 55,95''S e 43° 05' 09,37W) foram secas a 50 °C durante 24 horas e submetidas à preparação do extrato bruto etanólico por infusão, seguido de evaporação rotatória. A fim de avaliar o potencial citotóxico do extrato, foram utilizadas culturas de *E. coli* selvagem (AB1157) incubadas com diferentes concentrações do extrato da planta (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL) durante 60 minutos. A análise da genotoxicidade foi avaliada *in vitro* através de eletroforese, em gel de agarose, de DNA plasmidial (pUC 9.1). Além disso, a ação genotóxica também foi medida pela alteração da capacidade transformante do plasmídeo pUC 9.1 em células bacterianas e por eletroforese em gel de agarose de DNA de *E. coli* incubada com o extrato. O potencial mutagênico foi analisado através da indução de resistência à rifampicina em bactérias incubadas com o extrato etanólico de *P. alliacea* e a citotoxicidade das partições do extrato foi avaliada qualitativamente pelo teste de difusão em agár. Os resultados indicam que o extrato de folhas foi citotóxico, em função do tempo de incubação, apenas nas concentrações 15, 20, 25 e 30 mg/mL ($p < 0,05$). A análise eletroforética indica que o extrato promove quebras no DNA genômico, mas parece não induzir quebras no DNA plasmidial, embora haja um retardo no padrão de migração em função do aumento da sua concentração. Porém, não houve alteração no número de células transformadas pelo plasmídeo, após a incubação com o extrato. O extrato não apresentou ação mutagênica e suas partições não foram citotóxicas.

Palavras chaves: Bactéria gram-negativa. Genotoxicidade. Plantas medicinais.

ABSTRACT

MACIEL, V.B. Evaluation of the toxicity and mutagenicity of ethanolic extracts of *Petiveria alliacea* Linnaeus leaves on *Escherichia coli* and plasmid DNA. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Petiveria alliacea L. is an herbaceous plant, included to the family Phytolaccaceae, native to the Amazonic region and popularly known “amansa-senhor”, “piu-piu” e “guiné”. It is widely used in popular medicine with several therapeutic activities, such as, analgesic, antibacterial, antifungal and hypoglycemic properties. However, their toxicological effects are not well elucidated. The objective of the present study is to evaluate cytotoxicity and the genotoxicity of crude ethanolic extracts of leaves of *P. alliacea* in *Escherichia coli* and plasmid DNA. The leaves of plants collected in Rio de Janeiro (22° 53' 55.95''S and 43° 05' 09.37W) were dried to 50 °C during 24 hours and submitted to the preparation of the crude ethanolic extract by infusion, followed by rotary evaporation. In order to evaluate the cytotoxic potential of the extract, cultures of *E. coli* wild-type (AB1157) were incubated with different concentrations of the plants extract (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL), for 60 minutes and the survival fractions were obtained. The genotoxicity was performed through agarose gel electrophoresis using both bacterial DNA and pUC9.1 plasmid DNA. Besides, the plasmid transformation efficiency was also evaluated. The obtained data indicate that the *P. alliacea* ethanolic leaves extract shown a cytotoxic effect only in high concentrations tested. It could be linked to DNA strand breaks *in vivo*, observed after bacterial DNA electrophoresis. However, the agarose gel electrophoresis of plasmid DNA incubated with different extract concentrations did not show strand breaks, but a crescent delay in DNA migration through the agarose gel. Besides, incubation of plasmid DNA with *P. alliacea* extract was not able to change the transformation efficiency. The *P. alliacea* ethanolic extract did not show mutagenic activity and its partitions not shown cytotoxic action. Together, the results suggest that *P. alliacea* possess a toxic potential that could be responsible to DNA lesions and decreasing in bacterial survival. The lack of DNA damage and absence of alterations in transformations assay indicate that bacterial metabolism could be responsible for chemical modifications in the extract compounds, leading to DNA damage and bacterial death.

Keywords: Gram-negative bacteria. Genotoxicity. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ramo vegetativo e reprodutivo com detalhes das flores, folha, semente e estame de <i>Petiveria alliacea</i> L.	21
Figura 2 - Distribuição geográfica da <i>Petiveria alliacea</i> L.	21
Figura 3 - Fórmula estrutural dos compostos organosulfurados	25
Figura 4 - Fluxograma de possibilidades de reparo do DNA em resposta à exposição a agentes físicos ou químicos	27
Figura 5 - Esquema geral da obtenção do extrato etanólico bruto e das partições	35
Figura 6 - Esquema representativo da obtenção das culturas bacterianas AB1157	37
Figura 7 - Esquema representativo da sobrevivência de <i>E. coli</i> AB1157 ao extrato etanólico de <i>P. alliacea</i>	37
Figura 8 - Representação esquemática da técnica de eletroforese em gel alcalino de agarose	39
Figura 9 - Esquema da migração das três formas do plasmídeo no gel de agarose submetido a eletroforese	40
Figura 10 - Etapas de extração do DNA plasmidial utilizando o kit de extração plasmidial	42
Figura 11 - Esquema representativo de todas as etapas da avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial	43
Figura 12 - Representação esquemática da técnica de transformação bacteriana	44
Figura 13 - Esquema representativo do ensaio da mutagênese pela rifampicina	45
Figura 14 - Esquema representativo da viabilidade qualitativa das partições do extrato	46
Figura 15 - Citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> (5-15 mg/mL) com <i>E. Coli</i> , AB1157	51
Figura 16 - Citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de <i>P. alliacea</i> (20-30 mg/mL) com <i>E. Coli</i> , AB1157	52
Figura 17 - Eletroforese em gel alcalino de agarose (0,76 %) e análise densitométrica de DNA genômico de <i>E. coli</i> (AB1157) incubado após 60 minutos com extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> (5-30 mg/mL)	53
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) com plasmídeo pUC 9.1 incubado após 60 minutos com extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> (5-30 mg/mL)	54

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) com plasmídeo pUC 9.1 incubado após 60 minutos com extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> (5-15 mg/mL) e SnCl ₂	55
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) com plasmídeo pUC 9.1 incubado após 60 minutos com extrato etanólico de <i>P. alliacea</i> (20-30 mg/mL) e SnCl ₂	55
Figura 21 - Gráfico com as porcentagens de transformação bacteriana	56
Figura 22 - Frequência de mutantes induzidos pelo extrato e H ₂ O ₂ em <i>E. coli</i> AB1157 .	57
Figura 23 - Viabilidade qualitativa das partições do extrato em <i>E. coli</i> AB1157	59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas, características genéticas relevantes e antibiótico de resistência	36
Quadro 2 -	Soluções utilizadas no preparo dos extratos	48
Quadro 3 -	Meios de cultura e soluções utilizadas na obtenção das culturas bacterianas	48
Quadro 4 -	Soluções utilizadas determinação do potencial genotóxico dos extratos em células bacterianas	48
Quadro 5 -	Soluções utilizadas na avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial	49
Quadro 6 -	Soluções utilizadas na transformação bacteriana	49
Quadro 7 -	Soluções utilizadas no ensaio da mutagênese pela rifampicina com a cepa AB1157	50
Quadro 8 -	Reagentes utilizados na viabilidade qualitativa das partições do extrato	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agarose LMP	Agarose <i>Low Melting Point</i>
Agarose NMP	Agarose <i>Normal Melting Point</i>
ANOVA	Análise de variância
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG-DIC	Cromatografia em fase gasosa de detecção de ionização de chama
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa
CL ₅₀	Concentração Letal de 50 %
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DTS	Trissulfeto de dibenzila
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FS	Fração de sobrevivência
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50 %
LB	Meio Lúria-Bertani
LPPN	Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
N/No	Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RNAase	Ribonuclease
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SnCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto estanoso
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tampão tris-acetato EDTA

TE	Solução tris-EDTA
Tris-Cl	Trisaminometano
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium 1</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Plantas medicinais	17
1.2	<i>Petiveria alliacea L.</i>	20
1.3	Etnobotânica	22
1.4	Metabólitos secundários	23
1.4.1	<u>Fitoquímica</u>	24
1.5	Efeitos biológicos	26
2	OBJETIVOS	32
2.1	Geral	32
2.2	Específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Material vegetal	33
3.2	Preparo dos extratos etanólicos brutos	33
3.2.1	<u>Partição do extrato bruto</u>	34
3.3	Cepas Bacterianas	36
3.3.1	<u>Conservação das cepas bacterianas</u>	36
3.3.2	<u>Obtenção das culturas bacterianas</u>	36
3.4	Determinação do potencial citotóxico do extrato em células bacterianas .	37
3.5	Determinação do potencial genotóxico do extrato em células bacterianas	38
3.6	Avaliação do potencial genotóxico do extrato em DNA plasmidial	40
3.7	Transformação bacteriana	43
3.7.1	<u>Preparação das bactérias competentes</u>	43
3.7.2	<u>Transformação bacteriana com os plasmídeos pUC 9.1</u>	44
3.8	Ensaio de mutagênese pela rifampicina com a cepa AB1157	45
3.9	Viabilidade qualitativa das partições do extrato	46
3.10	Análise estatística	47
3.11	Meios de cultura e soluções	48
4	RESULTADOS	51
4.1	Determinação do potencial citotóxico do extrato em células bacterianas .	51
4.2	Determinação do potencial genotóxico do extrato em células bacterianas	52

4.3	Avaliação do potencial genotóxico do extrato em DNA plasmidial	54
4.4	Transformação bacteriana com os plasmídeos pUC 9.1	55
4.5	Determinação do potencial mutagênico do extrato em células bacterianas	56
4.6	Viabilidade qualitativa das partições do extrato	57
	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÕES	63
	PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS	65

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é uma tradição milenar, presente em diversas populações de todo o mundo. Nas últimas décadas houve um aumento da utilização de produtos ditos “100% naturais”, atrelado a eles surgiu a ideia que não oferecem danos à saúde. Entretanto, as plantas medicinais apresentam substâncias bioativas que podem contribuir para cura de diversas enfermidades, mas também podem oferecer danos a saúde.

Nesse contexto, a *Petiveria alliacea* L. é uma planta herbácea, nativa da região amazônica. E é amplamente utilizada na medicina popular para tratar diversas doenças.

Apesar do seu uso ser bastante difundido, os efeitos toxicológicos não estão bem elucidados, havendo necessidade de mais investigações nesta área. Por isso, o presente estudo avalia a citotoxicidade e a genotoxicidade de uma planta medicinal através de extrato bruto etanólico de folhas de *P. alliacea* em *Escherichia coli* e DNA plasmidial.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Plantas medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

As plantas medicinais são as mais antigas ferramentas utilizadas em tratamento, cura e prevenção de enfermidades em humanos e outros animais. Inclusive, foi através de observações da natureza e do conhecimento empírico que o homem passou a buscar recursos que melhorassem sua condição de saúde para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência (OLIVEIRA & GOKITHI, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; PETROVSKA, 2012). Com o tempo, as razões para o uso de algumas plantas medicinais específicas para o tratamento de certas doenças foram sendo descobertos e, assim, o seu uso foi gradualmente abandonando o quadro empírico e tornou-se fundamentado em fatos explicativos e comprovações científicas (PETROVSKA, 2012).

Desde então as plantas medicinais vêm desempenhando um papel importante no tratamento de doenças em todo o mundo (FALLAH-HOSEINI et al., 2006). No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80 % da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Posteriormente a OMS também divulgou um plano estratégico para o desenvolvimento e a promoção da medicina tradicional. A medicina tradicional refere-se aos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas no cuidado com a saúde e manifestada em prevenções, diagnósticos ou tratamentos de doenças físicas e mentais, estando ou não integradas ao sistema de saúde predominante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim

como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final, acabado, embalado e rotulado” (JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) representou a legitimação da fitoterapia na rede pública de saúde. A abertura as novas opções terapêuticas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), simbolizou o resgate e a revalorização do conhecimento popular, pautado hoje, em saberes científicos que garantem sua eficácia e segurança (BECKER, 2011).

No Brasil, a população utiliza diversas plantas medicinais por tradição herdada dos índios e/ou dos escravos. Suas tradições foram passadas de geração em geração e foram difundidas como conhecimento ou sabedoria popular. Porém, diversos destes conhecimentos ainda não são pautados em saberes científicos que possam garantir a eficácia e segurança do uso. Há, também, o consumo de plantas medicinais concomitante com os medicamentos tradicionais (alopáticos) sem aviso ao médico. A falta de conhecimento sobre os efeitos medicinais e tóxicos das plantas são fatores preocupantes da automedicação (BECKER, 2011; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006; JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005; JUNIOR, 2008).

A população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais por tradição e ausência de alternativas econômicas viáveis, já nos países desenvolvidos nota-se um maior uso de fitomedicamentos influenciado pelos modismos de consumo de produtos naturais. Este modismo favoreceu a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para males como a impotência, a ansiedade e a obesidade, algumas vezes em um único extrato. O conceito mais perigoso surgido por esta época foi que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas através de séculos de utilização pela população de todo o mundo (JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005; JUNIOR, 2008). Como exemplo, na Alemanha a população consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa. A automedicação com plantas é a terapia alternativa mais comum, apesar de 70 % dos médicos em clínica geral prescreverem as centenas de ervas registradas, sendo que uma parte significativa destas é paga pelo seguro de saúde (MARTY, 1999; JUNIOR, 2008).

No Brasil há o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) cujo objetivo é “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas

medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. Dentre as diversas propostas do PNPMF destacam-se as de promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros; desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos nas diversas fases da cadeia produtiva; inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em consonância com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Em relação às regulamentações, para o PNPMF, o eixo das tradições em plantas medicinais deve ser direcionado a salvaguardar, preservar e apoiar os conhecimentos, práticas, saberes e fazeres tradicionais e populares em plantas medicinais, remédios caseiros e demais produtos para a saúde que se estruturam em princípios ancestrais e imateriais, no extrativismo sustentável e na agricultura familiar. A validação e garantias de segurança, eficácia e qualidade destes produtos são referendadas pela tradição. O incentivo, apoio e fomento ao aprimoramento técnico e sanitário de seus agentes, processos e equipamentos, poderão propiciar a inserção dos detentores destes saberes e de seus produtos no SUS e nos demais mercados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Porém, vale ressaltar a importância de novas pesquisas a fim de confirmar os efeitos conhecidos pelo uso popular das plantas.

O uso de fitoterápicos vem ganhando cada vez mais adeptos e um dos fatores que pode contribuir para isso é o fato de que diferentes classes profissionais podem prescrever fitoterápicos. O Conselho Federal de Farmácia na resolução nº 546 de 21 de julho de 2011, dispõe sobre a indicação farmacêutica de plantas medicinais e fitoterápicos isentos de prescrição e o seu registro. Já o Conselho Federal de Nutricionistas na resolução nº 526 de 11 de abril de 2015 regulamenta a prática da fitoterapia pelo nutricionista, atribuindo-lhe competência para prescrever plantas medicinais, drogas vegetais e fitoterápicos como complemento da prescrição dietética. Porém, a prescrição de plantas medicinais e chás medicinais é permitida a todos os nutricionistas, ainda que sem título de especialista. Já a prescrição de medicamentos fitoterápicos, de produtos tradicionais fitoterápicos e de preparações magistrais de fitoterápicos, como complemento de prescrição dietética, é permitida ao nutricionista desde que seja portador do título de especialista em Fitoterapia. Em linhas gerais, o nutricionista fica restrito ao diagnóstico nutricional (amparado pela Lei nº 8234 de 17/09/1921 onde é regulamenta a nutrição). O Conselho Federal de Medicina na resolução nº 1845/2008, regulamenta como médico nutrólogo aquele que adquirir título de

especialista em Nutrologia. Apesar desse aumento pela procura de fitoterápico e/ou plantas medicinais, ainda existe uma falta de conhecimento sobre as propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas das espécies, a fim de assegurar a eficácia e segurança desses compostos. Os critérios de eficácia e segurança de plantas medicinais estão relacionados a diferentes fatores, isto é, as plantas necessitam ser corretamente identificadas, cultivadas e coletadas, devem estar livres de material estranho, partes de outras plantas e contaminações inorgânicas e/ou microbianas (SOUZA-MOREIRA, SALGADO & PIETRO, 2010). Ou seja, a ampla utilização de plantas medicinais pela população em geral, para fins terapêuticos, muitas vezes sem comprovação científica de suas propriedades medicinais e/ou efeitos colaterais, torna relevante o desenvolvimento de novos projetos visando avaliar o potencial tóxico e mutagênico de extratos vegetais.

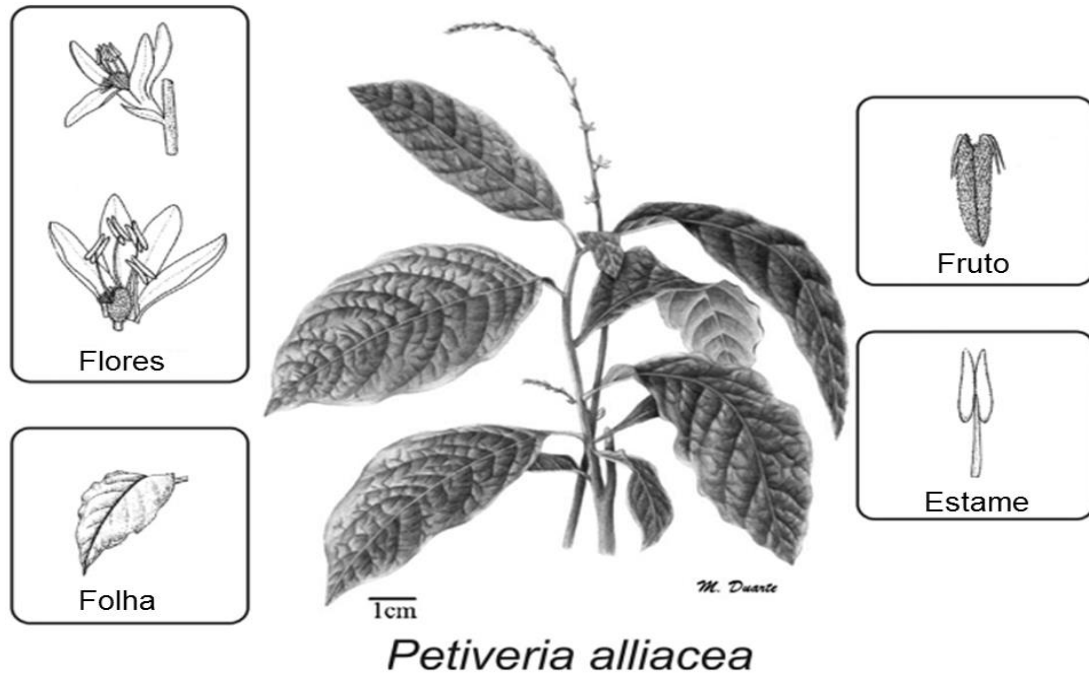
1.2 *Petiveria alliacea* L.

Petiveria alliacea L. é uma dicotiledônea perene e herbácea, que alcança até 1,5 m de altura, sendo preferencialmente associada a ambientes florestais. Apresenta haste rígida e reta, folhas lisas, alternas, elípticas e com forte aroma aliáceo. As flores são pequenas, bissexuadas, sésseis, de cor branca, ocorrendo em espigas terminais. Possui androceu com quatro estames e gineceu unicarpelar com ovário súpero. O fruto é aquênio, cilíndrico, achatado e dotado de espinhos que servem de meio de disseminação. Abaixo está descrita a classificação científica da planta e na figura 1 está representado um ramo vegetativo e reprodutivo com os seus respectivos detalhes (DUARTE & LOPES, 2005; CHASE & REVEAL, 2009).

Classificação científica da espécie *Petiveria alliacea* L.

Reino: Plantae
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Caryophyllales
Família: Phytolaccaceae
Gênero: *Petiveria*
Espécie: *P. alliacea* L.

Figura 1 - Ramo vegetativo e reprodutivo com detalhes das flores, folha, semente e estame de *Petiveria alliacea* L.



Fonte: Adaptado de DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016.

É nativa da Região Amazônica, com ocorrência em diversas regiões tropicais como a Amazônia, América Central e do Sul, as ilhas do Caribe e África Subsaariana. Em grande parte é cultivada para fins ornamentais e medicinais. No Brasil pode ser encontrada em todo o território, com populações concentradas em regiões de florestas pluviais (DUARTE & LOPES, 2005; CHASE & REVEAL, 2009). Na figura 2 está representada a distribuição geográfica da *P. alliacea*.

Figura 2 - Distribuição geográfica da *Petiveria alliacea* L.



Fonte: LUZ et al., 2016.

1.3 Etnobotânica

Petiveria alliacea L. é comumente conhecida como guiné, amansa-senhor, erva-alho ou pipi. Na medicina popular, folha, caule e raiz, em infusões ou decocções, são empregados como diurético, antiespasmódico, emenagogo, sedativo, analgésico e anti-inflamatório (DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016). Seu uso é bastante difundido em rituais afro-brasileiros, com o objetivo de afastar mau-olhado, maus espíritos, quebranto e trazer proteção (PANTOJA, SUL & MIGUEL, 2013; CAMARGO, 2007a).

No Brasil os efeitos da *P. alliacea* são conhecidos desde o tempo da escravidão. Durante os três séculos de tráfico escravo, houve uma miscigenação das culturas europeia, trazida pelos colonizadores, a dos indígenas locais e a dos escravos africanos, diversificando tradições culturais, artísticas, religiosas e também o conhecimento sobre plantas e ervas, empregadas desde a forma de temperos, encantando ao paladar dos senhores de engenho, até como elixires para a cura de males, tanto de caráter físico quanto espiritual (CAMARGO, 2007a; CAMARGO, 2007b; ALVES, 2012; PANTOJA, SUL & MIGUEL, 2013).

Da mesma maneira que detinham o conhecimento das plantas para promoverem o bem estar e a saúde, os africanos sabiam muito bem empregá-las também para provocar doenças e utilizar seus efeitos tóxicos. Este é caso do amansa-senhor, uma poção na qual a principal planta a que se faz referência é a guiné. Esta poção era uma das maneiras que os negros escravizados utilizavam para se defenderem das brutalidades praticadas pelos senhores de engenho. O amansa-senhor, na forma de pó, era então colocado na comida e na bebida consumidas pelos senhores, durante prolongado período de tempo e em doses fracionadas, resultando, como denota o próprio nome, em deixá-los mais apáticos e posteriormente induzi-los a um quadro de imbecilidade podendo inclusive levá-los à morte, livrando os escravos dos ataques que sofriam (CAMARGO, 2007a; CAMARGO, 2007b).

Já na medicina indígena, o pó da raiz e folhas da *P. alliacea* tem sido associado com várias propriedades terapêuticas, tais como diurética, antiespasmódica, emenagoga, analgésica, anti-inflamatória, antileucêmica, antirreumática, anti-helmíntica, antimicrobiana e depurativa (DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016).

Em 1960, a *P. alliacea* entrou em evidência por meio do “Caso Managuá”, Nicaraguá, onde centenas de vacas leucêmicas foram deixadas num campo para morrer. Após algum tempo, a maioria das vacas se restabeleceu completamente, devido ao consumo majoritário de folhas de guiné nativas da região, disponíveis no pasto (ALONSO, 1998). Este fato impulsionou novas investigações acerca da possível atividade anti-oncogênica de *P. alliacea*

e, atualmente, é sabido que essa ação é devida ao trissulfeto de dibenzila (DTS), presente na espécie vegetal (WEBSTER et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2017; LOWE et al., 2014).

As pesquisas etnofarmacológicas têm como base compreender os potenciais bioativos de um vegetal, correlacionando manifestações clínicas e os recursos terapêuticos utilizados numa determinada cultura. Dentro deste contexto, Pagani e colaboradores (2017) investigaram alguns habitantes ribeirinhos da Amazônia brasileira e concluíram que a *P. alliacea* está correlacionada com atividades antidepressivas e ansiolíticas.

A importância de levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais pode ser exemplificada por indicar o nível de conservação da biodiversidade e da saúde humana através da integração de elementos sociais e ecológicos. A riqueza de espécies medicinais nativas indica que a biodiversidade e os conhecimentos tradicionais associados ficarão melhores preservados, considerando-se uma predominância de gestão para a subsistência das espécies vegetais de interesse (PEDROLLO et al., 2016).

1.4 Metabólitos secundários

Os vegetais produzem uma grande diversidade de substâncias orgânicas que estão diretamente relacionadas com o seu crescimento e desenvolvimento e são conhecidas como metabólitos primários (essenciais). Além destes, há uma gama de substâncias químicas derivadas do metabolismo primário que possuem diversas funções ecológicas como a proteção contra herbívoros, atração de polinizadores e dispersores de sementes e ainda conferem mecanismos alelopáticos em competições planta-planta (MONTANARI & BOLZANI, 2001; ALMEIDA et al., 2010; RAO & RAVISHANKAR, 2002; AKULA & RAVISHANKAR, 2011; TAIZ & ZEIGER, 2013). Estas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários ou especiais e são responsáveis pelos efeitos biológicos, benéficos ou tóxicos, que definiram estas espécies como medicinais, sendo utilizadas pelos seres humanos desde tempos imemoriais.

De fato, o conhecimento etnobotânico e farmacológico acumulado ao longo de gerações tem servido como base para o desenvolvimento de fármacos de grande importância, tais como: digoxina, quinina, morfina, hiosciamina, ácido salicílico e artemisina. Neste contexto, os metabólitos secundários vegetais apresentam um grande valor do ponto de vista social e econômico (MARASCHIN & VERPOORTE, 1999).

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese nas plantas é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001). E essa interação planta/ambiente desempenha um importante papel, garantindo a sobrevivência das espécies no ecossistema (MARASCHIN & VERPOORTE, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2013). Existem diversos fatores que influenciam o conteúdo de metabólitos secundários tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Contudo, Sakamoto e colaboradores (2005) mostraram que metabólitos secundários de uma espécie vegetal selvagem, coletada diretamente do seu habitat em três diferentes populações, se mantiveram em concentrações constantes durante os dois anos do estudo, demonstrando, portanto, que em alguns casos o metabolismo secundário pode não se alterar em função de fatores climáticos, temporais ou ambientais. Portanto, estudos como este mostram a importância da realização do perfil fitoquímico em trabalho com espécies vegetais, principalmente aqueles que envolvem biotecnologias e/ou efeitos biológicos.

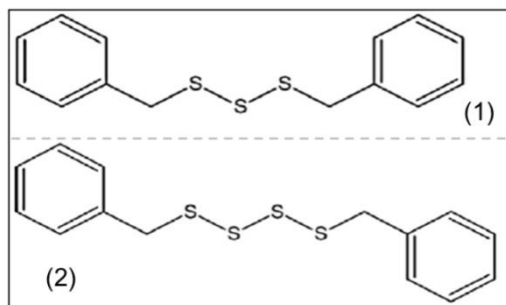
1.4.1 Fitoquímica

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas aqueles presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os metabólitos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam efeitos biológicos mais intensos (FILHO & YUNES, 1998). Vários compostos químicos já foram caracterizados, com distribuição variada nas diferentes partes da *P. alliacea*. Dentro deste contexto muitas substâncias têm sido isoladas a partir da *P. alliacea*, algumas das quais estão protegidas por patentes (FERRER, 2007; LUZ et al., 2016). Os principais componentes químicos presentes são os organosulfurados, flavonoides, alcaloides e triterpenos (BENEVIDES et al., 2001; CUERVO, 2011; LUZ et al., 2016).

Em *P. alliacea*, diversas substâncias contendo enxofre, produtos do metabolismo da cisteína, têm sido detectadas principalmente nas raízes, em concentrações elevadas. O trissulfeto de dibenzila (DTS) e tretrassulfeto de dibenzila (Figura 3) são exemplos dessa classe de substâncias com atividade biológica comprovada e, recentemente, também foram

identificados no caule e nas folhas (HERNÁNDEZ et al., 2014; SILVA et al., 2015; LUZ et al., 2016).

Figura 3 - Fórmula estrutural dos compostos organosulfurados.



Legenda: Trissulfeto de dibenzila (1) e tretrassulfeto de dibenzila (2).

Em relação às metodologias de identificação, várias técnicas cromatográficas tem sido utilizadas, dependendo da parte de interesse planta. Compostos organosulfurados foram detectados nos extratos hidroalcoólicos das folhas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) (SILVA et al., 2015; LUZ et al., 2016). Os flavonoides e derivados têm sido detectados nas partes aéreas, principalmente nas folhas (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; BLAINSKI et al, 2010; LUZ et al., 2016).

Os constituintes voláteis obtidos por hidrodestilação a partir do óleo essencial das partes aéreas de *P. alliacea* foram examinados por uma combinação das técnicas de cromatografia em fase gasosa (CG) de detecção de ionização de chama (CG-DIC) e CG acoplado a espectrometria de massa (CG-EM). Foram identificados, pelo CG/DIC, cinquenta e um componentes que representam 89,1-98,1 % dos óleos essenciais totais. Os compostos mais abundantes foram toluenotiol (2,3-23,0 %), fitol (6,4-40,0 %), trissulfeto de dibenzila (13,2-35,3 %) e benzaldeído (0,8-31,3 %). No total, quarenta novos componentes foram caracterizados em óleos de *P. alliacea*, em plantas coletadas durante a estação chuvosa, apresentando maior teor de compostos de enxofre do que aquelas obtidas durante a estação seca. Além disso, alguns compostos detectados em alguns estudos não foram relatados em outros, destacando as diferenças entre origens e composições fitoquímicas (KERUDO et al., 2015).

Um estudo avaliou a variação na composição de extratos hidroalcoólicos das raízes e das partes aéreas de *P. alliacea*. O material vegetal foi coletado em duas épocas diferentes (seca e chuvosa). No extrato de raízes e das partes aéreas foram encontrados saponinas em proporções iguais em ambos os períodos. Os extratos de raízes apresentaram uma maior

quantidade de saponinas, independentemente da estação de coleta. Já para os alcaloides, as amostras coletadas na estação chuvosa apresentaram maior abundância (OLIVEIRA, 2012).

Essas diferenças encontradas na quantidade e na identificação dos metabólitos secundários estão diretamente relacionadas aos efeitos biológicos variáveis promovidos por *P. alliacea*. Já que a síntese destas substâncias apresenta uma variação intra-específica, devido à interação entre a planta e o ambiente (MARASCHIN & VERPOORTE, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2013).

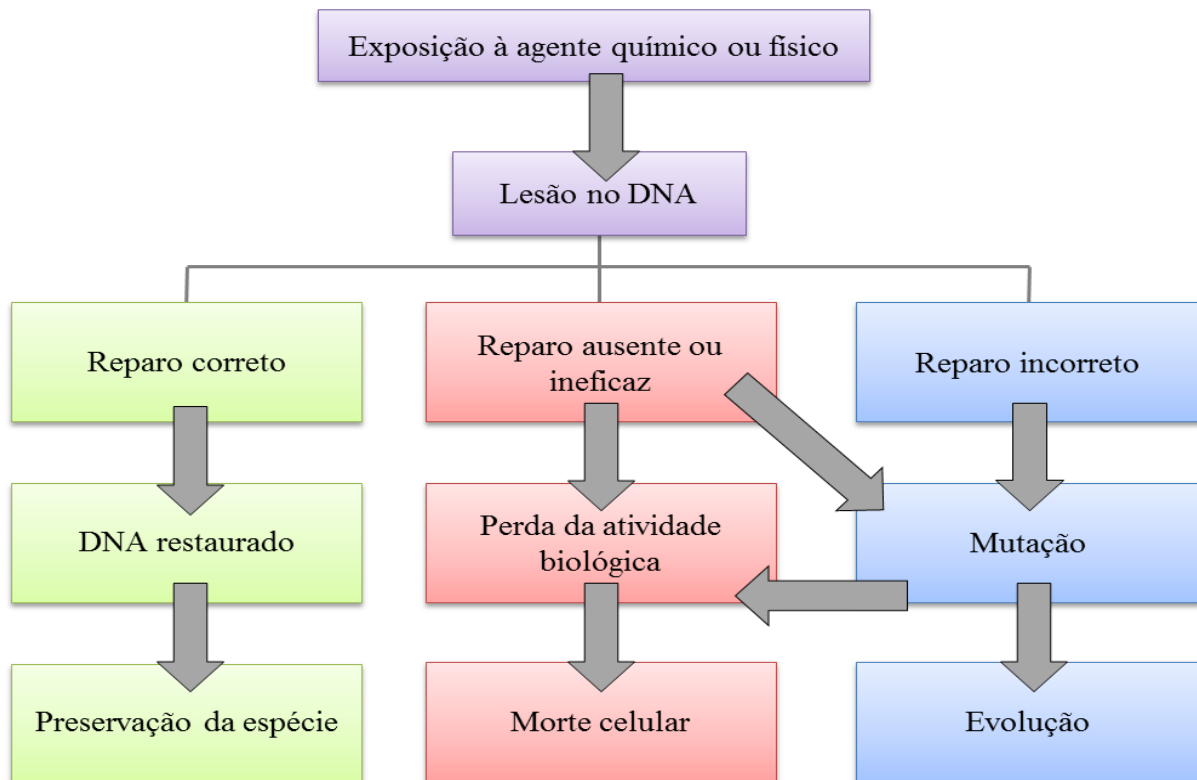
1.5 Efeitos biológicos

Os efeitos decorrentes do uso das plantas medicinais sobre diversos organismos variam em função do tempo, concentração, local da coleta do vegetal, tipo de extração e o tipo de organismo testado. Como visto anteriormente, estes efeitos estão relacionados aos metabólitos secundários produzidos pelas plantas (MARASCHIN & VERPOORTE, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2013). Dentre os efeitos biológicos observados muitos já foram descritos, como antineoplásico (HERNÁNDEZ et al., 2014), analgésico (LOPEZ-MARTINS et al., 2002), abortivo (OLUWOLE & BOLARINWA, 1998; MAIA et al., 2010) entre outros, entretanto, a espécie também apresenta efeitos tóxicos (PÉREZ-LEAL et al., 2006; SOARES et al., 2014).

Um agente físico ou químico com atividade tóxica pode causar alterações no metabolismo celular, de maneira direta ou indireta, e levar à morte da célula ou do organismo. Quando este agente é capaz de interagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), também de forma direta ou indireta, e produzir alterações em sua estrutura ou função, ele é chamado de genotóxico. Evolutivamente, em defesa contra essas ações lesivas, as células apresentam diferentes sistemas de reparo de DNA, que tem como intuito manter a integridade do material genético. A atuação coletiva e contínua desses mecanismos de reparo protege os seres vivos da ação lesiva de agentes endógenos e exógenos, contribuindo para a manutenção da integridade do genoma e da homeostase celular (ALBERTS et al., 2009; FRIEDBERG et al., 2006). Resumidamente, essas alterações podem ser processadas de diferentes formas: (i) Reparo correto, com garantia de preservação do material genético; (ii) reparo incompleto ou ausente, com perda da atividade biológica do DNA que pode acarretar na morte celular; (iii) reparo com erros, quando as alterações contidas no DNA se fixam de forma a serem transmitidas aos descendentes, sendo comumente chamadas de mutações. É importante

ressaltar que as mutações podem ser benéficas, relacionadas a evolução da espécie; ou nocivas quando o mecanismo celular é alterado de forma negativa, como no caso do desenvolvimento de alguns tipos de câncer (LEITÃO et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma de possibilidades de reparo do DNA em resposta à exposição a agentes físicos ou químicos.



Fonte: Adaptado de Leitão et al., 2013.

Desse modo, as alterações químicas provocadas por extratos de plantas medicinais podem afetar as células de maneiras diferentes, conforme pode ser verificado a partir de alguns exemplos de efeitos biológicos promovidos por *P. alliacea* descritos na literatura.

Sobre os efeitos abortivo e emenagogo, o extrato metanólico de sementes de *P. alliacea* induziu contrações no útero de ratas. Além disso, em fibras uterinas isoladas de ratas, o extrato causou um aumento na frequência e força de contração na resposta contráctil à oxitocina (OLUWOLE & BOLARINWA, 1998). Outro estudo mostrou que o extrato hidroalcoólico de raízes de *P. alliacea* provoca, em ratas, uma redução significativa no número de locais de implantação do zigoto, mas não causam alterações histológicas. Não foram observados nos descendentes alterações no número, comprimento e peso (MAIA et al., 2010).

Em 2002, Lopez-Martins e colaboradores tiveram como objetivo investigar a atividade anti-inflamatória do extrato liofilizado bruto de raízes de *P. alliacea* administrados em ratos com pleurite. A administração oral do extrato em doses de 43,9 mg/kg, reduziu a migração de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos. Já a dose de 31,4 mg/kg diminuiu apenas a migração de células mononucleares. O extrato mostrou ainda um efeito analgésico significativo no modelo experimental utilizado. Os resultados deste estudo corroboram com a utilização pela sabedoria popular.

Os efeitos citotóxicos e antioxidantes de *P. alliacea* foram estudados por Pérez-Leal e colaboradores (2006) em cinco linhagens celulares tumorais: U251(glioblastoma multiforme); PC-3 (próstata); K562 (leucemia); HCT-15(cólon); MCF-7 (mama). Os extratos aquoso de folhas e diclorometano de raízes foram 70,1 e 81,1 %, respectivamente, citotóxicos para a linhagem de células de leucemia. O extrato diclorometano de raízes afetou significativamente a linhagem de células de próstata (62,2 %); nas outras linhagens celulares não foi detectada nem uma atividade importante. Na avaliação da atividade antioxidante, o extrato butanol de folhas foi o mais eficaz na redução de radicais livres com 90,2 % de eficiência, seguido do extrato butanol de raízes, que apresentou uma redução de 74,3 %, a uma concentração, em ambos os casos, de 1,0 mg/mL.

Pesquisadores da Universidade Federal do Pará realizaram estudos em ratos Wistar, fêmeas e machos, com dois meses de idade, administrados por via oral, com 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico contendo folhas, raízes e frutos de *P. alliacea*. O objetivo era avaliar os efeitos do extrato sobre o sistema nervoso central. Os dados mostram que o extrato de *P. alliacea* exerceu efeitos estimulantes, ansiolíticos, antidepressivos e promoveu melhoria da memória (ANDRADE et al, 2012).

Posteriormente, esse mesmo grupo da Universidade Federal do Pará publicou um artigo com ratos Wistar, fêmeas e machos de três meses de idade, utilizando extrato hidroalcoólico de folhas de *P. alliacea* na concentração de 900 mg/kg, por via oral. Teve como objetivo investigar as propriedades no sistema nervoso central e seus efeitos sobre a cognição, incluindo a aprendizagem e memória. Os resultados indicaram uma melhora da memória de longo prazo. Também, foi relatada melhora da memória espacial e aumento de aprendizagem de tarefas (SILVA et al., 2015).

Oliveira e colaboradores (2013) realizaram um estudo fitoquímico das partes aéreas de *Petiveria alliacea* L. (galhos jovens e folhas), além da avaliação da citotoxicidade (CL₅₀) das folhas frente à *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana, na qual foram utilizadas cepas de bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* e

Escherichia coli), submetidas ao extrato bruto metanólico das folhas, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL. Foi possível identificar nos galhos jovens de *P. alliacea* L. a presença de ácidos orgânicos, fenóis e taninos, e nas folhas, alcaloides, esteroides e triterpenoides, saponinas, fenóis e taninos, onde as atividades destes metabólitos condizem com algumas propriedades medicinais alegadas pela população. O extrato bruto metanólico das folhas apresentaram $CL_{50} = 1709,77 \mu\text{g/mL}$, sendo consideradas atóxica nas concentrações testadas, visto que para extrato de plantas frente a *A. salina* são considerados atóxicos quando $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. A atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas apresentou inibição apenas para *Escherichia coli* na concentração de 100 mg/mL e esta atividade pode estar relacionada com a presença de fenóis e taninos no extrato. De acordo com os autores, os resultados obtidos tornam a espécie promissora em busca de metabólitos secundários, mas devem ser feitos novos estudos para identificação dos seus principais princípios ativos.

Recentemente, Soares e colaboradores (2014) compararam o potencial genotóxico do extrato aquoso de folhas de *P. alliacea* de campo, de diferentes origens, e de plantas *in vitro*. A análise de seus efeitos foi realizada sobre a integridade do plasmídeo pUC 9.1, verificando as alterações no padrão de migração em gel de agarose após incubação com concentrações crescentes do extrato (1, 5 e 10 mg/mL), indicando um potencial genotóxico nas concentrações mais elevadas dos extratos. Por outro lado, também foi verificada uma ação antigenotóxica dos extratos, nas menores concentrações, diminuindo as quebras provocadas pelo cloreto estanoso, um agente sabidamente genotóxico. Os autores também concluíram que a intensidade do efeito dos extratos sobre o DNA plasmidial variou de acordo com a origem das plantas.

A atividade antifúngica de um extrato hidro-alcoólico bruto de folhas de *P. alliacea* foi testada comparativamente com a do fluconazol, em 125 linhagens clínicas de 10 espécies diferentes de *Candida*. Essa comparação mostrou que o extrato possui uma atividade antifúngica elevada sugerindo que a planta possui um potencial terapêutico. (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2014).

Diferentes autores têm investigado a ação antineoplásica de extratos de *P. alliacea*. Nesse contexto, Hernández e colaboradores (2014) avaliaram a atividade biológica de uma fração acetato de etila de folhas e caules da planta, utilizando como modelo celular de adenocarcinoma de mama metastático (4T1). Em ensaios *in vitro* a fração do extrato induziu apoptose nas células 4T1, ativou a caspase-3, fragmentou o DNA sem despolarizar a membrana mitocondrial e diminuiu a capacidade de crescimento das células. Além disso, as alterações na expressão de enzimas glicolíticas causaram uma diminuição na absorção de

glicose e produção de lactato. Ainda segundo os autores, nos ensaios *in vivo* a fração do extrato testada regrediu o tumor de câncer de mama metastático em camundongos BALB/c transplantados com células 4T1 GFP.

No mesmo contexto, outro trabalho investigou os efeitos inibitórios do DTS frente a quinases, usando um ensaio de ligação competitiva. Nos experimentos foram avaliadas 6 linhagens de câncer humano e o DTS foi identificado como um inibidor da quinase RSK1, altamente seletivo e específico dessa isoforma, com amplo potencial terapêutico contra diferentes tipos de câncer (LOWE et al., 2014).

Urueña e colaboradores, 2008, utilizaram uma fração do extrato etanólico de folhas e sementes de *P. alliacea* incubando com linhagens tumorais humanas. Foi possível observar que a fração induziu uma parada no ciclo celular em G2, promoveu uma reorganização do citoesqueleto de actina, afetou a morfologia celular, provocou uma fragmentação do DNA e diminuiu a multiplicação celular. Desta forma, os resultados indicam que a fração do extrato de *P. alliacea* pode usar múltiplos alvos moleculares para exercer sua atividade antitumoral.

Recentemente, o DTS e sete extratos preparados a partir da planta foram avaliados quanto ao seu impacto sobre as atividades das CYP 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4. O DTS apresentou efeito significativo contra as atividades de CYP 1A2, 2C19 e 3A4, com valores de IC₅₀ de 1,9, 4,0 e 3,2 µM, respectivamente, que são equivalentes aos inibidores convencionais conhecidos destas enzimas (furafilina, e tranilcipromina). A interação mais potente com CYP1A2 exibiu cinética enzimática irreversível. O extrato de raiz, elaborado com 96 % de etanol (contendo 2,4 % DTS), apresentou valores de IC₅₀ de 5,6, 3,9 e 4,2 µg/mL, respectivamente, contra as mesmas isoformas, CYP 1A2, 2C19 e 3A4. Foi possível identificar o DTS como um valioso inibidor de CYP e *P. alliacea* com grande potencial para ensaios clínicos que confirmem essas conclusões. De acordo com os autores, extratos que apresentam baixos níveis de DTS, tais como extratos aquosos, não são susceptíveis de causar interações medicinais adversas planta-drogas (MURRAY et al., 2016).

Kerdudo e colaboradores (2015) isolaram 51 constituintes voláteis obtidos por meio de hidrodestilação a partir do óleo essencial das partes aéreas da *P. alliacea*. As atividades antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial foram estudadas contra *Aspergillus niger*, *Cândida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella arizonae* e *Listeria innocua* e contra as cepas resistentes de *Escherichia coli* (J96) e *Staphylococcus aureus aureus* (1799) e apresentaram atividade inibitória contra alguns desses microrganismos, incluindo as cepas resistentes.

Arceo-Medina e colaboradores (2016) demonstram um efeito sinérgico dos compostos trissulfeto de dibenzila e bissulfeto de dibenzila sobre carrapatos resistentes à acaricidas (larvas e adultos) *Rhipicephalus microplus*.

Também em 2016, Silva e colaboradores avaliaram a atividade genotóxica do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *P. alliacea* utilizando o ensaio cometa, *in vitro*, em linfócitos humanos, e o ensaio de micronúcleo, *in vivo*, em camundongos tratados por via oral com o extrato. Os resultados sugerem que o extrato induz danos no DNA *in vitro*, mas este efeito foi leve no modelo *in vivo*. Os autores recomendam que sejam realizadas mais investigações sobre os mecanismos de danos ao DNA induzido por *P. alliacea* para entender se os componentes do extrato poderiam desencadear efeitos deletérios, como a indução de mutações e processos carcinogênicos.

O extrato etanólico de folhas e sementes de *P. alliacea* foi utilizado para avaliar a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e não tumorais e seus efeitos antitumorais em camundongos BALB/c com tumor de mama. As células de câncer de mama tratadas com o extrato apresentaram redução no fluxo glicolítico e nos níveis de ATP intracelular, desencadeando diminuição na respiração basal mitocondrial e no consumo de oxigênio. Na cultura celular 3D, foi observado uma diminuição da proliferação celular. E também houve uma redução do crescimento do tumor primário e um aumento da sobrevivência de camundongos portadores de tumor (HERNÁNDEZ et al., 2017).

Dentro do contexto de metabólitos secundários, efeitos biológicos e desenvolvimentos de novos fármacos há poucos artigos com estudos de extratos de *P. alliacea* utilizando procariotos como sistema biológico. Porém, o desenvolvimento do presente trabalho de dissertação se justifica baseado em novas políticas de triagem de drogas, que preconiza a realização de ensaios com várias espécies, procariotos e eucariotos, bem como incorporar testes *in vitro* no processo (VARGESSON, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de extratos etanólicos de folhas de *Petiveria alliacea* L. através de modelos *in vivo* e *in vitro*, com a utilização de cepas bacterianas de *Escherichia coli* e DNA plasmidial.

2.2 Específicos

- Determinar o potencial citotóxico e genotóxico do extrato etanólico de *P. alliacea* em células bacterianas;
- Investigar o potencial genotóxico do extrato em DNA plasmidial;
- Avaliar o potencial mutagênico do extrato em células bacterianas;
- Analisar o potencial citotóxico das partições do extrato etanólico de *P. alliacea* após extração com solventes de diferentes polaridades visando correlacionar com os efeitos observados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As plantas de *Petiveria alliacea* L. foram obtidas a partir de propriedade particular localizada em Niterói, RJ (22°53'55,95''S e 43°05'09,37''W, elevação 54m) e mantidas em telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ. As folhas foram excisadas das plantas coletadas no período de 01 de julho de 2015 a 22 de janeiro de 2017, conforme a demanda por novos extratos. O espécime vegetal foi devidamente identificado com base nas características morfológicas e reprodutivas (SOARES et al, 2014). O material testemunho foi depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ11.710).

3.2 Preparo do extrato etanólico bruto

A extração etanólica foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais (LPPN) da UERJ. Após a excisão as folhas foram lavadas e submetidas ao processo de secagem em estufa a 50 °C por 24 horas, as folhas secas eram trituradas com as mãos. Depois que o material vegetal foi triturado adicionou-se o solvente polar, etanol absoluto 99,5 % P.A. (VETEC), como líquido extrator. O material macerado em infusão em um frasco *erlenmeyer* durante vinte e um dias em temperatura ambiente e sem agitação, vedado com papel alumínio e plástico filme de PVC. A cada sete dias eram realizados uma filtragem com o intuito de separar a fase sólida (material foliar) da fase líquida. A fase líquida era separada e armazenada, um novo volume de etanol absoluto era adicionado ao material foliar e o processo repetido mais duas vezes. Ao fim dos 21 dias, todo o material filtrado foi levado ao evaporador rotativo (Marconi, modelo MA-120), para a eliminação do solvente. Ao término da evaporação obteve-se o extrato etanólico concentrado, que foi seco em estufa por 48 horas a 50 °C; posteriormente gerando o extrato etanólico seco bruto. O rendimento do extrato, em porcentagem, foi calculado como sendo a razão entre a massa do extrato seco e a massa das folhas secas, tendo-se obtido, em média, o valor de 2,0 %. Para a preparação da estoque do extrato etanólico de *P. alliacea* era adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) e água ultra pura (Permutation, AquaPur evolution) autoclavada na proporção de 1:10.

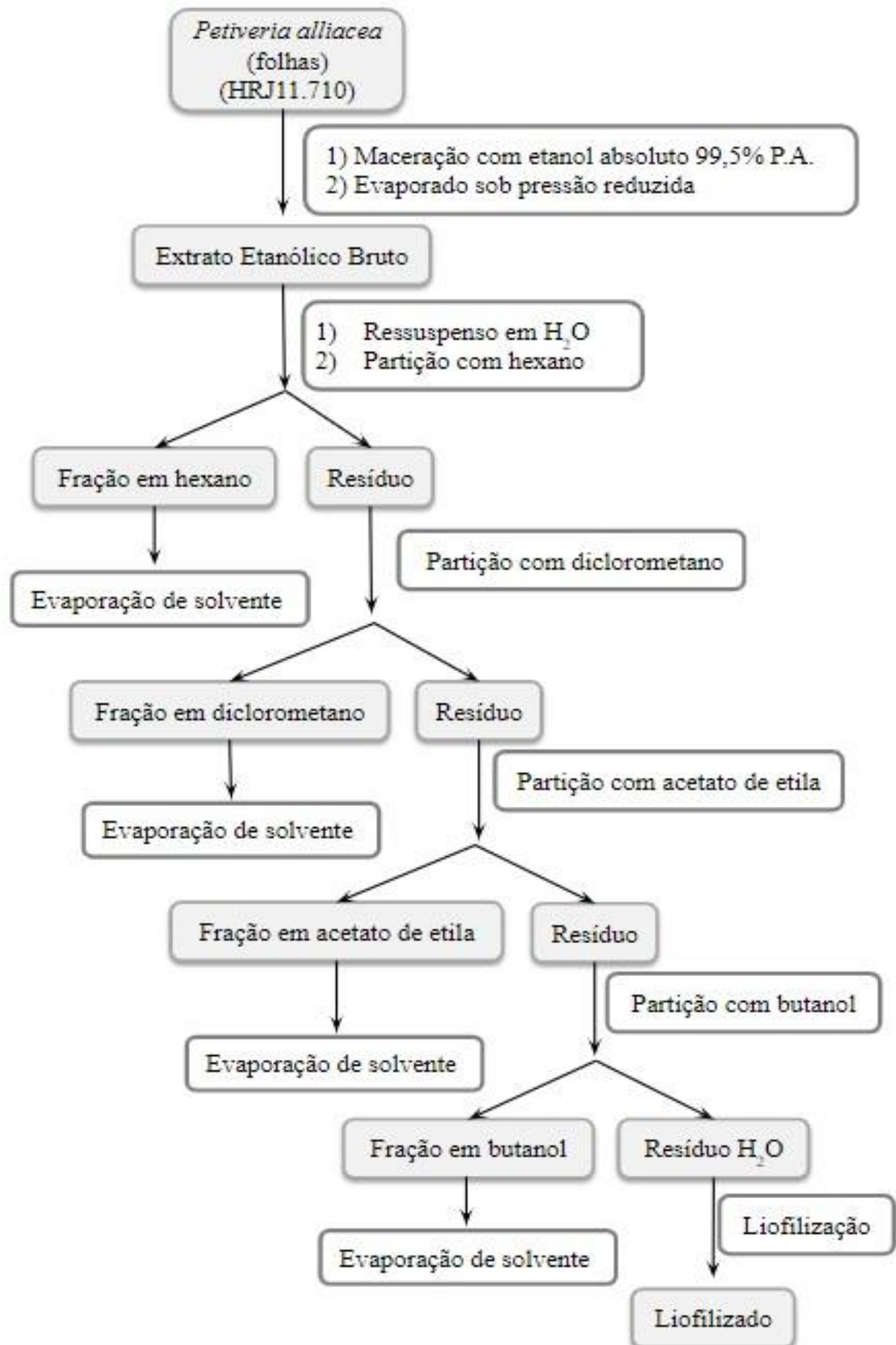
3.2.1 Partição do extrato bruto

A partição do extrato bruto de folhas de *P. alliacea* foi realizada com a extração líquido-líquido, que consiste na adição de diferentes solventes orgânicos, de polaridade crescente, à amostra aquosa, ou seja, ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (MINCZEWSKY, CHWASTOWSKO & DYBCZYWKI, 1982; ZOLOTOV et al., 1986; QUEIROZ, COLLINS & JARDIM, 2001).

A extração com solventes de diferentes polaridades foi realizada no LPPN da UERJ. O extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* foi obtido conforme descrito no item 3.2. O extrato (1 g) foi suspenso em 300 mL de água destilada e então particionado com solventes de polaridade crescente: hexano (Synth), diclorometano (Tedia), acetato de etila (Vetec) e butanol (Vetec).

Inicialmente foi adicionado 300 mL de água para ressuspender o extrato bruto e essa partição esteve presente em todas as fases das demais partições, como solvente imiscível. Então era adicionado 600 mL do solvente de interesse ao que sobrou do extrato bruto e o solvente era fracionado em três partes de 200 mL. Posteriormente à separação de cada partição, foi realizada uma filtração com sulfeto de sódio anidro P.A. (Vetec), com o objetivo de retirar qualquer partícula de água que por ventura possa ter passado para as partições. Posteriormente cada partição foi submetida ao rotaevaporador. A partição de água foi submetida ao congelamento -20 °C, por 24 horas e posteriormente introduzida no liofilizador (Liotop, L101) com o intuito de remover toda a água do produto congelado através do processo de sublimação. Ao final obteve-se o rendimento em gramas de cada partição (hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica e do material solúvel em água). As concentrações das partições utilizadas foram definidas de acordo com o rendimento de cada uma delas. Na figura 5 pode ser visto um esquema geral da obtenção do extrato bruto e das partições.

Figura 5 - Esquema geral da obtenção do extrato etanólico bruto e das partições.



3.3 Cepas bacterianas

As cepas de *Escherichia coli*, utilizadas neste estudo, estão listadas no quadro 1.

Quadro 1 - Cepas de *E. coli* utilizadas, características genéticas relevantes e antibiótico de resistência.

Cepa	Características	Origem	Antibiótico e concentração
AB1157	Selvagem (proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA)	Laboratório de Radio e Fotobiologia	Estreptomicina (100 µg/mL)
DH5αF'IQ + pUC 9.1	<i>recA</i> (deficiente em reparo por recombinação)	Laboratório de Radio e Fotobiologia	Ampicilina (50 µg/mL) Canamicina (10 µg/mL)

3.3.1 Conservação das cepas bacterianas

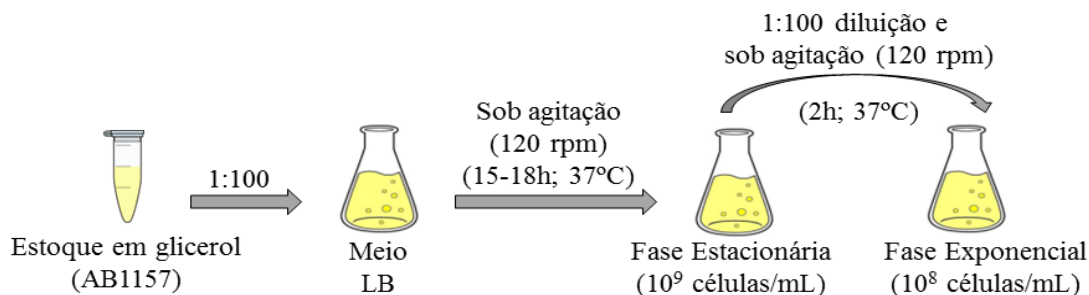
Para conservação das cepas de *E. coli*, eram preparados estoques, utilizando-se volumes iguais (750 µL) de cultura bacteriana em fase estacionária de crescimento e glicerol estéril (100 %). Tais estoques eram acondicionados em microtubos e armazenados a -20 °C, sendo renovados a cada quatro meses.

3.3.2 Obtenção das culturas bacterianas

As culturas bacterianas de *E. coli* AB 1157 para os experimentos foram obtidas a partir de uma alíquota (50 µL) do estoque em glicerol colocadas em *erlenmeyer* estéril (50 mL), contendo 5 mL de meio LB. Eram então, incubadas a 37 °C, sob agitação a 120 rpm, por 15 a 18 horas em agitador do tipo *shaker* (Nova Ética, modelo 430 - DBE), tempo necessário para a cultura atingir a fase estacionária de crescimento - 10⁹ células/mL. Uma alíquota (200 µL) desta cultura foi adicionada a 10 mL de meio LB (proporção de 2:100) e incubada durante cerca de 2 horas, a 37 °C, sob agitação de 120 rpm, até a cultura atingir a fase exponencial de crescimento (10⁸ células/mL). As culturas obtidas foram, então, centrifugadas por 15 minutos, 5000 rpm a 4 °C (Eppendorf Centrifuge, modelo 5804 R), sendo o

sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano ressuspenso em 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl a 0,9 %). Na figura 6 encontra-se um esquema representativo da obtenção das culturas bacterianas utilizadas no presente trabalho.

Figura 6 - Esquema representativo da obtenção das culturas bacterianas AB1157.

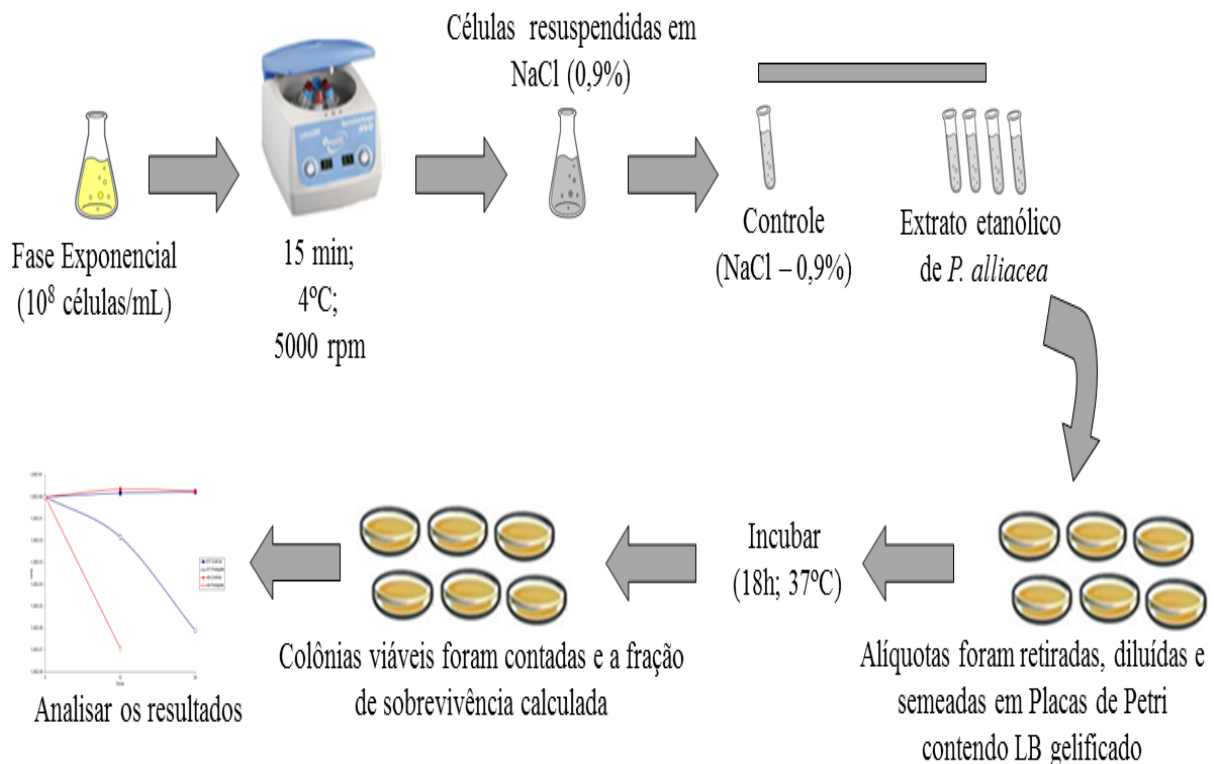


3.4 Determinação do potencial citotóxico do extrato em células bacterianas

A técnica de inativação bacteriana tem o objetivo de avaliar o potencial citotóxico do extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*. A cultura bacteriana, em fase exponencial de crescimento, em solução de NaCl (0,9 %) foi dividida em frações: controle; controle DMSO (1:10) e nas concentrações de interesse do extrato etanólico de folhas (mg/mL).

Todas as frações foram mantidas a 37 °C, sob agitação, durante 60 minutos, sendo que a cada 20 minutos, alíquotas eram retiradas, diluídas convenientemente e semeadas em placas de Petri contendo meio LB gelificado (1,5 % Agar-agar). As placas foram incubadas a 37 °C, por cerca de 18 horas, para formação das colônias. Após este período, foi realizada a contagem das colônias e as frações de sobrevivência (FS) foram determinadas para os diferentes tempos de incubação. As FS (N/No) eram calculadas dividindo-se o número de células viáveis, após cada tempo de incubação (N), pelo número de células viáveis no tempo zero de incubação (No). A técnica de inativação bacteriana utilizada neste estudo encontra-se esquematizada na figura 7.

Figura 7 - Esquema representativo da sobrevivência de *E. coli* AB1157 ao extrato etanólico de *P. alliacea*.



3.5 Determinação do potencial genotóxico do extrato em células bacterianas

A atividade genotóxica foi estudada *in vivo* através do ensaio de eletroforese em gel de agarose, em condições alcalinas, usando-se DNA genômico de células de *E. coli* AB1157 expostas às concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL do extrato etanólico de folhas, de acordo com o procedimento descrito por De Mattos e colaboradores (2008).

Alíquotas (1 mL) de culturas de *E. coli*, na fase exponencial de crescimento, obtidas conforme descrito no item 3.3.2, foram incubadas com as diferentes concentrações do extrato etanólico de *P. alliacea* durante 1 hora e então centrifugadas e ressuspensas em TE. Após a obtenção do sedimento bacteriano suspenso em 10 μ L de TE gelado, 50 μ L de agarose *low melting point* (0,15 % em TE), a 37 °C, eram misturados aos 10 μ L de cada fração. A mistura (60 μ L) era, então, colocada em um recipiente de acrílico contendo pequenos poços e incubada à temperatura ambiente até a completa gelificação e formação de blocos de aproximadamente 0,5 cm de lado.

Os blocos obtidos foram incubados em solução de lise por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, eles foram lavados três vezes, em intervalos de 5

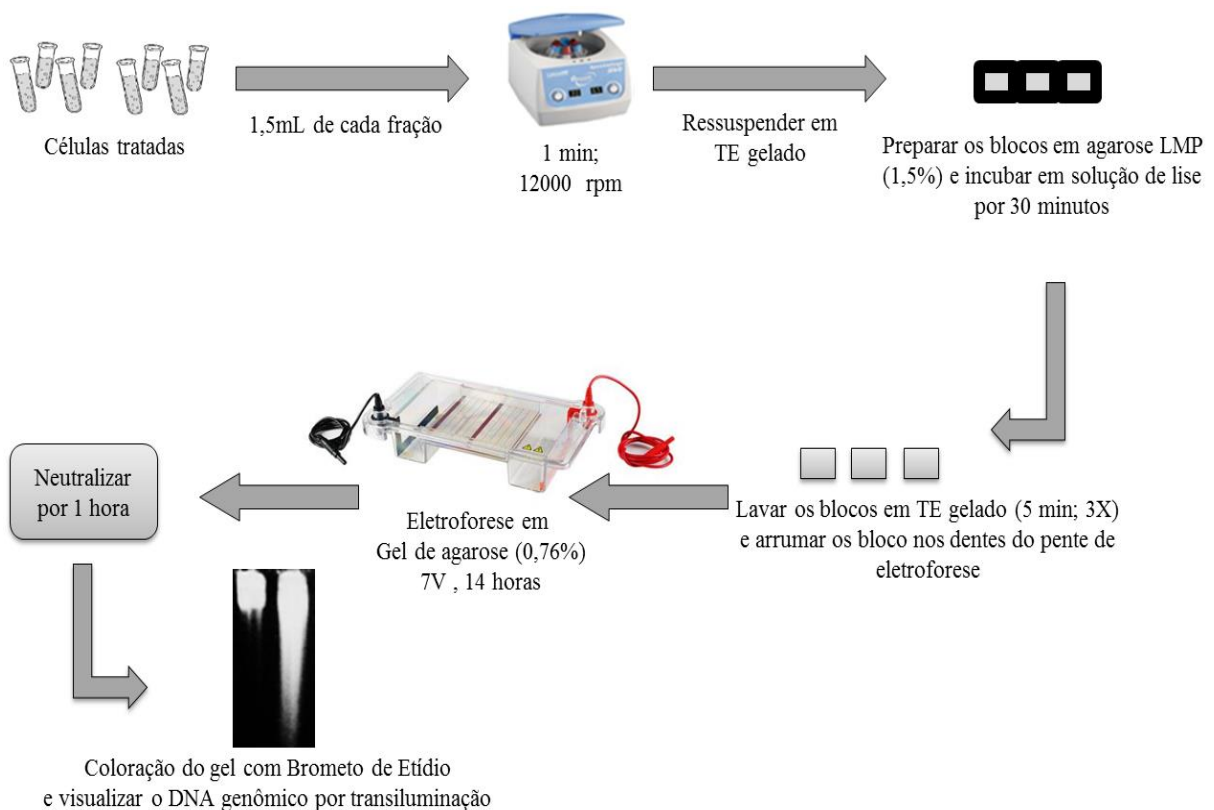
minutos, com 1 mL de TE gelado. Os blocos eram, então, arrumados nos dentes do pente da cuba de eletroforese e o excesso de TE removido com papel filtro, a fim de facilitar a aderência dos blocos ao pente.

Para o preparo do gel de agarose, solução de agarose (0,76 %), foi preparada em tampão alcalino e aquecida até sua completa homogeneização. Após leve resfriamento, a solução foi depositada em uma cuba horizontal (GIBCO BRL - Life technologies, Horizon 58), onde o pente, contendo os blocos, foi encaixado. Após a gelificação, o pente foi retirado, permanecendo no gel os blocos que continham o lisado celular bacteriano.

Na etapa da eletroforese alcalina a cuba de eletroforese foi preenchida com tampão alcalino e o gel submetido a uma tensão de 7 V, por 14 horas, fonte de eletroforese (Pharmacia Biotech; EPS 600). Concluída a eletroforese, o gel era imerso em solução de neutralização, durante 60 minutos. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por aproximadamente 15 minutos e as bandas de DNA eram visualizadas em um transiluminador UV (Loccus Biotecnologia, LTB 21x26 ST), sendo o gel, então, digitalizado em um sistema de captura de imagens (Canon, Power Shot S2IS).

A representação esquemática da técnica de eletroforese em gel alcalino de agarose está na figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da técnica de eletroforese em gel alcalino de agarose.



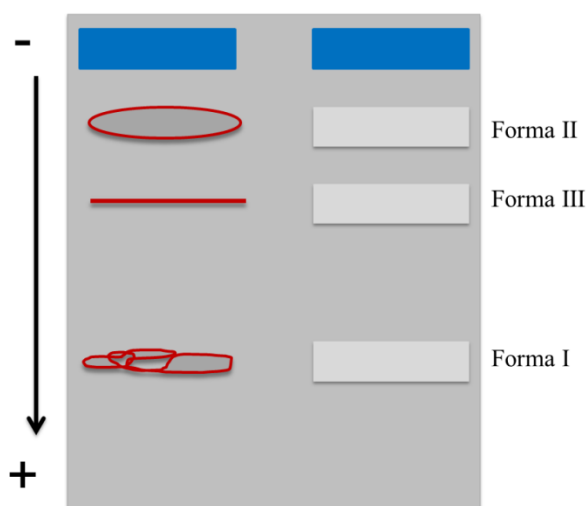
3.6 Avaliação do potencial genotóxico do extrato em DNA plasmidial

Essa técnica permite verificar a genotoxicidade, *in vitro*, sendo usada neste trabalho para avaliar o extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*, através da visualização de quebras no DNA plasmidial (DE MATTOS et al, 2004).

É muito utilizada na separação de moléculas de DNA plasmidial em função da migração diferenciada das três formas estruturais do plasmídeo, durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico. Ou seja, quando submetida à eletroforese em gel de agarose, a estrutura tridimensional das moléculas de DNA plasmidial influencia na migração, uma vez que moléculas de DNA plasmidial com quebras apresentam migração diferente do DNA íntegro, pois apresentam maior dificuldade em passar pelos poros da rede de agarose.

De acordo com a sua integridade, é possível encontrar formas estruturais do DNA plasmidial que podem ser de três tipos: i) forma superhelicoidizada, também chamada de forma I, correspondente ao plasmídeo sem quebras; ii) forma círculo aberto ou forma II, resultante de quebras simples; iii) forma linear ou forma III, resultante de quebras duplas. Essas 3 formas migram com velocidades diferenciadas no gel de agarose, conforme representado na figura 9.

Figura 9 - Esquema da migração das três formas do plasmídeo no gel de agarose submetido a eletroforese.



Legenda: Forma I (superhelicoidizada), correspondente ao plasmídeo sem quebras; Forma II (círculo aberto), resultante de quebras simples; Forma III (linear), resultante de quebras duplas. A seta indica o sentido da corrida das moléculas no gel, de acordo com a polaridade. **Fonte:** DE MATTOS et al., 2004.

A extração de DNA plasmidial foi realizada a partir de culturas da cepa DH5 α F'IQ transformada com pUC 9.1, em fase estacionária de crescimento (10^9 células/mL), de acordo com o protocolo do kit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitex). Uma alíquota (1,5 mL) da cultura foi centrifugada em um tubo *ependorf* por 1 minuto a 12.000 rpm (Eppendorf, MiniSpin® plus), o sobrenadante foi descartado e mais 0,5 mL da cultura foi adicionado ao mesmo tubo para nova centrifugação, nas mesmas condições. O novo sobrenadante foi descartado e 250 μ L da solução A do kit foram adicionados e as células foram ressuspensas com auxílio de uma pipeta por fluxo/refluxo. A solução A possui em sua composição RNAase (para digestão do RNA durante a lise), SDS (dodecil sulfato de sódio - solubilização de proteínas e fosfolipídios) glicose, Tris-Cl e EDTA, elementos que juntos são responsáveis por desestabilizar as proteínas de membrana das células e por impedir a ação de DNAses (essa última é oriunda da atividade quelante de íons bivalentes do EDTA).

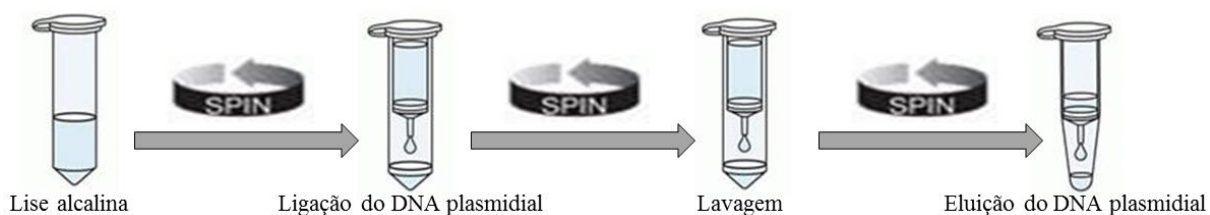
Após a ressuspensão do pellet precipitado na solução A, 250 μ L da solução B foram adicionados ao tubo para a lise das células. Essa solução B contém SDS e NaOH (alteração do pH da solução - com a finalidade de separar as fitas do DNA). Após a adição dessa solução, a homogeneização do sistema foi realizada a inversão do microtubo por três vezes, com muito cuidado, de modo a não se gerar quebras mecânicas no plasmídeo. Essa etapa também é crítica para a separação do DNA cromossômico do DNA de plasmídeo bacteriano. Em seguida, adicionou-se 250 μ L da solução C, que possui acetato de potássio, ácido acético glacial e água (restauração do pH). A partir dessa etapa observou-se a formação de grumos ou placas esbranquiçadas, demonstrando que todas as organelas, membranas e proteínas foram desnaturadas e precipitadas. A seguir, o tubo foi centrifugado por 7 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um filtro (*spin filter*) já previamente acoplado em outro tubo eppendorf (o DNA de plasmídeo fica aderido na membrana do filtro). Após nova centrifugação de 1 minuto a 12.000 rpm, adicionou-se 750 μ L da solução de lavagem (componentes não explicitados pelo fabricante) e o sistema foi novamente centrifugado por 1 minuto a 10.300 rpm.

O filtrado foi descartado e no *spin filter* foi adicionado 50 μ L da solução de eluição do kit, de modo que o plasmídeo fosse eluído do filtro após nova centrifugação nas mesmas condições da última para o *ependorf*.

Na figura 10 estão descritas as etapas de extração do DNA plasmidial segundo o fabricante Invitex do kit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two.

A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio do equipamento Nanovue (GE, HealthCare).

Figura 10 - Etapas de extração do DNA plasmidial utilizando o kit de extração plasmidial.

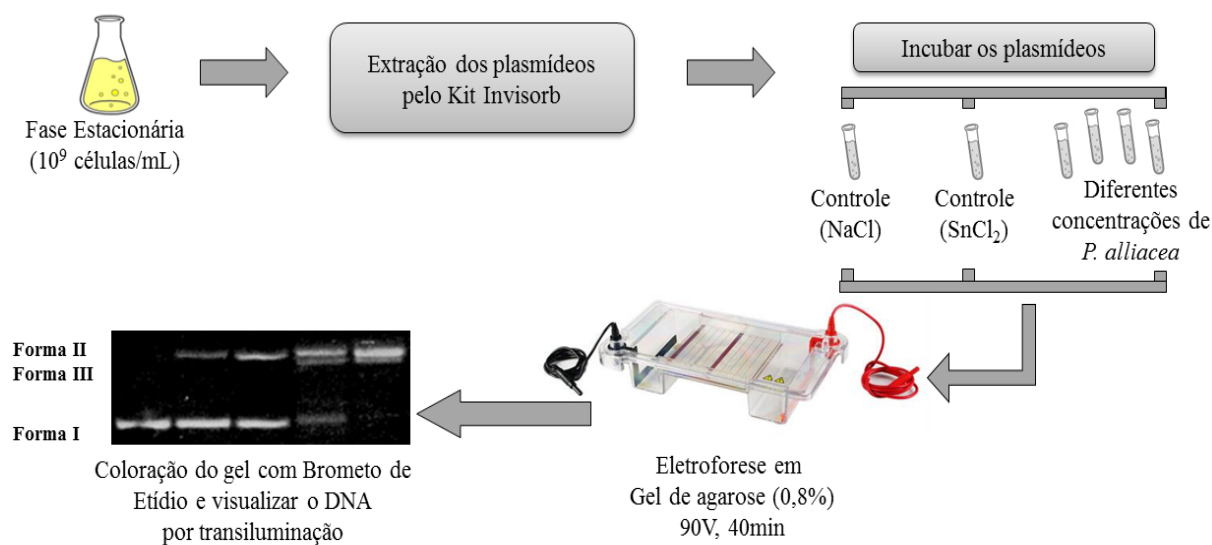


Após a extração os plasmídeos eram incubados, nas seguintes condições: o volume da reação era de 50 μL , com 4 μL de DNA plasmidial (200 ηg). O volume restante se deu pela adição de água destilada e extrato etanólico de folhas de *P. alliaceae* nos volumes adequados para se atingir as concentrações 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL . O controle consistiu em apenas DNA plasmidial e água destilada enquanto que o controle positivo foi realizado com cloreto estânico - SnCl_2 (MOTTA, 2010), incubado por 60 minutos.

Ao final de 60 minutos de incubação foi preparado um gel de agarose *NMP* (0,8 %) e 10 μL de cada uma das amostras foram misturados a 2 μL de tampão de carregamento 6x concentrado (azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol 0,25 %; glicerol 30 %) e o volume total aplicado nos *slots* (pequenos reservatórios com capacidade de até 20 μL de solução) do gel.

A solução de agarose *NMP* 0,8 % foi preparada em tampão TAE 1X concentrado, sendo aquecida até sua completa homogeneização. Após leve resfriamento, a solução foi depositada em uma cuba horizontal (GIBCO BRL - Life technologies, Horizon 58), onde se encaixou o pente para a formação dos *slots*, nos quais eram aplicadas as amostras plasmidiais. A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão TAE (1x) e aplicada uma tensão de 90 V, por 40 minutos, fonte de eletroforese (PWSys, PW300). Concluída a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$), por aproximadamente 15 minutos e as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia, LTB 21x26 ST), sendo o gel, então, digitalizado em um sistema de captura de imagens (Canon Power Shot S2IS). A metodologia descrita com todas as etapas da avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial está representada na figura 11.

Figura 11 - Esquema representativo de todas as etapas da avaliação do potencial genotóxico do extrato em DNA plasmidial.



3.7 Transformação bacteriana

Para a transformação bacteriana foi utilizado o método de transformação por choque térmico, após preparação das células para torná-las competentes, incubadas com cloreto de cálcio. Os íons da solução de cloreto de cálcio atuam neutralizando as cargas negativas da membrana e do DNA. Após um choque térmico nas temperaturas de 37 °C e 42 °C, criam-se poros na membrana e o DNA pode alcançar o interior da célula (MARANHÃO & MORAES, 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

A técnica de transformação bacteriana consistiu de duas etapas: a preparação das bactérias competentes e a transformação das bactérias propriamente dita, conforme descrito abaixo. O esquema referente à técnica de transformação bacteriana pode ser visto na figura 12.

3.7.1 Preparação das bactérias competentes

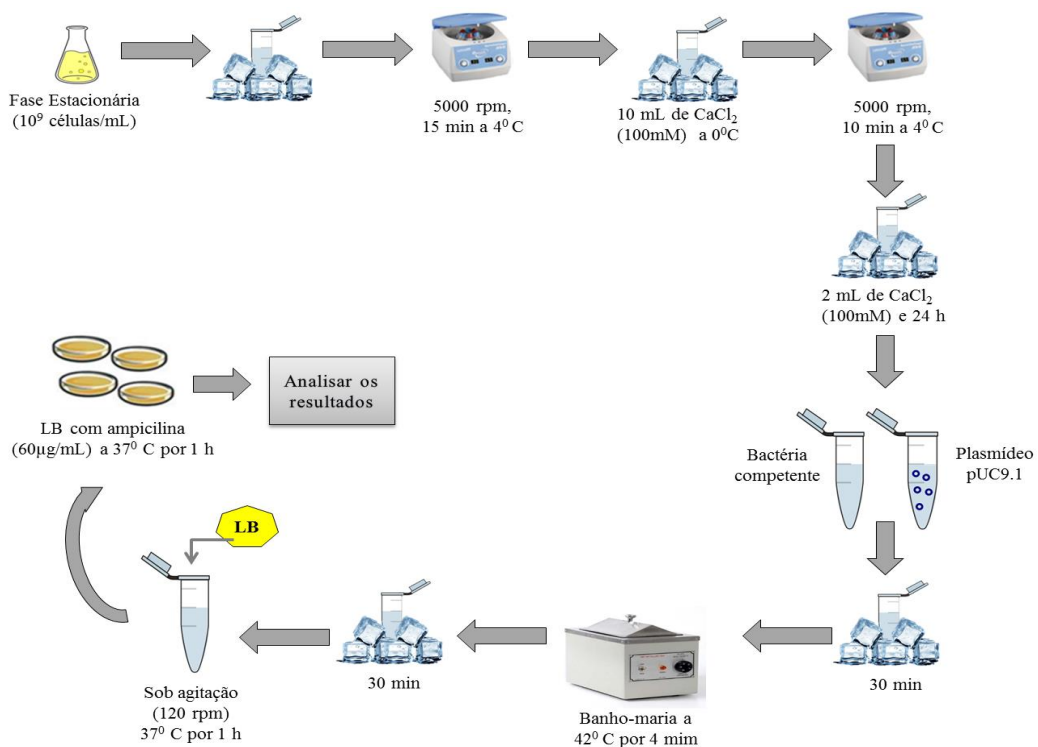
As bactérias competentes foram obtidas segundo o método descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Culturas bacterianas, em fase exponencial de crescimento, obtidas conforme descrito no item 3.3.2, foram transferidas para tubos de centrífuga, previamente gelados. Logo após, o meio foi retirado por centrifugação (10 min; 5000 rpm; 4 °C) e o

sedimento bacteriano foi ressuspenso com 10 mL de CaCl_2 100 mM. O tubo foi, então, mantido no gelo por 30 minutos. Após este período, uma nova centrifugação, nas mesmas condições, foi realizada, desprezando-se novamente o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento bacteriano com 2 mL de CaCl_2 100 mM. Em seguida, a suspensão foi incubada a 4 °C, por 24 horas, para a obtenção das células competentes.

3.7.2 Transformação bacteriana com os plasmídeos pUC 9.1

Após a obtenção das células competentes, uma alíquota (100 μL) dessa amostra foi misturada a 5 μL da suspensão de plasmídeos pUC 9.1, incubados com diferentes concentrações do extrato vegetal e/ou cloreto estanso (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como controle positivo. A mistura foi mantida por 20 min no gelo, sendo, em seguida, colocada em banho-maria, a 42 °C, por 4 minutos e, logo após, no gelo por mais 2 minutos. Em seguida à sequência de choques térmicos, foram adicionados 500 μL de LB e a cultura foi, então, incubada por 1 hora, a 37 °C, sob agitação. Terminado o período de incubação, alíquotas (100 μL) foram retiradas e semeadas em placas contendo LB gelificado e ampicilina (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a fim de selecionar as células que se tornaram resistentes a este antibiótico, após a transformação.

Figura 12 - Representação esquemática da técnica de transformação bacteriana.

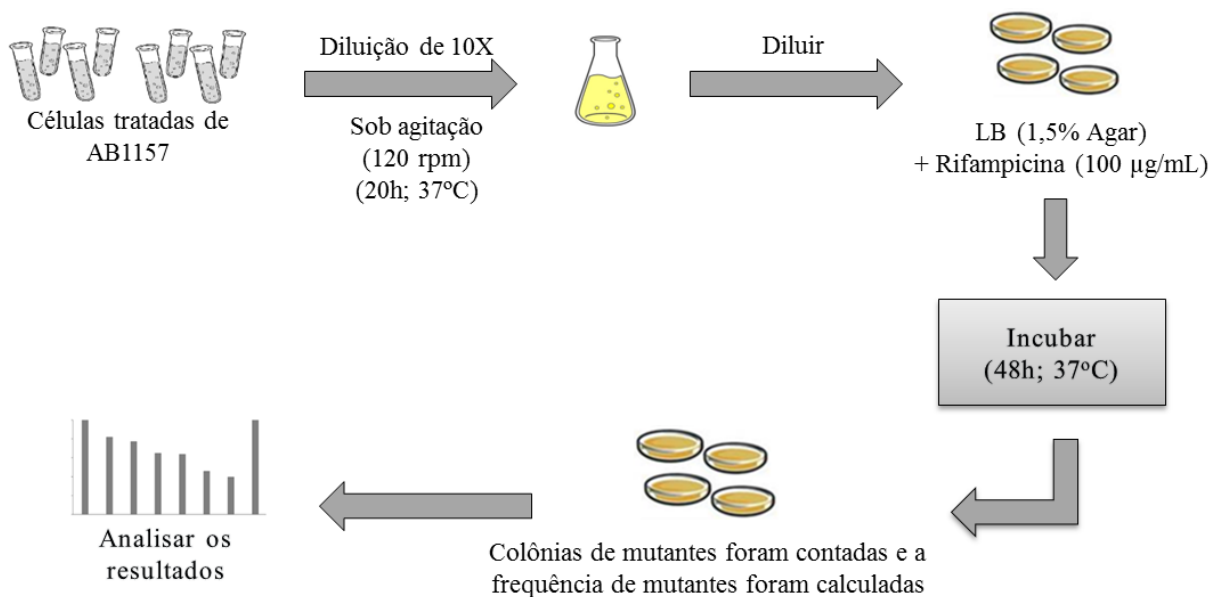


3.8 Ensaio de mutagênese pela rifampicina com a cepa AB1157

O ensaio de mutagênese pela rifampicina (SEDGWICK & GOODWIN, 1985) permite avaliar o potencial mutagênico induzido pelos extratos etanólicos da *P. alliacea*. Desse modo, alíquotas (200 µL) de culturas de *E. coli* AB1157 incubadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *P. alliacea*, conforme descrito no item 3.4, eram retiradas após 30 e 60 minutos de incubação, misturadas com meio LB fresco (20 mL) e mantidas sob agitação (37°C, 120 rpm) até atingir a fase estacionária de crescimento, como o objetivo de fixar as possíveis mutações induzidas pelos agentes em estudo.

Em seguida, 1 mL de cada amostra era retirado, misturado com 1 mL de gelose (42 °C) e todo o volume era vertido em uma placa de Petri contendo meio LB gelificado acrescido de rifampicina na concentração final de 100 µg/mL. As placas eram então mantidas em estufa (37 °C), durante 48 horas para a seleção de bactérias mutantes no gene *rpoB*. As bactérias mutantes no gene *rpoB* são selecionadas pela resistência à rifampicina, podendo assim crescer e formar colônias em meio contendo o antibiótico. Desta forma é possível determinar a mutagênese direta neste gene. A frequência de mutação no gene *rpoB* foi determinada pela razão entre o número de células vivas e o número de células mutantes. A técnica de mutagênese pela rifampicina está esquematizada na figura 13.

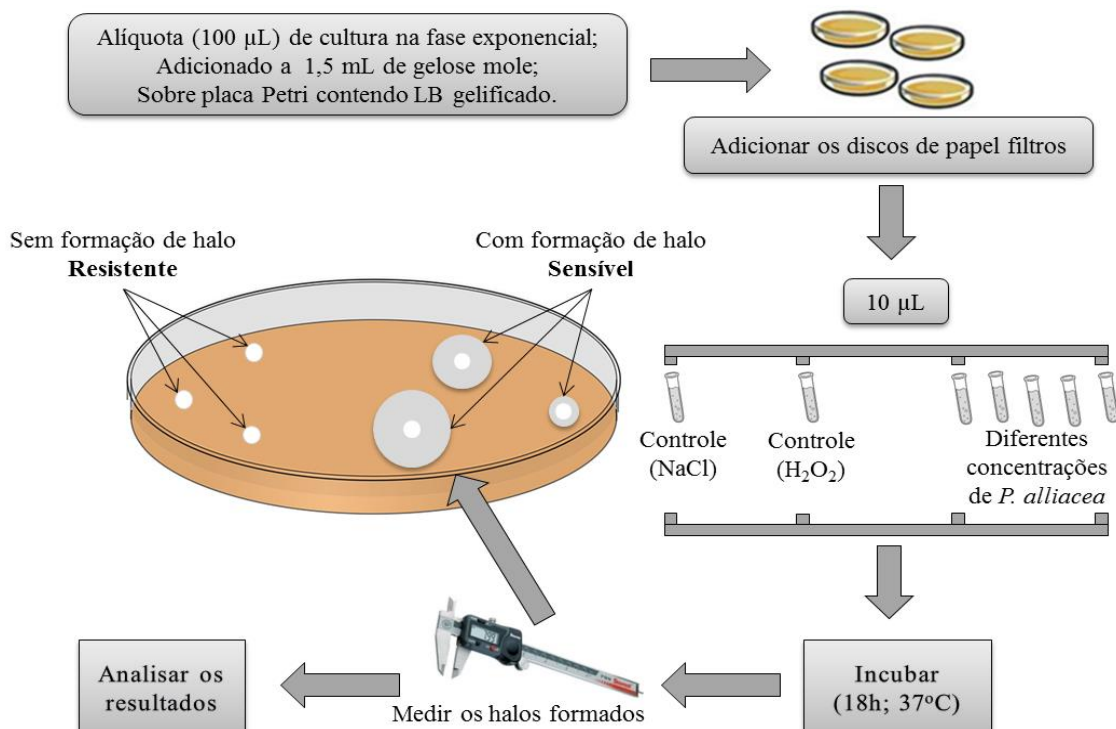
Figura 13 - Esquema representativo do ensaio da mutagênese pela rifampicina.



3.9 Viabilidade qualitativa das partições do extrato

Para avaliar o efeito tóxico das partições do extrato etanólico de *P. alliaceae* em culturas de *E. coli* foi realizado o teste de inibição de crescimento ou ensaio de difusão em ágar (BAUER, 1966; ALFARO et al., 2003). Aliquotas (100 µL) de uma cultura de *E. coli* AB1157, em fase estacionária de crescimento, foram misturadas com 3 mL de gelose mole e vertidas sobre uma placa contendo LB-gelificado. Após um período de tempo necessário para a solidificação da gelose mole (10 a 15 minutos), discos de papel filtro Whattman n° 1 estéril (5 mm de diâmetro) embebidos com 10 µL das diferentes concentrações do extrato etanólico; do controle positivo (H_2O_2 , 5 mM); e do controle negativo (solução estéril de NaCl, 0,9 %) foram colocados na superfície de cada placa. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C, ao abrigo da luz, por um período de 18 horas, após o qual mediu-se, com auxílio de paquímetro o diâmetro dos halos de inibição de crescimento formados em torno dos discos, excluindo-se o diâmetro do disco (5 mm). Cada diâmetro computado foi correspondente à média de três experimentos em triplicata. As médias para as culturas submetidas as diferentes concentrações do extrato e o controle negativo foram, então, comparadas. Na figura 14 está o esquema representativo da viabilidade qualitativa das partições do extrato.

Figura 14 - Esquema representativo da viabilidade qualitativa das partições do extrato.



3.10 Análise estatística

Os dados obtidos durante a realização do presente trabalho foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, tendo se mostrados aptos para serem analisados por testes paramétricos. Assim, foi utilizado o teste ANOVA *oneway*, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou Dunnett, sendo consideradas significativas as diferenças para valores de $p < 0,05$. Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes, em triplicata, e os testes estatísticos foram executados no software GraphPadPrism 5.

As imagens dos géis de agarose foram analisadas utilizando-se o software Image J, versão 1.51o 7 para a quantificação das quebras no plasmídeo e no DNA genômico de *E.coli*.

3.11 Meios de cultura e soluções

Quadro 2 - Soluções utilizadas no preparo dos extratos.

Soluções	Composição - Concentração	Procedência
Extrato bruto	1 g do material seco 500 mL de Álcool Etílico Absoluto 99,5 % P.A.	VETEC
Solução mãe de <i>P. alliacea</i>	Dimetilsulfóxido (DMSO) – 10 % Extrato bruto Água ultrapura	PROQUÍMIOS PERMUTION

Quadro 3 - Meios de cultura e soluções utilizadas na obtenção das culturas bacterianas.

Meios/Soluções	Composição - Concentração	Procedência
Meio LB líquido (Lúria & Burrous, 1957)	Extrato de levedura - 0,45 % Bacto-triptone - 0,9 % NaCl - 0,9 % pH 7,0	DIFCO ACUMEDIA LAFAN
Meio LB gelificado	Meio LB líquido Ágar-ágar - 1,5 %	DIFCO
Solução de Cloreto de sódio	NaCl - 0,9 %	LAFAN

Quadro 4 - Soluções utilizadas determinação do potencial genotóxico dos extratos em células bacterianas.

Soluções	Composição - Concentração	Procedência
TE (tampão Tris/EDTA)	Tris•Cl - pH 8,0 - 50 mM EDTA - pH 8,0 - 5 mM	PROQUÍMIOS LAFAN
Gel de agarose <i>Low Melting Point</i>	Agarose <i>Low Melting Point</i> - 2,5 % TE gelado	SIGMA
Gel de agarose <i>Normal Melting Point</i>	Agarose <i>Normal Melting Point</i> - 0,76 %	SIGMA
Tampão de corrida alcalino	NaOH - 0,03 mM EDTA - 0,01 mM	LAFAN LAFAN
Solução de neutralização	NaCl - 30 mM Tris•Cl - pH 6,0 - 50 mM	LAFAN PROQUÍMIOS

Quadro 5 - Soluções utilizadas na avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial.

Soluções	Composição - Concentração	Procedência
Cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Estanho [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$] Água ultrapura	SIGMA PERMUTION
Solução tampão Tris-Acetato (TAE) 50X	Tris-hidroximetil aminometano – 242 g Ácido acético glacial - 57,1 mL EDTA (0,5 M; pH 8,0) - 100 mL Água ultrapura - qsp 1000 mL	PROQUÍMIOS PERMUTION LAFAN LAFAN
TAE 1X	Tris-acetato - 0,04 M EDTA - 0,001 M	PROQUÍMIOS LAFAN
Gel de agarose <i>Normal Melting Point</i>	Agarose <i>Normal Melting Point</i> - 0,8 % TAE 1X - qsp 100 mL	SIGMA
Tampão de carregamento (6X)	Azul de bromofenol - 0,25 % Xileno cianol - 0,25 % Glicerol - 30 %	SIGMA SIGMA MERCK
Brometo de etídeo	Brometo de etídeo - 0,5 μg Água ultrapura - qsp 1,0 mL	SIGMA PERMUTION

Quadro 6 - Soluções utilizadas na transformação bacteriana.

Soluções	Composição - Concentração	Procedência
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	CaCl_2 (100 mM) Água ultrapura	SYNTH PERMUTION
LB gelificado com ampicilina	LB gelificado Ampicilina (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	PFIZER

Quadro 7 - Soluções utilizadas no ensaio da mutagênese pela rifampicina com a cepa AB1157.

Soluções	Composição - Concentração	Procedência
Gelose	Ágar-ágar - 0,6 % NaCl - 0,5 % Água ultrapura	DIFCO LAFAN PERMUTION
Rifampicina	Rifampicina (30 mg/mL)	SIGMA
LB gelificado com rifampicina	LB gelificado Rifampicina (100 µg/mL)	SIGMA

Quadro 8 - Reagentes utilizados na viabilidade qualitativa das partições do extrato.

Reagentes	Quantidades	Procedência
Água ultrapura - H ₂ O	300 mL	PERMUTION
Hexano - CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	600 mL	SYNTH
Diclorometano - CH ₂ Cl ₂	600 mL	TEDIA
Acetado de etila - C ₄ H ₈ O ₂	600 mL	VETEC
Butanol - C ₄ H ₁₀ O	600 mL	VETEC
Sulfato de sódio anidro P.A. - Na ₂ SO ₄	20 g	VETEC

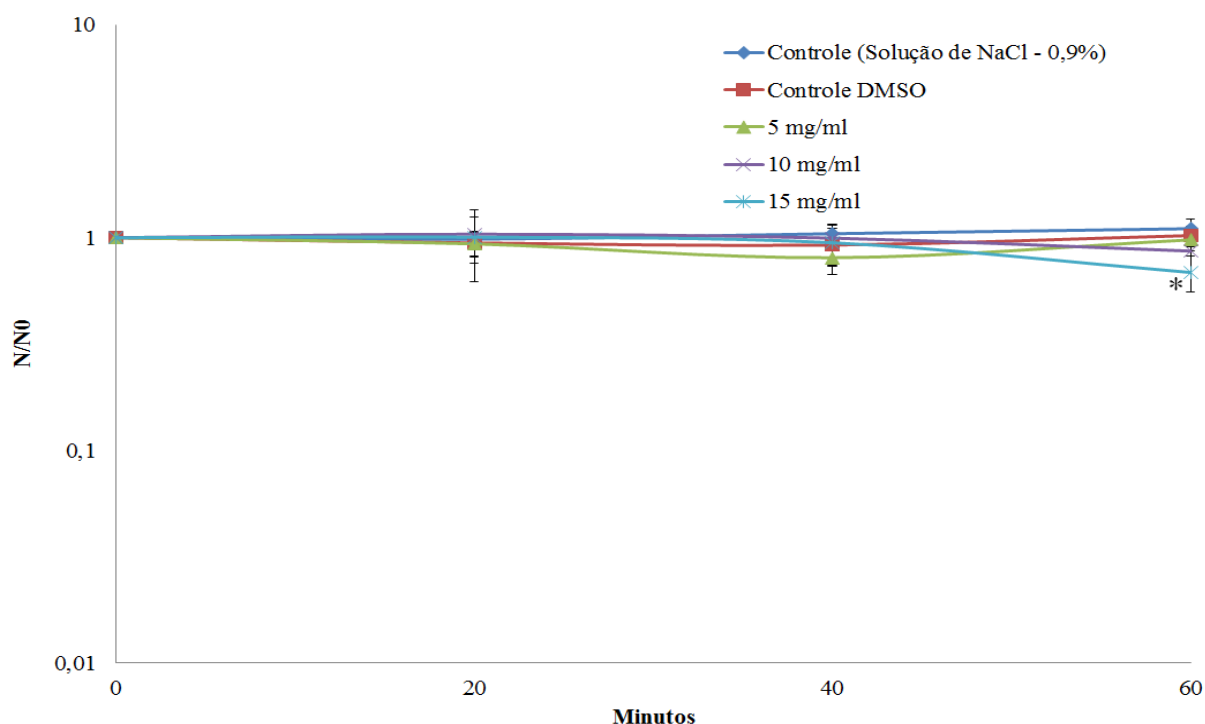
4 RESULTADOS

4.1 Determinação do potencial citotóxico do extrato em células bacterianas

Para avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de folhas de *P. alliacea*, culturas de *E. coli* AB1157, proficientes em todos os mecanismos de reparo do DNA, foram inicialmente incubadas com o extrato nas concentrações de 5, 10 e 15 mg/mL, durante 1 hora. Dois controles experimentais foram preparados, consistindo de amostras de células bacterianas cultivadas durante esse tempo em solução de NaCl 0,9 % e também em presença de DMSO, na mesma proporção utilizada para diluir o extrato.

Os resultados obtidos nesta etapa estão descritos na figura 15 e mostram que não houve alteração da sobrevivência celular nas concentrações de 5 e 10 mg/mL ($p > 0,05$). A concentração mais alta apresentou um efeito citotóxico apenas ao final de 1 hora de incubação ($p < 0,05$).

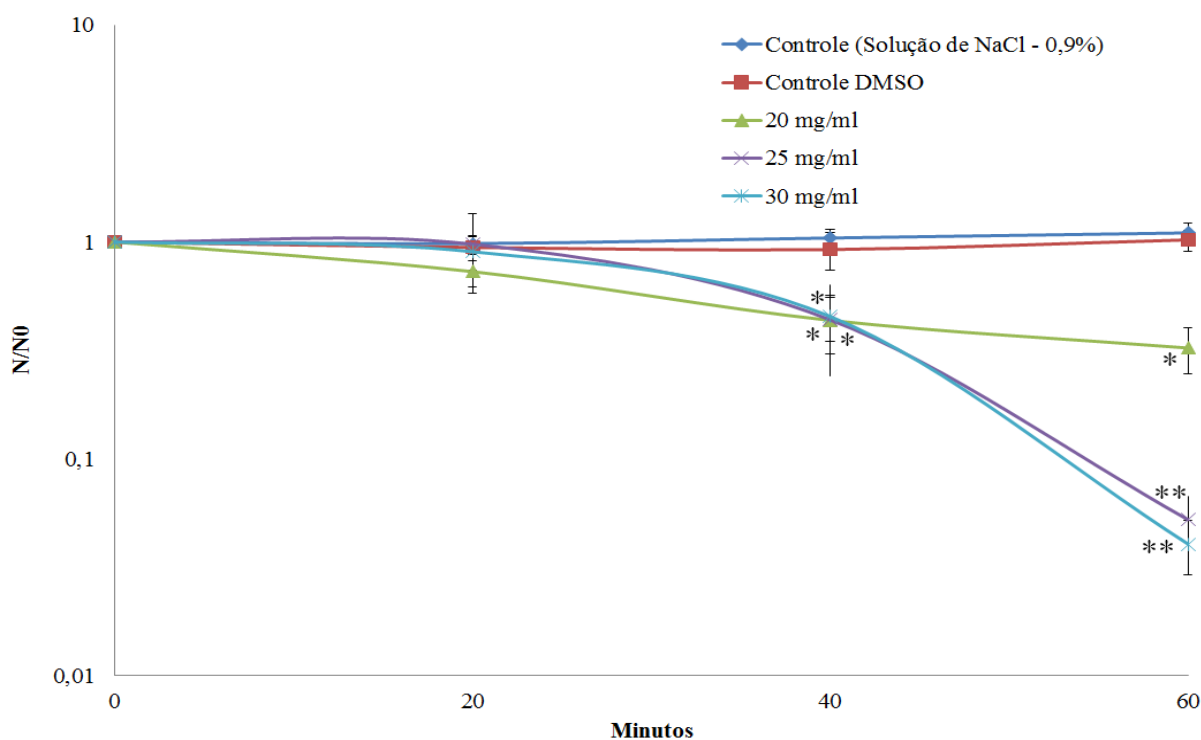
Figura 15 - Citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* (5-15 mg/mL) com *E. Coli*, AB1157.



Legenda: Como controle foi utilizado a solução de NaCl (0,9 %) e o DMSO na mesma concentração que o extrato bruto é eluído (1:10). Símbolo diferente indica diferença estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$ - Teste One Way ANOVA/Tukey).

A análise dos resultados indicou um efeito citotóxico significativo ($p < 0,05$) já a partir de 40 minutos de incubação. Ao final de 60 minutos a morte celular foi ainda mais expressiva nas amostras expostas a 25 e 30 mg/mL, sendo significativamente diferentes ($p < 0,05$) daquela observada para a concentração de 20 mg/mL (figura 16).

Figura 16 - Citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* (20-30 mg/mL) com *E. Coli*, AB1157.

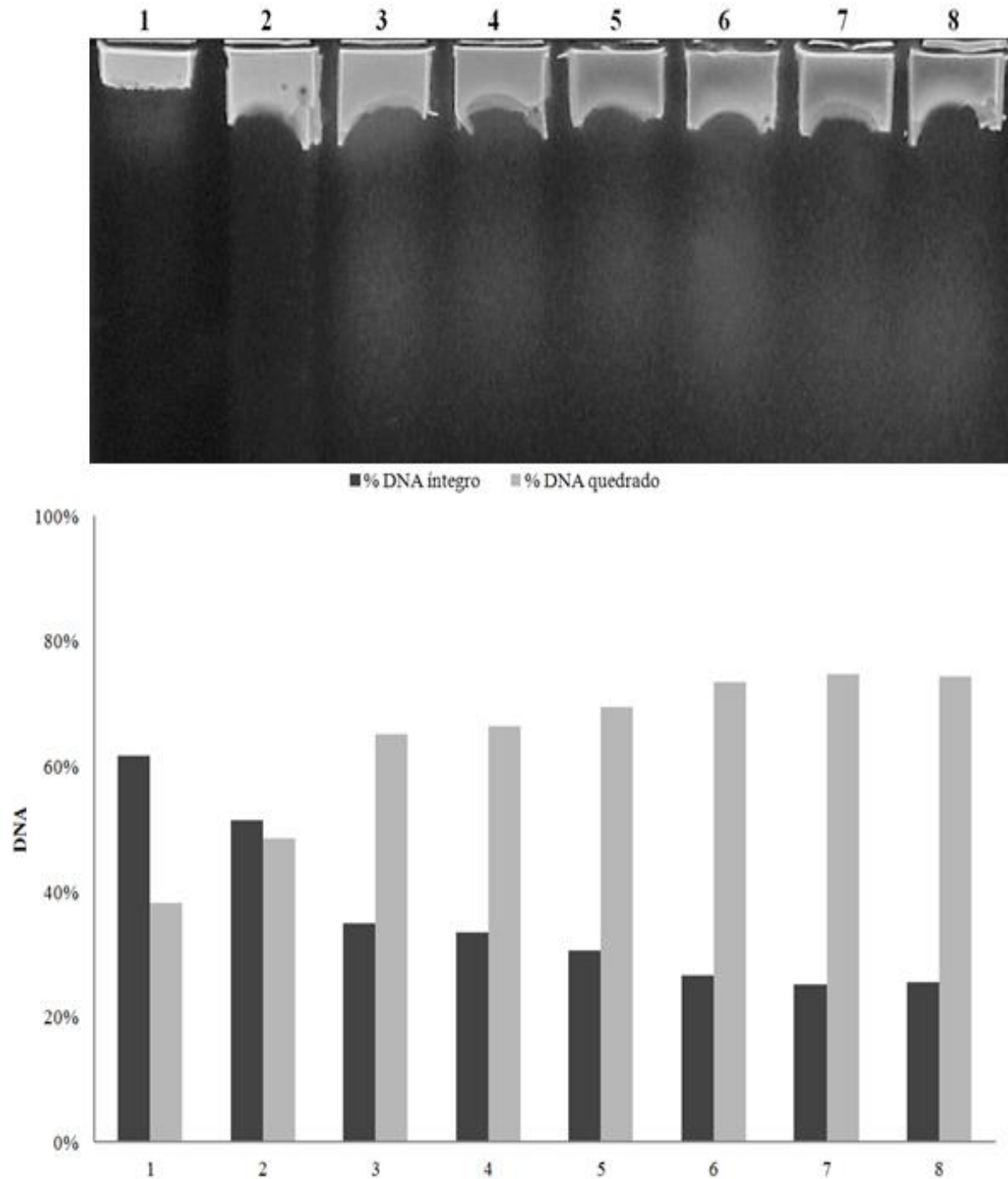


Legenda: Culturas de *E. coli* foram incubadas com diferentes concentrações de extrato de *P. alliacea* durante 60 minutos. Como controles foram utilizados solução de NaCl (0,9 %) e DMSO na mesma concentração que o extrato bruto é eluído (1:10). Símbolos diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$ - Teste One Way ANOVA/Tukey).

4.2 Determinação do potencial genotóxico do extrato em células bacterianas

O resultado da eletroforese alcalina em gel de agarose do DNA genômico de *E. coli* indica que a incubação com *P. alliacea* foi capaz de promover quebras no DNA de *E. coli*, *in vivo*. Conforme pode ser visto na figura 17, esse efeito parece maior nas concentrações mais elevadas do extrato (20, 25 e 30 mg/mL).

Figura 17 - Eletroforese em gel alcalino de agarose (0,76 %) e análise densitométrica de DNA genômico de *E. coli* (AB1157) incubado após 60 minutos com extrato etanólico de *P. alliacea* (5-30 mg/mL).



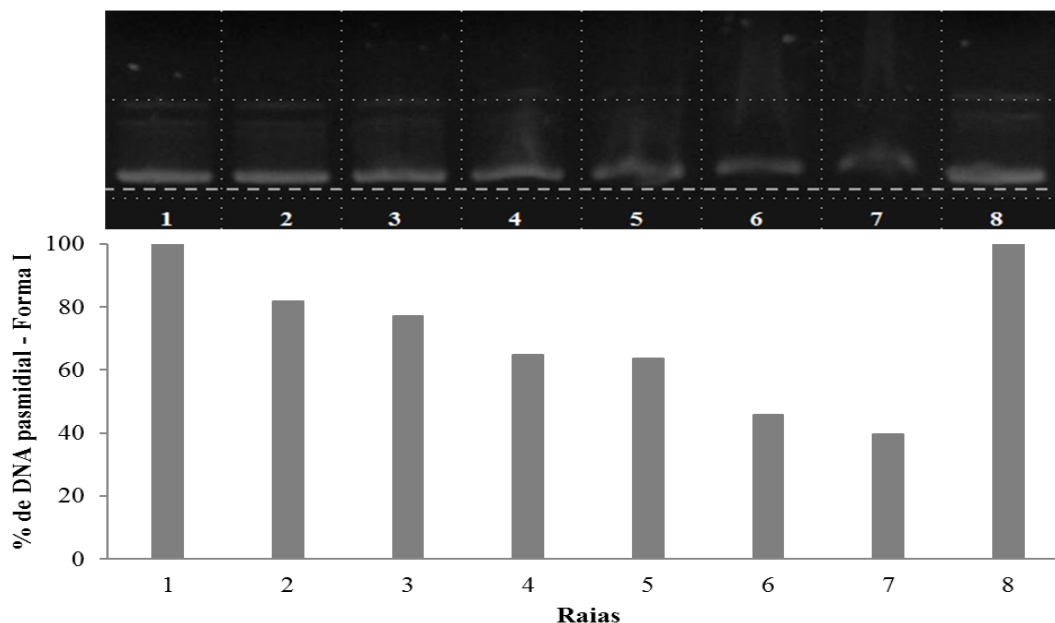
Legenda: *E. coli* (AB1157) incubada por 60 minutos com extrato etanólico de *P. alliacea* (5-30 mg/mL). Raias: (1) Controle – DNA; (2) Controle – SnCl_2 – 50 $\mu\text{g/mL}$; (3) 5 mg/mL; (4) 10 mg/mL; (5) 15 mg/mL; (6) 20 mg/mL; (7) 25 mg/mL; (8) 30 mg/mL.

4.3 Avaliação do potencial genotóxico do extrato em DNA plasmidial

O potencial genotóxico do extrato de *P. alliacea* também foi avaliado, desta vez *in vitro*, por meio de eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial. Amostras de plasmídeos (200 ng) foram incubadas com concentrações crescentes de extrato e o padrão de migração no gel de eletroforese foi avaliado.

Como pode ser observado na figura 18, o extrato não foi capaz de induzir quebras na molécula de DNA, forma II – círculo aberto e forma III – linear, nas concentrações testadas (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL), quando comparado ao controle (raias 1 e 8). Porém, é possível observar um retardo no padrão de migração das amostras incubadas com o extrato (raias de 3 a 7), em comparação com o controle. Essa alteração na velocidade de migração do DNA parece ser diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato.

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) com plasmídeo pUC 9.1 incubado após 60 minutos com extrato etanólico de *P. alliacea* (5-30 mg/mL).

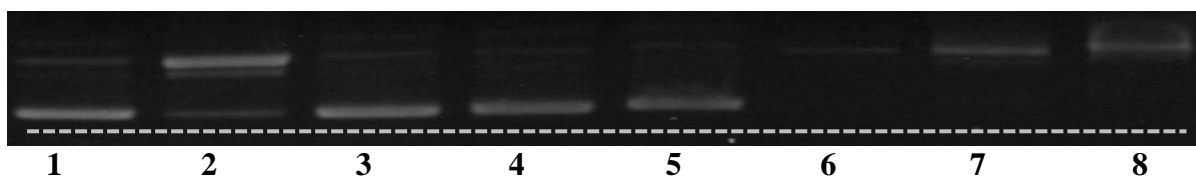


Legenda: Raias: (1) Controle - DNA; (2) 5 mg/mL; (3) 10 mg/mL; (4) 15 mg/mL; (5) 20 mg/mL; (6) 25 mg/mL; (7) 30 mg/mL; (8) Controle - DNA. E gráfico com as porcentagens de DNA plasmidial na Forma I – superhelicoidizado – quantificado em cada raia.

Com o objetivo de compreender a ação do extrato etanólico de *P. alliacea* sobre o DNA plasmidial, e ao mesmo tempo verificar uma possível atividade antigenotóxica do extrato, foi realizada uma modificação no protocolo experimental, consistindo na incubação do DNA plasmidial com SnCl_2 , associado ou não, a diferentes concentrações do extrato. Os

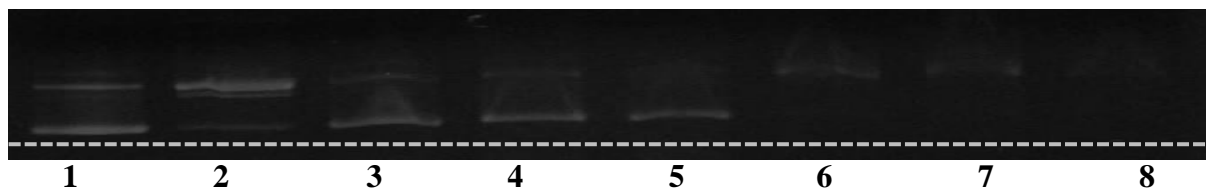
resultados obtidos estão descritos nas figuras 19 e 20. Nelas pode-se confirmar que a incubação com o extrato é capaz de promover alteração no padrão eletroforético (raias 3, 4 e 5 das figuras 18 e 19). Além disso, o extrato não foi capaz de diminuir o efeito genotóxico do cloreto estanoso (raia 2 das figuras 19 e 20) em nenhuma das concentrações testadas, parecendo potencializá-las (raias 6, 7 e 8 das figuras 19 e 20).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) com plasmídeo pUC 9.1 incubado após 60 minutos com extrato etanólico de *P. alliacea* (5-15 mg/mL) e SnCl₂.



Legenda: Raias: (1) Controle - DNA; (2) SnCl₂ (200 µg/mL); (3) 05 mg/mL; (4) 10 mg/mL; (5) 15 mg/mL; (6) 05 mg/mL + SnCl₂ (200 µg/mL); (7) 10 mg/mL + SnCl₂ (200 µg/mL); (8) 15 mg/mL + SnCl₂ (200 µg/mL).

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) com plasmídeo pUC 9.1 incubado após 60 minutos com extrato etanólico de *P. alliacea* (20-30 mg/mL) e SnCl₂.



Legenda: Raias: (1) Controle - DNA; (2) SnCl₂ (200 µg/mL); (3) 20 mg/mL; (4) 25 mg/mL; (5) 30 mg/mL; (6) 20 mg/mL + SnCl₂ (200 µg/mL); (7) 25 mg/mL + SnCl₂ (200 µg/mL); (8) 30 mg/mL + SnCl₂ (200 µg/mL).

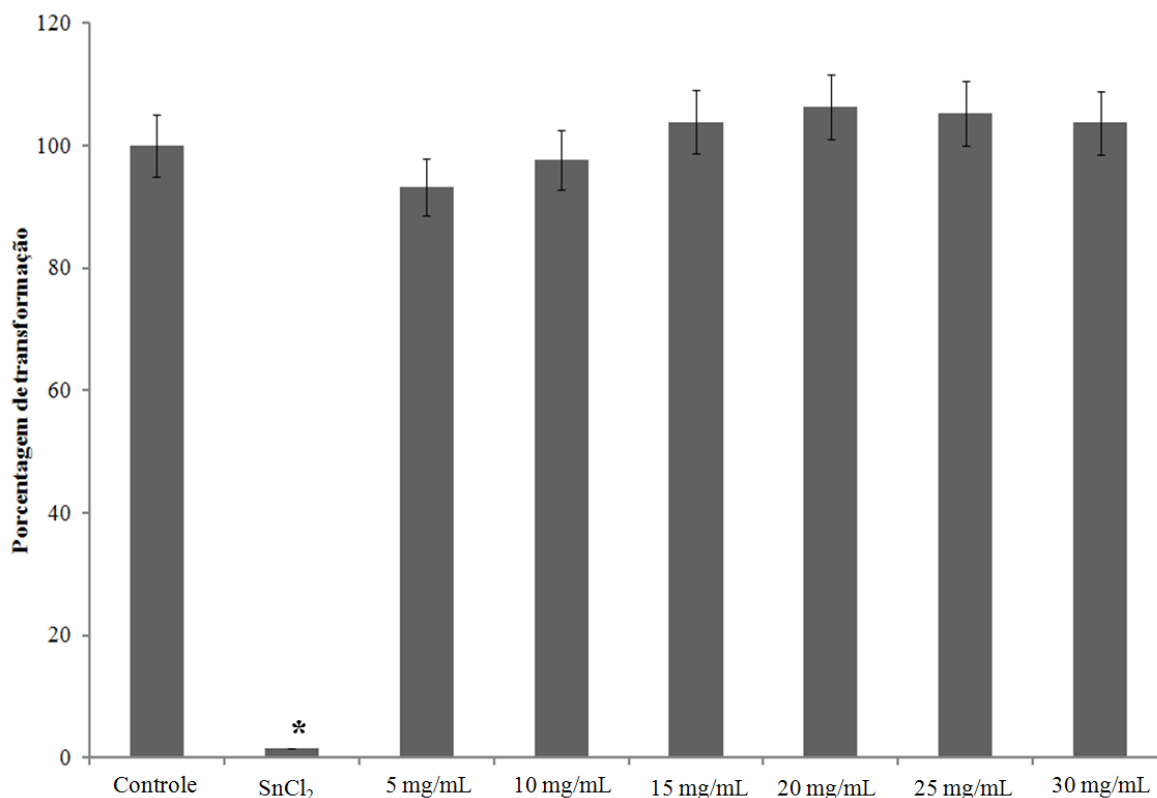
4.4 Transformação bacteriana com os plasmídeos pUC 9.1

Ainda com o intuito de esclarecer o efeito do extrato sobre a molécula de DNA, uma abordagem experimental diferente foi testada, que consistiu em avaliar a modificação da capacidade transformante do plasmídeo em células de *E. coli* AB1157. Desse modo, amostras do DNA plasmidial, incubadas com diferentes concentrações do extrato foram utilizadas para transformar células bacterianas e garantir seu crescimento em meio contendo ampicilina. Lesões provocadas na molécula de DNA poderiam diminuir essa capacidade. Mais uma vez o SnCl₂ (200 µg/mL) foi utilizado como controle positivo, pois sua ação promove quebras na

molécula plasmidial, impossibilitando sua ação de transformar células sensíveis à ampicilina em células capazes de crescer em meio contendo esse antibiótico (DE MATTOS et al., 2000).

Os resultados obtidos indicam que as diferentes concentrações do extrato testadas não diminuiram significativamente ($p > 0,05$) a percentagem de células transformadas (figura 21).

Figura 21 - Gráfico com as porcentagens de transformação bacteriana.



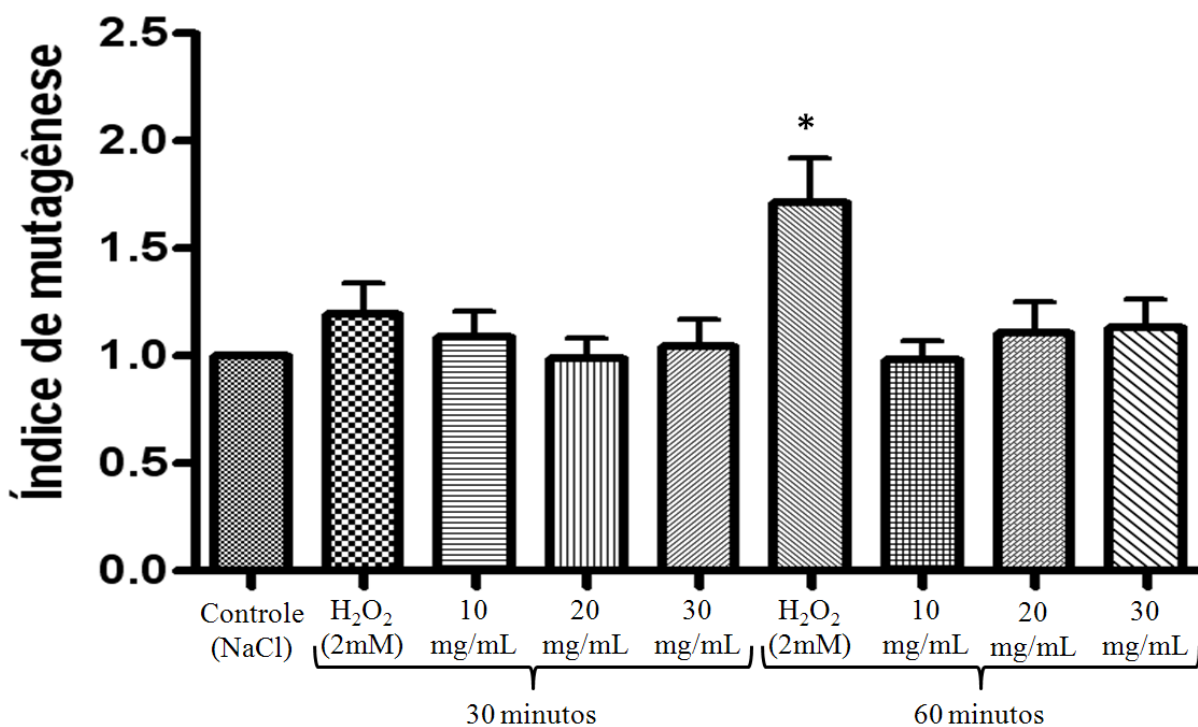
Legenda: Plasmídeos pUC 9.1 incubados por 60 minutos com extrato etanólico de *P. alliecia* (5-30 mg/mL) e SnCl₂ (200µg/mL). Símbolos diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. ($p < 0,05$ - Teste One Way ANOVA/Dunnett).

4.5 Determinação do potencial mutagênico do extrato em células bacterianas

A técnica de mutagênese pela rifampicina foi empregada para avaliar o potencial mutagênico do extrato em estudo. No gráfico de colunas, apresentado na figura 22, pode ser observada a frequência de mutantes induzida por cada concentração do extrato. Os dados obtidos no ensaio de mutagênese pela rifampicina mostram que o extrato não induziu o aumento significativo de células mutadas ($p > 0,05$), embora pareça haver uma tendência de

incremento da mutagênese nas maiores concentrações testadas. Como controle positivo foi empregado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em uma concentração sub-letal (2 mM).

Figura 22 - Frequência de mutantes induzidos pelo extrato e H₂O₂ em *E. coli* AB1157.



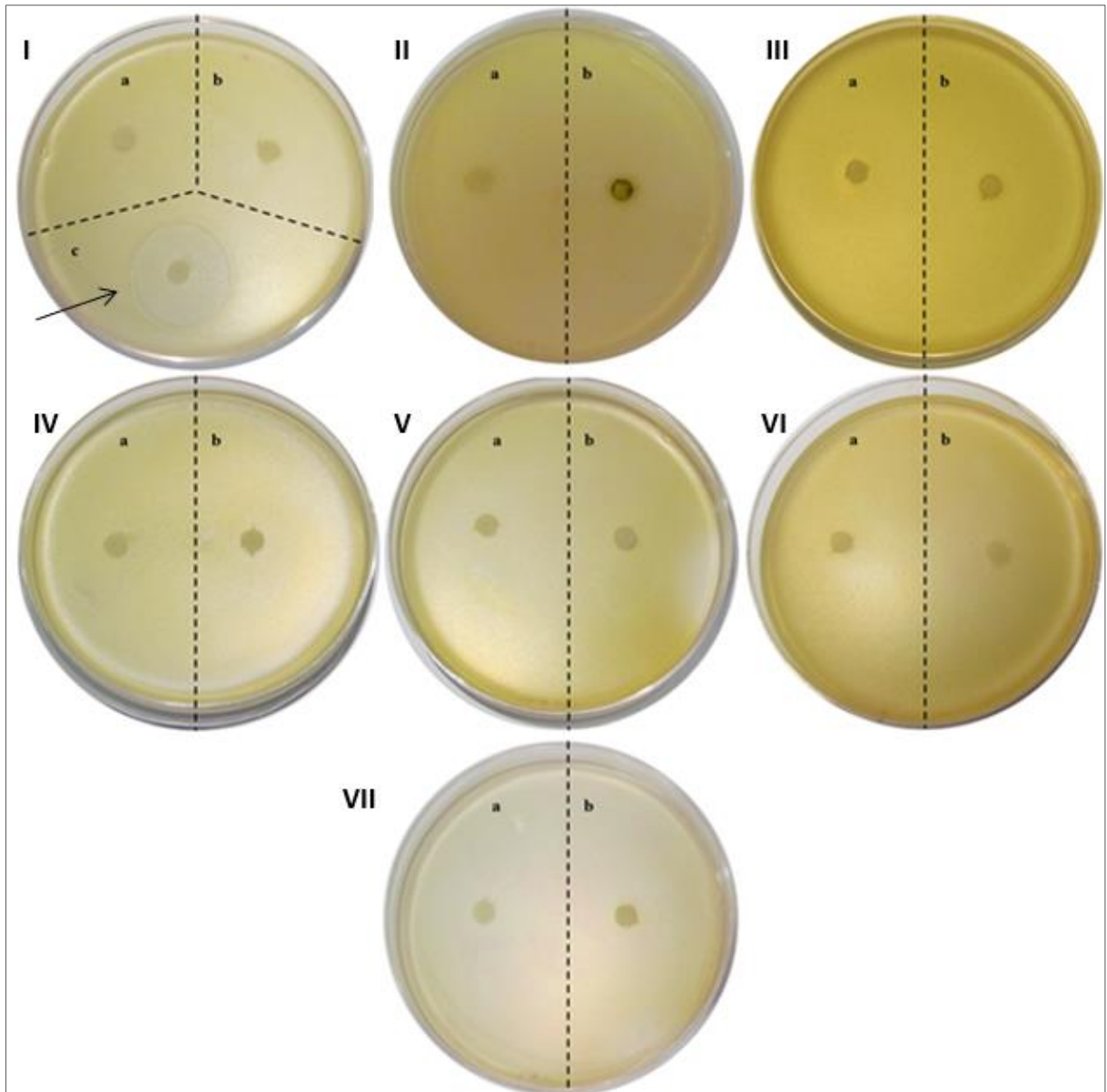
Legenda: Culturas de *E. coli*, AB1157, incubadas por 30 e 60 minutos com extrato etanólico bruto de *P. alliacea* (10, 20 e 30 mg/mL) e H₂O₂ (2 mM). Símbolos diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$ - Teste One Way ANOVA/Dunnet).

4.6 Viabilidade qualitativa das partições do extrato

O ensaio de difusão em ágar foi empregado para avaliar de forma qualitativa a citotoxicidade das partições do extrato etanólico bruto de folhas de *P. alliacea*. As partições foram diluída com DMSO na proporção de 1:10. Como controle foram utilizados solução de cloreto de sódio (0,9 %), DMSO (1:10) e peróxido de hidrogênio (5 mM). As concentrações testadas, das partições e do extrato bruto, foram: hexano (1,352 e 0,224 mg/mL), diclorometano (0,224 e 0,112 mg/mL), acetato de etila (1,317 e 0,224 mg/mL), butanol (1,363 e 0,224 mg/mL), água (0,434 e 0,224 mg/mL) e extrato bruto (1,470 e 0,224 mg/mL).

Na figura 23 é possível observar que não houve formação do halo de inibição induzido pelas partições, nas concentrações testadas, não sendo possível identificar se alguma delas apresenta toxicidade diferenciada.

Figura 23 - Viabilidade qualitativa das partições do extrato em *E. coli* AB1157.



Legenda: **I.** Controles: **a.** Cloreto de sódio (0,9 %); **b.** DMSO (1:10); **c.** H₂O₂ (5 mM). **II.** Partição hexano: **a.** 0,224 mg/mL; **b.** 1,352 mg/mL. **III.** Partição diclometano: **a.** 0,112 mg/mL; **b.** 0,224 mg/mL. **IV.** Partição acetato de etila: **a.** 0,224 mg/mL; **b.** 1,317 mg/mL. **V.** Partição butanol: **a.** 0,224 mg/mL; **b.** 1,363 mg/mL. **VI.** Partição água: **a.** 0,224 mg/mL; **b.** 0,434 mg/mL. **VII.** Extrato bruto: **a.** 0,224 mg/mL; **b.** 0,1470 mg/mL. A seta (**I.c.**) indica a formação do halo no controle positivo H₂O₂ (5 mM).

DISCUSSÃO

Os resultados do estudo da citotoxicidade do extrato alcoólico de *P. alliacea* descritos nas figuras 15 e 16 indicam que *E. coli* AB1157 se mostrou bastante resistente ao extrato, apresentando morte celular expressiva apenas nas concentrações de 25 e 30 mg/mL ao final de 60 minutos de incubação.

Dados semelhantes foram obtidos a partir da incubação de bactérias gram-positivas e gram-negativas (incluindo *E. coli*) com um extrato metanólico bruto de folhas de *P. alliacea*, onde as células apresentaram sensibilidade ao extrato apenas na maior concentração testada, de 100 mg/mL. Os autores sugerem que essa atividade citotóxica poderia ser devida a presença de fenóis e taninos no extrato (OLIVEIRA, RAMOS & ALMEIDA, 2013). Os autores ainda relatam, que o extrato foi considerado atóxico frente a *A. salina*. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os de Oliveira e colaboradores (2013) e, desse modo, é possível indicar um potencial citotóxico do extrato, porém ainda não é possível apontar a causa da diminuição da viabilidade celular. É interessante ressaltar que o potencial citotóxico de *P. alliacea* ou de suas partições parece estar relacionado ao modelo biológico estudado, uma vez que vários autores, utilizando diferentes linhagens de células eucarióticas em cultura, relatam diminuição significativa da viabilidade quando expostas à concentrações na ordem de microgramas (URUEÑA et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2014; LOWE et al., 2014). Assim, os resultados dessa dissertação sustentam a ideia de que a ação citotóxica do extrato de *P. alliacea* possa ser diferente, dependendo do tipo de organismo empregado no estudo.

Para tentar associar a diminuição da viabilidade a uma possível ação genotóxica de *P. alliacea* foi realizada uma eletroforese do DNA de *E. coli* incubada com diferentes concentrações do extrato. Conforme descrito na figura 17, há um crescente arrasto de DNA, em uma relação direta com o aumento da concentração, indicando que o extrato é capaz de promover quebras no material genético bacteriano. Esse resultado sugere que as quebras no DNA provocadas pelo extrato podem ser responsáveis pela diminuição da viabilidade verificada no ensaio de citotoxicidade.

O efeito genotóxico do extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* também foi testado *in vitro* utilizando DNA de plasmídeos pUC 9.1. De acordo com a figura 18, a incubação com o extrato não induziu quebras na molécula de DNA plasmidial (raias 3 a 7), quando comparado ao controle (raias 1 e 8). Porém nota-se um retardo no padrão de migração das amostras incubadas com o extrato, diretamente proporcional ao aumento da concentração.

Os resultados apresentados até o momento indicam que o extrato de *P. alliacea* tem um potencial citotóxico, pelo menos nas mais altas concentrações testadas, e que a morte celular pode estar relacionada às quebras induzidas no DNA bacteriano. Porém, o extrato não foi capaz de induzir quebras no DNA plasmidial *in vitro*, apesar de promover um retardo na velocidade de migração no gel de agarose. Essa aparente contradição poderia ser explicada por uma possível metabolização, pelas bactérias, de componentes presentes no extrato que passariam a ter uma ação genotóxica. Nesse contexto há na literatura algumas referências mostrando a metabolização, em bactérias *E. coli*, de esteviosídeo em esteviol (WINGARD et al., 1980; CARDOSO et al., 1996; TERAJ et al., 2002; NUNES et al., 2006).

De Mattos e colaboradores (2000) também verificaram um retardo no padrão de migração eletroforética de plasmídeos pUC 9.1 incubados com concentrações crescentes de SnCl_2 e creditaram esse fenômeno a uma alteração da carga elétrica do DNA promovida pela interação do íon estanoso com a molécula de ácido nucléico. Portanto, se uma possível interação de um ou mais componentes do extrato com o DNA poderia ser responsável pelo retardo na migração, isso também poderia contribuir para uma diminuição no poder transformante do plasmídeo. Para tentar esclarecer essa hipótese, amostras de DNA plasmidial incubado com diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. alliacea* foram utilizadas para transformar células de *E. coli* AB1157 competentes e os resultados apresentados na figura 21 mostram que não houve variação significativa ($p > 0,05$) na eficiência de transformação.

Recentemente, Soares e colaboradores (2014) mostraram que extratos aquosos de *P. alliacea*, obtidos a partir de folhas de plantas cultivadas no campo e *in vitro*, foram capazes de promover quebras simples e duplas no DNA de plasmídeos, mas também protegeram o DNA da ação lesiva do cloreto estanoso (SnCl_2). Esse efeito genotóxico/antigenotóxico variou com a concentração dos extratos (1, 5 e 10 mg/mL) e também com suas origens de cultivo. Essa abordagem experimental envolve a incubação de amostras de DNA plasmidial com diferentes concentrações do extrato vegetal a ser testado, na presença ou não de cloreto estanoso, um agente reconhecido por sua ação genotóxica *in vitro* (DE MATTOS, et al., 2004). Esse ensaio também foi utilizado no presente estudo, e os resultados descritos nas figuras 19 e 20 confirmam o efeito de alteração do padrão de migração do DNA e apontam para uma ausência de ação antigenotóxica do extrato, uma vez que ele não foi capaz de diminuir as quebras induzidas pelo íon estanoso, em nenhuma das concentrações testadas.

Esse conjunto de resultados sugere que, *in vitro*, o extrato de *P. alliacea* é capaz de promover algum tipo de interação com o DNA, pois há alteração no padrão de migração dos

plasmídeos no gel de agarose. Porém essa interação não resulta em quebras na molécula, tampouco interfere com a capacidade transformante. Por outro lado, conforme descrito anteriormente, o extrato é capaz de diminuir a viabilidade celular e promover quebras no DNA bacteriano. Dessa maneira, é possível que um ou mais componentes do extrato vegetal possa ser metabolizado pelas bactérias, acarretando quebras no DNA genômico e culminando na morte das células. Ainda, é possível que a interação do extrato com o DNA plasmidial, responsável pelo retardo na migração eletroforética, também ocorra *in vivo*, ativando enzimas de reparo que poderiam clivar o DNA para retirada das lesões e refletindo em um aumento das quebras, conforme os resultados descritos na figura 17.

Como também é possível que o extrato possa interagir com a molécula de DNA e introduzir erros durante o processo de replicação, o potencial mutagênico do extrato bruto foi avaliado pelo ensaio de mutagênese pela rifampicina. Os resultados apresentados na figura 22 indicam que *P. alliacea* não foi capaz de induzir aumento da taxa de mutagênese em *E. coli* AB1157 ($p > 0,05$), porém observa-se uma tendência de aumento de células mutantes nas concentrações de 20 e 30 mg/mL. A análise dos dados da figura permite sugerir que novos experimentos devem ser realizados, com o objetivo de melhor esclarecer a questão. Além disso, parece ser recomendável o emprego de outros protocolos experimentais, como o teste de Ames (ARORA & SOOD, 2017; BORAN & UGUR, 2017) por exemplo, para confirmar o potencial mutagênico do extrato em estudo.

Com o objetivo de identificar se alguma classe de componentes químicos do extrato etanólico de *P. alliacea* poderia ser responsável pelo efeito citotóxico observado nas células bacterianas, o extrato bruto foi submetido a uma partição líquido-líquido em solventes orgânicos de polaridade crescente. Em seguida foi realizado um ensaio qualitativo de viabilidade bacteriana de *E. coli* AB1157, através de difusão em agár. Os resultados da figura 23 mostram que, nas concentrações testadas, nenhuma das partições foi capaz de inibir o crescimento das células bacterianas. Oliveira e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico de folhas de *P. alliacea* utilizando o mesmo ensaio. Os autores verificaram que apenas a concentração de 100 mg/mL apresentou inibição do crescimento em *E. coli* e os autores relacionam esta atividade com a presença de fenóis e taninos no extrato. As concentrações das partições testadas neste trabalho de dissertação foram determinadas de acordo com o rendimento obtido ao fazer o fracionamento do extrato.

Os resultados experimentais obtidos, associados aos da literatura, permitem concluir que *E. coli* apresenta uma alta resistência, tanto ao extrato etanólico bruto quanto as frações

obtidas, e indicam que as últimas devem ser testadas em concentrações mais altas para confirmar a ausência de toxicidade observada.

A ingestão indiscriminada de produtos naturais pode promover efeitos biológicos indesejáveis em diferentes alvos, quer seja em nível celular ou molecular. O desenvolvimento de estudos sobre a ação tóxica desses produtos é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos tanto nos benefícios quanto nos malefícios à saúde proporcionados pelo seu consumo. Dessa forma, os resultados apresentados nesse estudo são relevantes por contribuir para a compreensão dos efeitos biológicos promovidos por *P. alliacea*, uma planta amplamente utilizada na medicina popular.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através das técnicas e condições experimentais empregadas neste estudo permitem concluir que o extrato etanólico bruto de folhas de *P. alliacea*:

- Nas concentrações de 25 e 30 mg/mL e ao final de 60 minutos de incubação, promove uma morte significativa nas células de *E. coli*, *in vivo*;
- É capaz de induzir quebras no DNA de *E. coli*, *in vivo*, em relação direta com o aumento da concentração, indicando que essas lesões podem estar relacionadas à morte das células;
- *In vitro* não induziu quebras na molécula de DNA plasmidial, porém, nota-se um retardo no padrão de migração das amostras incubadas com o extrato, diretamente proporcional ao aumento da concentração;
- Não foi capaz de modificar a eficiência de transformação plasmidial em células de *E. coli* competentes;
- Não apresenta ação antigenotóxica, uma vez que ele não foi capaz de diminuir as quebras induzidas no DNA plasmidial pelo íon estanoso, em nenhuma das concentrações testadas;
- Não induziu mutagênese em *E. coli*;
- As partições do extrato não se mostraram citotóxicas, nas concentrações testadas.

De maneira resumida, o conjunto de resultados obtidos permite concluir que o extrato etanólico de *P. alliacea* é capaz de diminuir a sobrevivência bacteriana e que essas mortes podem estar relacionadas a uma ação genotóxica do extrato. Além disso, é possível ocorrer uma biotransformação de um ou mais compostos presentes no extrato, uma vez que esse efeito genotóxico não é evidente *in vitro*. Com relação ao potencial mutagênico do extrato, os resultados não são conclusivos, devendo ser melhor avaliados, embora nas condições experimentais deste trabalho ele não induziu mutagênese.

PERSPECTIVAS

- ✓ Analisar o perfil fitoquímico do extrato etanólico bruto de folhas de *P. alliacea* e de suas partições, visando correlacionar com os efeitos observados;
- ✓ Utilizar cepas de *E. coli*, deficientes em diferentes genes de reparação do DNA, com o objetivo de identificar qual mecanismo de reparo age nas lesões induzidas pelos extratos, bem como a ação de algumas dessas enzimas nesse processo;
- ✓ Reavaliar a ação mutagênica do extrato, pela resistência à rifampicina, e também por meio de outros ensaios, como o Teste de Ames;
- ✓ Sequenciar o gene *rpoB* de *E.coli*, alvo da rifampicina, para identificar o perfil mutacional induzido pelo extrato de *P. alliacea*.

REFERÊNCIAS

- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Artmed Editora, 2009.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. sSupl, 2006.
- ALFARO, C., URIOS, A., GONZÁLEZ, M.C., MOYA, P.; BLANCO, M. Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 539, n. 1, p. 187-194, 2003.
- ALMEIDA, R.C.; COSTA, D.V.; OLIVEIRA, G.L.D.S.; MENDES, S.M.V. ABORDAGEM FITOQUÍMICA DO EXTRATO FOLIAR DA GUABIRABA, *Campomanesia lineatifolia*. In: **V CONNEPI-2010**. 2010.
- ALONSO, J.R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Isis Ediciones, p. 987, 1998.
- ALVES, T.C, 2012. Disponível em: < <https://coletivocurare.wordpress.com/>>. Acesso em: 28/05/2016.
- ANDRADE, T.M.D.; MELO, A.S.D.; DIAS, R.G.C.; VARELA, E.L.P.; OLIVEIRA, F.R.D.; VIEIRA, J.L.F; ANDRADE, M.A.D.; BAETAS, A.C.; MONTEIRO, A.C.; MAIA, C.D.S.F. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 604-610, 2012.
- ARCEO-MEDINA, G.N.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BORGES-ARGAEZ, R. Synergistic action of fatty acids, sulphides and stilbene against

acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 121-125, 2016.

ARORA, D.S.; SOOD, H. In vitro antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves and their biosafety evaluation. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 115, 2017.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.

BECKER, M.M. **Programas de Fitoterapia na Rede Pública de Saúde**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Saúde Pública). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; GIESBRECHT, A.M., ROQUE, N.F.; DA S BOLZANI, V. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 743-747, 2001.

BLAINSKI, A.; PICCOLO, V.K.; MELLO, J.C.P.; DE OLIVEIRA, R.M. 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.

BORAN, R.; UGUR, A. The mutagenic, antimutagenic and antioxidant properties of *Hypericum lydiu*m. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 402-405, 2017.

CAMARGO, M.T.L.D.A. AMANSA-SENHOR: a arma dos negros contra seus senhores. **Revista Pós Ciências Sociais**, v. 4, n. 8, 2007a.

CAMARGO, M.T.L.D.A. Contribuição etnofarmacobotânica ao estudo de *Petiveria alliacea* L.–Phytolaccaceae–(“amansa-senhor”) e a atividade hipoglicemiante relacionada a transtornos mentais. **Dominguezia**, v. 23, p. 1, 2007b.

CARDOSO, V.N.; BARBOSA, M.F.; MURAMOTO, E.; MESQUITA, C.H.; ALMEIDA, M.A. Pharmacokinetic studies of ¹³¹I-stevioside and its metabolites. **Nuclear medicine and biology**, v. 23, n. 1, p. 97-100, 1996.

CHASE, M.W.; REVEAL, J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 122-127, 2009.

Conselho Federal de Farmácia. Resolução nº 546 de 21 de julho de 2011.
<<http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/546.pdf>>. Acessado em 12/05/2017.

Conselho Federal de Medicina. Resolução nº 1845/2008.
<http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/cfm/2008/1845_2008.htm>. Acessado em 12/05/2017.

Conselho Federal de Nutricionistas. Resolução nº 556 de 11 de abril de 2015
<http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/resolucoes/Res_556_2015.htm>. Acessado em 12/05/2017.

CUERVO, I.M. **Evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de petiveria alliacea l.(anamú)**. Tese (Doutorado em Ciências - Biotecnologia). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, 2011.

DE MATTOS, J.C.; DANTAS, F.J.; BEZERRA, R.J.; BERNARDO-FILHO, M.; CABRAL-NETO, J.B.; LAGE, C.; LEITÃO, A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. **Toxicology letters**, v. 116, n. 1, p. 159-163, 2000.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; MORAES, M.O. Agarose gel electrophoresis system in the classroom: detection of DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 32, n. 4, p. 254-257, 2004.

DE MATTOS, J.C.P.; MOTTA, E.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; DANTAS, F.J.S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Alkaline gel electrophoresis assay to detect DNA strand breaks and repair

mechanisms in *Escherichia coli*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.SPE, p.121-126, 2008.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Unesp, 2002.

DUARTE, M.D.R.; LOPES, J.F. Leaf and stem morphoanatomy of *Petiveria alliacea*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 599-607, 2005.

FALLAH-HOSEINI H.; FAKHRZADEH H.; LARIJANI B.; SHIKHSAMANI A. Review of anti-diabetic medicinal plant used in traditional medicine. **Journal of Medicinal Plants**, v. 1, n. 17, p. 1-8, 2006.

FERRER, J.I. Principales Referencias Etnomédicas sobre el anamú (*Petiveria alliacea* linn) y principios activos encontrados en la planta. Un acercamiento al tema. **Revista CENIC. Ciencias biológicas**, v. 38, n. 1, p. 27-30, 2007.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIED, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. *DNA Repair and Mutagenesis*. 2a ed. Washington: ASM Press; 2006. p.169-214.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

HERNÁNDEZ, J.F., URUEÑA, C.P.; SANDOVAL, T.A.; CIFUENTES, M.C.; FORMENTINI, L.; CUEZVA, J.M.; FIORENTINO, S. A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces ATP depletion and decreases β -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

HERNÁNDEZ, J.F.; URUEÑA, C.P.; CIFUENTES, M.C.; SANDOVAL, T.A.; POMBO, L.M.; CASTAÑEDA, D.; FIORENTINO, S. A *Petiveria alliacea* standardized fraction induces breast adenocarcinoma cell death by modulating glycolytic metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 641-649, 2014.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M.T.; MARTÍNEZ, V.E.R.; FERRER, J.I.; ANDREU, C.M.F.; MACHÍN, G.F.M.; LANCHA, M.R.P.; MONROY-VACA, E.X.; MEIS, J.F. In Vitro Antifungal Activity of Crude Hydro-Alcoholic Extract of *Petiveria alliacea* L on Clinical Candida Isolates. **Clinical Microbiology**, v. 2014, 2014.

JUNIOR, V.F.D. Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State: acceptance by health professionals, ay of use of the population. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 308-313. 2008.

JUNIOR, V.F.D.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KERDUDO, A.; GONNOT, V.; NJOH ELLONG, E.; BOYER, L.; MICHEL, T.; ADENET, S.; FERNANDEZ, X. Essential oil composition and biological activities of *Petiveria alliacea* L. from Martinique. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 3, p. 186-196, 2015.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

LEITÃO, A., LAGE, C., CABRAL-NETO, J., PÁDULA, M.; GOMES, R. *Radiobiologia e fotobiologia - Respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos*. Apostila para Graduação e Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. 2013.

LOPEZ-MARTINS, R.A.; PEGORARO, D.; WOISKY, R.; PENNA, S.; SERTIÉ, J. The antiinflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). **Phytomedicine**, v. 9, p. 245-8, 2002.

LOWE, H.I.; FACEY, C.O.; TOYANG, N.J.; BRYANT, J. L. Specific RSK kinase inhibition by dibenzyl trisulfide and implication for therapeutic treatment of cancer. **Anticancer Research**, v. 34, n. 4, p. 1637-1641, 2014.

LÚRIA, S.E.; BURROUS, J. Hybridization between *E.coli* and Shigella. **Journal of Bacteriology**, v. 74, n. 4, p. 461, 1957.

LUZ, D.A.; PINHEIRO, A.M.; SILVA, M.L.; MONTEIRO, M.C.; PREDIGER, R. D.; MAIA, C.S.F.; FONTES-JÚNIOR, E.A. Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 182-201, 2016.

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. 165-9, 2010.

MARANHÃO, A.Q.; MORAES, L.M.P. Extração e purificação de DNA. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; SOUZA, M.T.de. Técnicas básicas em biologia molecular. **Brasília: Universidade de Brasília**, 2003.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 24-28, 1999.

MARTY, A.T. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 19, p. 1852-1853, 1999.

MINCZEWSKY, J.; CHWASTOWSKO, J.; DYBCZYWKI, R. Separation and Preconcentration Methods in Inorganic Trace Analysis; John Wiley: **Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium**, v. 31, n. 1, p. 25-26, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. 2006. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>. Acessado em 20/02/2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. 2012. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf>. Acessado em 20/02/2016.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOTTA, E.S. **Participação de enzimas de reparo por excisão de bases na restauração de lesões induzidas pela associação da radiação ultravioleta A e cloreto estano em *Escherichia coli***. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.

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, p. 138-146, 2016.

NASCIMENTO, A.A.C.; ESPREAFICO, E.M.; LARSON, M.L.P.; MONESI, N.; ROSSI, N.M.M.; RODRIGUES, V. Tecnologia do DNA recombinante. **Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo**, 1999.

NUNES, A.P. M.; DE MATTOS, J.C.P.; FERREIRA-MACHADO, S.C.; NUNES, R.M.; ASAD, N.R., DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C. CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Biological effects of stevioside on the survival of *Escherichia coli* strains and plasmid DNA. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 293, n. 1-2, p. 187-192, 2006.

OLIVEIRA, D.S.B.; RAMOS, R.D.S.; DE ALMEIDA, S.S.M.D.S. Phytochemical study, microbiological and cytotoxicity activity in *Artemia salina* Leach, aerial parts of *Petiveria*

alliacea L. Phytolaccaceae. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 3, n. 3, p. 76-82, 2013.

OLIVEIRA, F.; GOKITHI, A. **Fundamentos da Farmacobotânica**, 2ª edição, Editora Atheneu, 2000.

OLIVEIRA, F.R.D. **Avaliação antifúngica, farmacognóstica e toxicológica sazonal de *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará, 2012.

OLUWOLE, F.S.; BOLARINWA, A.F. The uterine contractile effect of *Petiveria alliacea* seeds. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 3-6, 1998.

PAGANI, E.; SANTOS DE F.L., J.; RODRIGUES, E. Culture-Bound Syndromes of a Brazilian Amazon Riverine population: tentative correspondence between traditional and Western medicine terms and possible ethnopharmacological implications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 80-89, 2017.

PANTOJA, S.C.D.S.; SUL, N.A.D.S.; MIGUEL, N.D.N. Levantamento etnobotânico de *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) comercializadas no Mercado de Madureira-RJ. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v.17, n.17, p.184-190, 2013.

PEDROLLO, C.T.; KINUPP, V.F.; SHEPARD, G.; HEINRICH, M. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 111-124, 2016.

PÉREZ-LEAL, R.; GARCIA-MATEOS, M.R.; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, M.; SOTO-HERNÁNDEZ, M. Actividad citotóxica y antioxidante de *Petiveria alliacea* L. **Revista Chapingo Serie Rorticultura**, v. 12, n. 1, p. 51-56, 2006.

PETROVSKA, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

SAKAMOTO, H.T.; GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.; HUMBERTO T. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1396-1401, 2005.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Immunology**, v. 49, n. 2, p. 411, 1983.

SEDGWICK, S.; GOODWIN, P.A. Differences in mutagenic and recombinational DNA repair in enterobacteria. **Proceedings of National Academic of Sciences**, v.82, p.4172-76, 1985.

SILVA, J.P.B.; DE OLIVEIRA, F.A.R.; DA PAIXÃO, T.P.; MALCHER, N.I.S.; DOS SANTOS, P.I.C.; BAETAS, A.C.; BATITUCCI, M.C.P.; MONTEIRO, M.C.; DE ANDRADE, M. A. I. *In vitro* and *in vivo* assessment of genotoxic activity of *Petiveria alliacea*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 34, p. 718-727, 2016.

SILVA, M.L.; LUZ, D.A.; PAIXÃO, T.P.D.; SILVA, J.P.B.; BELÉM-FILHO, I.J.A.; FERNANDES, L.M.P.; GONÇALVES, A.C.B.; FONTES-JÚNIOR, E.A.; ANDRADE, M.A.D.; MAIA, C.S.F. *Petiveria alliacea* exerts mnemonic and learning effects on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 124-129, 2015.

SOARES, B.O.; OLIVEIRA, M.B.; MANSUR, E.; DANTAS, F.J.S.; DE MATTOS, J.C.P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; GAGLIARDI, R.F. Effect of extracts from field and *in vitro* plants of *Petiveria alliacea* L. on plasmidial DNA. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 35, p. 1101-1109, 2014.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 435-440, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2013.

TERAI, T.; REN, H.; MORI, G.; YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, T. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 50, n. 7, p. 1007-1010, 2002.

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. 8, n. 1, p. 60, 2008.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 2, p. 140-156, 2015.

WEBSTER, S.A., MITCHELL, S.A.; GALLIMORE, W.A.; WILLIAMS, L.A.D.; AHMAD, M.H. Biosynthesis of Dibenzyl Trisulfide (DTS) from somatic embryos and rhizogenous/embryogenic callus derived from Guinea hen weed (*Petiveria alliacea* L.) leaf explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 44, n. 2, p. 112-118, 2008.

WINGARD, R.E.; BROWN, J.P.; ENDERLIN, F.E.; DALE, J.A.; HALE, R.L.; SEITZ, C.T. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. **Cellular and molecular life sciences**, v. 36, n. 5, p. 519-520, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. 2002.

ZOLOTOV, Y.A.; KUZ'MIN, N.M.; PETRUKHIN, O.M.; SPIVAKOV, B.Y. Liquid-liquid extraction in inorganic analysis: current status and prospects. **Analytica Chimica Acta**, v. 180, p. 137-161, 1986.