



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

Luana Brito do Nascimento de Araújo

**Estudo dos potenciais citotóxico, antineoplásico e mutagênico do
extrato etanólico de *Hovenia dulcis* Thunberg**

Rio de Janeiro

2017

Luana Brito do Nascimento de Araújo

Estudo dos potenciais citotóxico, antineoplásico e mutagênico do extrato etanólico de *Hovenia dulcis* Thunberg

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



Orientador: Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas

Coorientadora: Prof.^a Dra. Norma Albarello

Rio de Janeiro

2017

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

A663 Araújo, Luana Brito do Nascimento de.
Estudo dos potenciais citotóxico, antineoplásico e mutagênico do extrato etanólico de *Hovenia dulcis* Thunberg / Luana Brito do Nascimento de Araújo. – 2017.
78 f. : il.

Orientador: Flávio José da Silva Dantas.
Coorientadora: Norma Albarello.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses 2. Citotoxicidade - Teses. 3. Agentes antineoplásicos - Teses. 4. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses. I. Dantas, Flávio José da Silva. II. Albarello, Norma. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

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

Assinatura

Data

Luana Brito do Nascimento de Araújo

Estudo dos potenciais citotóxico, antineoplásico e mutagênico do extrato etanólico de *Hovenia dulcis* Thunberg

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 28 de Junho de 2017

Orientadores:

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

Prof. Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adenilson Souza da Fonseca
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof.^a Dra. Helena Pereira da Silva Zamith
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, minha família e amigos de trabalho que me ajudaram nesta caminhada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus que nos concede valiosas oportunidades na vida mostrando os caminhos certos e propícios para nossa evolução, além de nunca nos desamparar nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais Carlos e Izélia, pelo amor incondicional, incentivo, dedicação e força que sempre me deram para que eu conseguisse chegar até o fim;

Ao meu marido Willian e a minha filha Luiza, por todo carinho e compreensão comigo nestes momentos de tanta correria;

Ao professor Dr. Adriano Caldeira de Araujo (*in memoriam*), pela grande oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Rádio e Fotobiologia;

Ao meu orientador, professor Dr. Flávio José da Silva Dantas pela amizade, incentivo, dedicação, ensinamento, por confiar no meu trabalho e por me abrir portas para o crescimento acadêmico;

À minha coorientadora, professora Dra. Norma Albarello que muito contribuiu com sua experiência, correções e sugestões durante o trabalho.

À professora Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araujo por ter feito a revisão deste trabalho.

À bióloga Dra. Claudia Ribeiro, pela amizade, incentivo, ensinamentos e discussões de resultados, e por ter me recebido de portas abertas, e me apresentado uma outra linha de pesquisa que foi de grande importante para complementação deste trabalho.

À minha amiga Bruna Barros Fróes, pela amizade, companheirismo, pelas conversas sempre com muitas risadas ou lágrimas, e a parceria diária na bancada, fazendo essa caminhada bem mais prazerosa e divertida.

À minha amiga Leticia Oliveira da Cruz, pela amizade, carinho e ensinamentos, fazendo nossos almoços mais longos e divertidos. Além de ajudar nos experimentos finais, sem os quais, eu não teria cumprido os objetivos propostos.

À Dra. Tatiana Castro, pelos ensinamentos, e que muito contribuiu me ajudando no preparo dos extratos para este trabalho.

À Dra Ellen Serri Motta, pelos ensinamentos durante a graduação e pela confiança depositada em mim, quando se disponibilizou a me indicar ao professor Adriano.

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

À técnica Msc. Márcia Bethânia de Oliveira Nunes, pelas sugestões ao longo deste trabalho.

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

À Ísis Salviano, por ter colaborado com a realização e interpretação dos resultados de citometria de fluxo.

Ao professor Dr. Antonio Carlos de Freitas, pelos ensinamentos e pela paciência e boa vontade que teve todas as vezes que o procurei para esclarecer dúvidas da parte estatística.

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

Aos professores do Programas de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PGBV), que contribuíram para minha formação, compartilhando conhecimentos, que serão muito bem aproveitados ao longo dessa nova fase da minha vida.

À CAPES pela concessão da bolsa.

RESUMO

ARAÚJO, Luana Brito do Nascimento de. ***Estudo dos potenciais citotóxico, antineoplásico e mutagênico do extrato etanólico de Hovenia dulcis Thunberg.*** 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Hovenia dulcis Thunberg, é popularmente conhecida como uva-do-japão, natural da China, Japão e Coréias. A espécie apresenta muitas atividades biológicas, destacando-se a atividade antineoplásica sobre diversos tipos celulares. Este trabalho visa avaliar a potencialidades citotóxica, antineoplásica e mutagênica do extrato etanólico de folhas de *Hovenia dulcis*. Folhas de *H. dulcis*, foram coletadas nas dependências do Clube dos médicos em Petrópolis (22°30'01.1"S 43°13'32.8"W), no mês de outubro de 2015. O extrato vegetal utilizado neste trabalho foi preparado a partir de folhas imersas em etanol 95%. Células da linhagem A549 foram tratadas com diferentes concentrações desse extrato. Após o período de tratamento de 24 horas, a atividade citotóxica foi analisada pelos métodos de WST-1, exclusão por azul de tripan e recuperação clonogênica. Verificou-se a dose que inibe 50% do crescimento celular, quando as células foram expostas ao extrato nas concentrações de 250 e 275 µg/mL. Essas concentrações foram testadas na linhagem normal Vero. Nesta linhagem, observou-se diminuição de 10% na viabilidade celular através dos testes de exclusão por azul de tripan e 9% no ensaio de WST-1. No ensaio de recuperação clonogênica, não se observou diminuição estatisticamente significativa, na capacidade mitogênica das células quando comparadas ao controle. Realizou-se experimentos para avaliar a taxa de produção de espécies reativas de oxigênio, através de citometria de fluxo utilizando o reagente DCFH-DA, onde o extrato se mostrou antioxidante para ambas linhagens testadas. Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (selvagem) e CD138 (mutante) como modelo biológico neste estudo, as quais foram avaliadas quanto à fração de sobrevivência, crescimento, mutagênese (ensaio de resistência a canavanina) e colônias *petites*. Os resultados apontaram que a concentração de 150 µg/mL e 100 µg/mL diminuíram a viabilidade celular em 50% nas cepas FF18733 e CD138. No ensaio de crescimento as cepas foram expostas por 48 horas ao extrato de *H. dulcis*. Não foi observado diminuição estatisticamente significativa na cepa FF1873, quando comparada ao controle. E a cepa CD138, apresentou diferença significativa na taxa de crescimento. Entretanto no ensaio de resistência a canavanina, o extrato de *H. dulcis* se mostrou mutagênico para ambas as cepas. Nos experimentos para avaliar a perda da função mitocondrial, observou-se que as duas cepas apresentaram aumento da taxa de colônias *petites*. Ao comparar os resultados observados em eucarioto superior e inferior, percebeu-se que ocorreu uma alteração nas vias oxidativas, que afetam o metabolismo mitocondrial nos dois casos. A organela é a mais afetada pelos produtos do extrato de *H. dulcis*, necessita-se de mais análises sobre a via de morte celular e composição química do extrato.

Palavra-chave: Rhamnaceae. Atividade biológica. A549. Vero. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

ARAÚJO, Luana Brito do Nascimento de. **Study of the cytotoxic, antineoplastic and mutagenic potentials of the ethanolic extract of *Hovenia dulcis* Thunberg.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Hovenia dulcis Thunberg, is popularly known as Japanese grape, occurring naturally in China, Japan and Korea. The species has many biological activities, highlighting the antineoplastic activity on several cell types. This work aims to evaluate the cytotoxic, antineoplastic and mutagenic potential of the ethanolic extract of *Hovenia dulcis* leaves. *H. dulcis* leaves were collected at the Clube dos Médicos in Petrópolis (22 ° 30'01.1 "S 43 ° 13'32.8" W), in October 2015. The plant extract used in this work was prepared from leaves immersed in 95% ethanol. Cells of lineage A549 were treated with different concentrations of this extract. After the 24-hour treatment period, cytotoxic activity was analyzed by the methods of WST-1, trypan blue exclusion and clonogenic recovery. The dose that inhibits 50% of cell growth was verified when the cells were exposed to the extract in concentrations of 250 and 275 µg / mL. These concentrations were tested in the normal Vero strain. In this strain, a 10% decrease in cell viability was observed through the trypan blue exclusion tests and 9% in the WST-1 assay. In the clonogenic recovery assay, there was no statistically significant decrease in the mitogenic capacity of the cells when compared to the control. Experiments were carried out to evaluate the production rate of reactive oxygen species, using flow cytometry using the DCFH-DA reagent, where the extract was shown to be an antioxidant for both tested strains. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (wild) and CD138 (mutant) were also used as a biological model in this study. Both were evaluated for survival fraction, growth, mutagenesis (canavanin resistance test) and petite colonies. And the results showed that the concentration of 150 µg / mL and 100 µg / mL decreased cell viability by 50% in strains FF18733 and CD138 respectively. In the growth test the strains were exposed for 48 hours to the extract of *H. dulcis*. There was no statistically significant decrease in the FF1873 strain, when compared to the control, whereas the CD138 strain, there was a significant difference in the growth rate. However, in the canavanin resistance test, *H. dulcis* extract was mutagenic for both strains. In the experiments to evaluate the loss of mitochondrial function, it was observed that in both strains tested they presented an increase in the rate of petite colonies. Comparing the results observed in the upper and lower eukaryotes, we observed that in both cases there was an alteration in the oxidative pathways that affect the mitochondrial metabolism, suggesting that this organelle is the most affected by the products of the extract of *H. dulcis*, being necessary a study analyzing the pathway cell death, and about the chemical composition of the extract.

Keyword: Rhamnaceae. Biological activity. A549. Vero. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários vegetais.....	18
Figura 2	-	Aspectos morfológicos de <i>Hovenia dulcis</i>	21
Figura 3	-	Esquema representando o preparo do extrato.....	29
Figura 4	-	Representação esquemática da metodologia empregada para cultura de células eucariótica <i>in vitro</i>	30
Figura 5	-	Esquema representativo da metodologia de exclusão do azul de tripan.....	32
Figura 6	-	Esquema da metodologia de WST-1.....	34
Figura 7	-	Esquema da metodologia de recuperação clonogênica.....	35
Figura 8	-	Esquema da metodologia de citometria de fluxo.....	36
Figura 9	-	Esquema da metodologia de obtenção das culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	38
Figura 10	-	Esquema da metodologia do ensaio de sobrevivência das culturas de <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 11	-	Esquema da metodologia do ensaio de crescimento das culturas de <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 12	-	Esquema da metodologia do ensaio de mutagênese das culturas de <i>S. cerevisiae</i>	41
Figura 13	-	Esquema da metodologia do ensaio de frequência de colônias <i>petites</i> nas culturas de <i>S. cerevisiae</i>	42
Figura 14	-	Fração de sobrevivência em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de <i>H.dulcis</i>	44

Figura 15	-	Fração de sobrevivência em culturas de células Vero tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	45
Figura 16	-	Fração de sobrevivência por WST-1 em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	46
Figura 17	-	Fração de sobrevivência por WST-1 em culturas de células Vero tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	48
Figura 18	-	Avaliação da capacidade mitogênica em cultura de células A549 tratadas com extrato de <i>H. dulcis</i>	49
Figura 19	-	Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células Vero tratadas com extrato de <i>H. dulcis</i>	50
Figura 20	-	Avaliação de espécies reativas de oxigênio em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	51
Figura 21	-	Avaliação de espécies reativas de oxigênio em culturas de células Vero tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	52
Figura 22	-	Fração de sobrevivência em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	53
Figura 23	-	Fração de sobrevivência em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	54
Figura 24	-	Fração de crescimento em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	56
Figura 25	-	Fração de crescimento em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	57

Figura 26	-	Frequência de mutagênese pela exposição ao extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733.....	58
Figura 27	-	Frequência de mutagênese pela exposição ao extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138.....	59
Figura 28	-	Frequência de colônias <i>petites</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	60
Figura 29	-	Frequência de colônias <i>petites</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fração de sobrevivência em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	44
Tabela 2 - Fração de sobrevivência por WST-1 em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	47
Tabela 3 - Fração de sobrevivência em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	53
Tabela 4 - Fração de sobrevivência em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i>	55

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

8oxoG	7,8-dihidro-8oxoguanina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
CAN ^R	Resistente a canavanina
CO ₂	Dióxido de carbono
DCFH-DA	Dicloro dihidrofluorescina-diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fapi	2,6-diamino-4-hidroxi-5-(metil) formamidopirimidina
FS	Fração de sobrevivência
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HRJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IC ₅₀	Concentração da amostra que inibe 50% do efeito observado
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
MtDNA	DNA mitocondrial
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Tampão fosfato salino
RPM	Rotação por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SFB	Soro fetal bovino
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	OBJETIVOS.....	27
1.1	Geral.....	27
1.2	Específicos.....	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
2.1	Material botânico.....	28
2.1.1	<u>Preparo do extrato vegetal.....</u>	28
2.2	Obtenção de culturas de células de carcinoma pulmonar (A549) e rim de macaco-verde (Vero).....	29
2.2.1	Culturas de células (linhagens A549 e Vero)	29
2.3	Avaliação da citotoxicidade em culturas de células de carcinoma pulmonar (A549) e rim de macaco-verde (Vero).....	31
2.3.1	<u>Tratamento das células com o extrato etanólico de folhas de <i>H. dulcis</i>.....</u>	31
2.3.2	<u>Ensaio de viabilidade de exclusão do azul de tripan.....</u>	31
2.3.3	<u>Ensaio de viabilidade WST-1.....</u>	33
2.3.4	<u>Recuperação clonogênica.....</u>	34
2.3.5	<u>Deteccção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA.....</u>	35
2.4	Cepas em estudo: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	37
2.4.1	<u>Obtenção da cultura de <i>S. cerevisiae</i>.....</u>	37
2.5	Efeito do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> na sobrevivência das culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	38
2.6	Efeito do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> no crescimento das culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD13.....	39
2.7	Avaliação da potencialidade mutagênica do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	40
2.8	Teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio para análise de colônias pequenas nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	41
2.9	Análise estatística	42
3	RESULTADOS.....	43

3.1	Avaliação de citotoxicidade	43
3.1.1	<u>Exclusão do azul de tripan em culturas de células A549</u>	43
3.1.2	<u>Exclusão do azul de tripan em culturas células Vero</u>	44
3.1.3.	<u>Viabilidade celular pelo ensaio com WST-1 em culturas de células A549</u>	45
3.1.4	<u>Viabilidade celular pelo ensaio com WST-1 em culturas de células Vero</u>	47
3.1.5.	<u>Recuperação clonogênica em culturas de células A549</u>	48
3.1.6	<u>Recuperação clonogênica em culturas de células Vero</u>	49
3.1.7	<u>Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo em culturas de células A549</u>	50
3.1.8	<u>Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo em culturas de células Vero</u>	51
3.2	Avaliação de efeitos do extrato etanólico de <i>Hovenia dulcis</i> em cultura de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138	52
3.2.1	<u>Avaliação da sobrevivência em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com extrato <i>H. dulcis</i></u>	52
3.2.2	<u>Avaliação da sobrevivência em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com extrato <i>H. dulcis</i></u>	54
3.2.3	<u>Fração de crescimento em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com extrato de <i>H. dulcis</i></u>	55
3.2.4	<u>Avaliação da fração de crescimento em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com extrato de <i>H. dulcis</i></u>	56
3.2.5	<u>Avaliação da indução de mutagênese em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 pelo extrato de <i>H. dulcis</i></u>	57
3.2.6	<u>Avaliação da indução de mutagênese em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 pelo extrato de <i>H. dulcis</i></u>	58
3.2.7	<u>Avaliação da frequência de colônias pequenas em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i></u>	59
3.2.8	<u>Avaliação da frequência de colônias pequenas em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com extrato etanólico de <i>H. dulcis</i></u>	60
4	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

APÊNDICE – Preparo de meios e soluções das culturas de células de carcinoma pulmonar A549 e rim de macaco-verde (Vero).....	75
--	----

INTRODUÇÃO

REVISÃO DA LITERATURA

Plantas medicinais

Ao longo do processo evolutivo, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para sua alimentação e para a cura dos seus males e doenças. O resultado desse processo foi o domínio do conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais (FERREIRA; PINTO, 2010).

Registros históricos datados desde 4.000 a.C. comprovam esta prática, pelos povos egípcios e chineses, entre outros (DUARTE, 2006). Arqueólogos encontraram nas ruínas de Nippur, uma tábua de argila escrita com caracteres cuneiformes, mencionando, entre outras plantas, *Ficus carica* L. e *Thymus vulgaris* L., ambas usadas até hoje como laxante e expectorante, respectivamente (ALONSO, 1998).

Na década de 40, após a segunda guerra mundial, houve uma ascensão industrial (HOBSBAWM, 1995). A indústria farmacêutica acompanhou esse movimento com crescente interesse no lucro. Dessa forma, a medicina alopática ganhou lugar no mercado farmacêutico, devido aos avanços obtidos pela síntese química de fármacos (OLIVEIRA, 1985). Em consequência desse processo de industrialização, o conhecimento tradicional do uso de plantas medicinais passou a segundo plano (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002). Devido à falta de estudos científicos, o uso de plantas medicinais tornou-se sinônimo de atraso tecnológico e muitas vezes fazendo com que médicos e pesquisadores se afastassem dessa alternativa terapêutica (LORENZI; MATOS, 2002).

A partir da década de 60, no século XX, houve um aumento do interesse pelas terapias alternativas e complementares incluindo o uso de plantas (DI STASI, 1996) devido aos problemas atribuídos aos medicamentos sintéticos sobre a saúde humana e ao meio ambiente (BANDONI; CZEPAK, 2008). Com isso, farmacêuticos, botânicos, microbiologistas, nutricionistas e químicos de produtos naturais passaram a investir

em estudos na busca de substâncias fitoquímicas para o tratamento de doenças (MAHOMOODALLY; GURIB-FAKIM; SUBRATTY, 2005).

As atividades biológicas das plantas medicinais podem ser atribuídas a um conjunto de substâncias, tanto do metabolismo primário, quanto do metabolismo secundário, atuando ou não de forma sinérgica, como ocorre com os fitocomplexos (CAVALLAZZI; COSTA, 2003); ou através da variedade de substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal das plantas, que vêm despertando interesse como novas possibilidades de fármacos para o tratamento de diversas doenças (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Metabólitos secundários

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas que ocorre nas células vivas, catalisadas por enzimas, tendo como função suprir o organismo de energia, renovando suas moléculas e assim garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007). As substâncias que são essenciais à sobrevivência dos vegetais integram o metabolismo primário, como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos. Já aquelas sintetizadas por outras vias, não essenciais, fazem parte do metabolismo secundário ou especial (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2003).

Os produtos do metabolismo secundário foram, por algum tempo, considerados produtos de excreção vegetal e que poderiam apresentar algumas atividades biológicas interessantes. Muitos produtos deste metabolismo têm um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, contribuindo para uma boa interação com os diferentes ecossistemas. Os metabólitos secundários atuam na sobrevivência das espécies vegetais, possibilitando a defesa contra herbívoros e patógenos, a proteção contra radiação ultravioleta (UV), a atração de polinizadores ou dispersores de sementes, assim como alelopatia (JAKIEMIU, 2008)

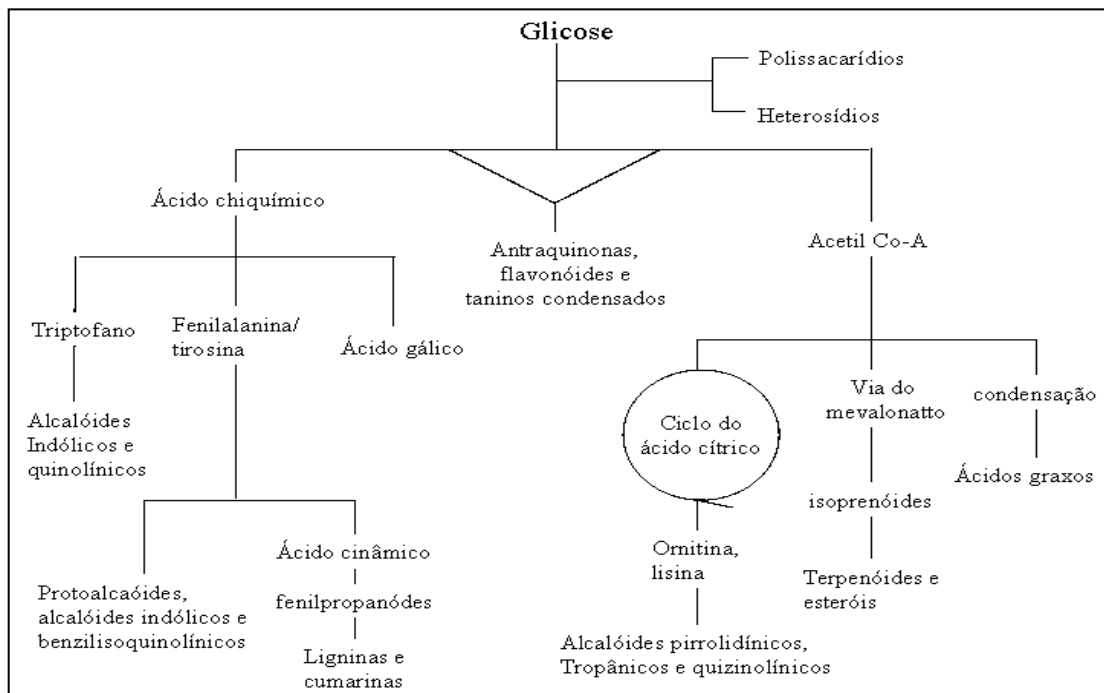
Existem fatores que podem influenciar o conteúdo dos metabólitos secundários. Dentre estes, a época em que uma planta é coletada e o estágio de desenvolvimento da planta, são fatores importantes, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não são constantes durante o ano. Mas também há

outros fatores importantes tais como as condições de coleta, a temperatura, a radiação ultravioleta, estabilização e estocagem que podem ter grande influência na qualidade, e, conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A exploração fitoquímica dos recursos vegetais pode levar à identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como fármacos ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos químicos bem distintos: os compostos fenólicos, que são derivados do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico; os alcaloides, que derivam de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), que por sua vez também são derivados do ácido chiquímico ou de aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina); e os terpenos, que são sintetizados a partir do ácido mevalônico no citoplasma e do piruvato 3- fosfoglicerato no cloroplasto (SIMÕES et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1- Ciclo biossintético dos metabólitos secundários vegetais



Fonte: SIMÕES et al., 2010.

Os compostos fenólicos são bastante presentes no nosso cotidiano, sendo responsáveis pelo odor, sabor e coloração de muitos vegetais. Este grupo é importante por atuar também na proteção das plantas contra os raios UV, insetos,

fungos, vírus e bactérias. Além disso, algumas espécies produzem compostos fenólicos com ação alelopática, representada pela inibição do crescimento de outras plantas competidoras (FUMAGALI et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio em seu anel. Este grupo é responsável por diversas atividades biológicas no vegetal, como por exemplo, sua proteção, toxicidade e paladar amargo. Várias são as hipóteses para as funções deste grupo de metabólitos nas plantas, desde produtos de excreção, até reserva de nitrogênio (SANTOS et al., 2010).

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários. A sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida (JÚNIOR, 2003). Atuam como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de espécies polinizadoras, e na proteção contra desidratação e elevação de temperatura (JÚNIOR, 2003; SANTOS et al., 2010). As saponinas são esteroides e triterpenos glicosídeos, assim chamadas em decorrência de suas propriedades detergentes e emulsificantes. A toxicidade da saponina deve-se à sua capacidade de formar complexos com os esteroides, podendo interferir na absorção de tais compostos pelo sistema digestório, ou desorganizando membranas celulares após entrar na corrente sanguínea (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Família Rhamnaceae A. L. Jussieu

A família Rhamnaceae compreende aproximadamente 58 gêneros e 900 espécies de distribuição cosmopolita, incluindo desde árvores e arbustos até trepadeiras lenhosas e ervas, embora essas últimas sejam de ocorrência mais rara (RICHARDSON et al., 2000). Apesar da sua grande diversidade de hábitos, as espécies desta família são facilmente reconhecíveis por compartilharem alguns caracteres florais, como as sépalas com nervura mediana proeminente na face adaxial, as pétalas convolutas, cuculadas ou conchiformes e os estames opostos às pétalas (LIMA, 2001).

No Brasil ocorrem naturalmente apenas 13 gêneros na flora nativa, que são: *Alvimiantha*, *Ampelozizyphus*, *Colletia*, *Colubrina*, *Condalia*, *Crumenaria*, *Discaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rhamnus*, *Scutia*, *Ziziphus* e 2 gêneros

introduzidos, *Hovenia* e *Sageretia* (SOUZA; LORENZI, 2005). É uma família pouco representada no Brasil, onde há cerca de 50 espécies, que se desenvolvem em regiões de climas temperados e tropicais (BARROSO, 1984).

***Hovenia dulcis* Thunberg**

Hovenia dulcis é popularmente conhecida como uva-do-japão (PR), banana-do-japão (SC), caju-do-japão (RJ), mata-fome (SP), pau-doce (MG) e chico-magro (SP), ocorrendo naturalmente, na China, Japão e Coréias (RIGATTO et al., 2001).

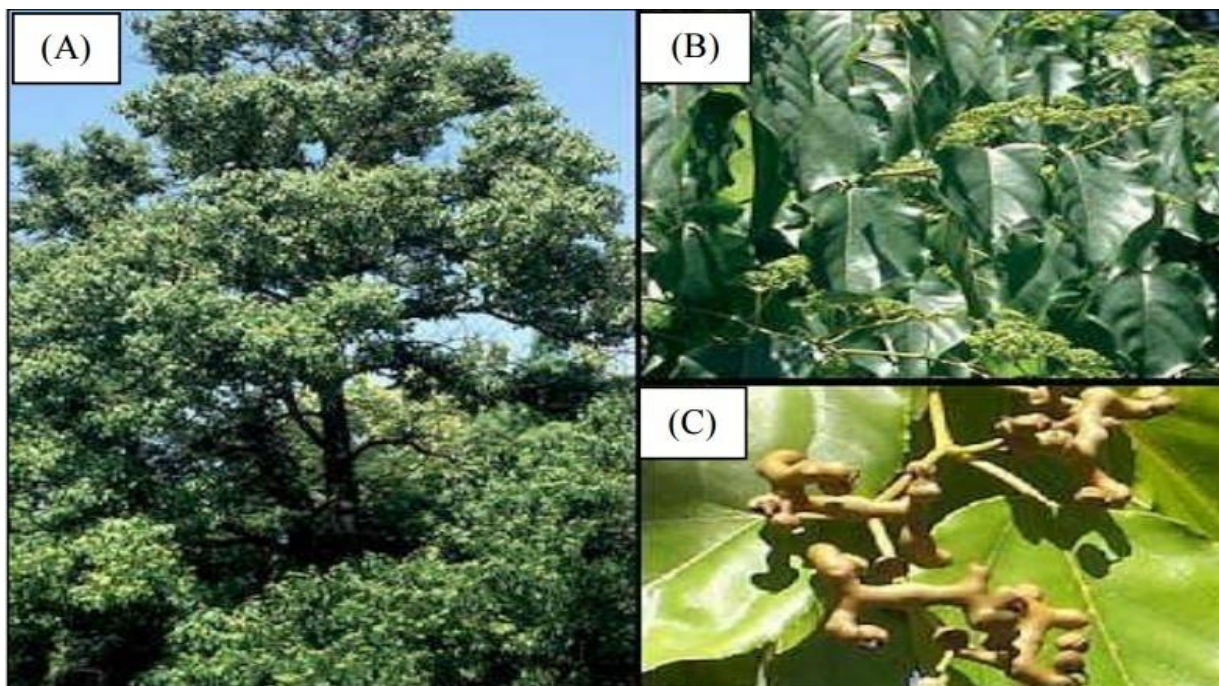
A espécie foi introduzida em 1908, por ocasião da Exposição Nacional do Rio de Janeiro de Plantas Ornamentais e Exóticas (COSTA, 1934; STILLNER et al., 1983).

H. dulcis é uma planta heliófila, caducifólia, alcançando de 10 a 15 m de altura, com copa globosa e ampla. Seu diâmetro médio varia entre 20 e 40 cm podendo chegar a 50 cm. Seu tronco geralmente é reto e cilíndrico, apresentando fuste com até 8 metros de comprimento (SELLE, 2009), floresce no Brasil de agosto a fevereiro e apresenta frutos maduros de março a outubro. A casca possui espessura total de até 15 mm, sendo externamente lisa e levemente fissurada, pardo-escura a cinza-escura e a casca interna esbranquiçada.

O fruto de *H. dulcis* consiste em pequena cápsula globosa seca com 2 a 4 sementes, preso a um pedúnculo carnoso de cor de canela, com sabor doce e agradável, rico em sacarose, tendo a polpa aroma idêntico ao da pêra, podendo ser consumidos *in natura*, como uva passas, ou ainda serem usados para fazer vinagres ou geleias (HYUN et al., 2010). Além disso, a espécie é utilizada pela fauna silvestre, e para complementar a alimentação de suínos e aves (BAMPI et al., 2010; ROSA et al., 2008; LORENZI et al., 2003). O fruto também possui propriedade anti-ressaca, combatendo os efeitos da intoxicação alcoólica aguda, bem como os sintomas da abstinência do álcool, devido a uma substância chamada dihidromiricetina (XIANG; ZHU; LING, 2012).

As sementes são alaranjadas ou avermelhadas quando recém-colhidas, passando para marrom e pretas com o tempo (KIM; HAN, 2008; KAMALA-KANNANET et al., 2011) (Figura 2).

Figura 2 - Aspectos morfológicos de *Hovenia dulcis*



Legenda: Árvore de *Hovenia dulcis* (A) folhas com inflorescência (B) e pseudofrutos(C)
Fonte: Souza, 2014.

A espécie vem sendo cultivada na Argentina, Paraguai e no sul do Brasil, principalmente nas regiões de climas clima temperado úmido com verão quente (Cfa), clima temperado úmido com verão temperado (Cfb) e clima temperado úmido com Inverno eco e verão quente (Cwa), segundo a classificação de Köppen, de forma isolada ou em pequenos povoadamentos.

No Brasil, na bacia do Rio Uruguai, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no sudoeste do Paraná, pequenos plantios de uva do-japão são comuns em propriedades agrícolas, sendo estabelecidos por mudas ou, eventualmente, por semeadura direta no terreno, sua regeneração natural é intensa, devido à dispersão zoocórica (PIMENTEL et al., 2008).

Aspectos químicos e farmacológicos de *H. dulcis*

Estudos fitoquímicos com exemplares da família Rhamnaceae têm demonstrado que a maioria das espécies apresentam na sua composição substâncias

relacionadas à quinina, além de flavonóides, taninos, esteroides e triterpenos (MOREIRA, 2012). No gênero *Hovenia* destaca-se a espécie *H. dulcis*, utilizada para fins nutricionais e medicinais no continente asiático.

Estudos comparativos realizados com *H. dulcis* desenvolvida em condições naturais e com materiais produzidos *in vitro*, revelaram um perfil cromatográfico bem diversificado nas plantas *in vivo*, indicando ser este um material bastante promissor para estudos fitoquímicos (RIBEIRO et al., 2010).

Nas plantas em condições naturais, já foram identificados diferentes tipos de saponinas. Foi verificado efeito antineoplásico significativo dessas substâncias sobre diversos tipos de culturas celulares como câncer de cólon humano (HT-29), carcinoma colo retal humano (HCT-15), adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), hepatocarcinoma humano (HepG2) e hepatocarcinoma humano (Hep3B), através da interrupção do ciclo celular ou por ativarem a apoptose, com valores de IC₅₀ (concentração da amostra que inibe 50% do efeito observado) de até 0,2 mM (HYUN, 2010; MAN et al., 2010). Um protocolo de produção *in vitro* para a produção de saponinas foi estabelecido para a espécie (RIBEIRO et al., 2014).

Estudos fitoquímicos usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), determinaram a presença de flavonoides como: ampelopsina, taxifolina, mirecetina e quercetina, que foram relatados como principais constituintes de *H. Dulcis* (PARK et al. 2016a).

A ampelopsina possui atividade hepatoprotetora, inibindo o relaxamento muscular induzido pelo álcool neutralizando a intoxicação e dependência de álcool (HASE et al., 1997; YOO; MUN; KIM, 2006; SHEN et al., 2012). Taxifolina apresenta atividade antioxidante e potencial efeito quimio preventivo, pela regulação de genes via substâncias antioxidantes (LEE et al., 2007). A miricetina, exibe efeitos antialérgicos, antioxidante e hipoglicemiante em ratos diabéticos (DUTHIE et al., 1997; ONG; KHOO, 2006; MEDEIROS et al., 2008) e a quercetina, responsável por aumentar a eficiência da 5-fluoruracila no tratamento de câncer, além de reduzir o acúmulo de gordura induzida por dieta rica em gorduras em ratos (XAVIER et al., 2011; JUNG et al., 2013).

Diferentes órgãos de *H. dulcis* têm apresentado importantes atividades medicinais. O suco e o vinagre fermentado de pedúnculos de *H. dulcis* foram testados em ratos com lesão hepática induzidas por etanol, levando a uma diminuição do

estresse oxidativo causado pelo etanol, revertendo a hepatomegalia (XIANG; ZHU; LING, 2012). O extrato etanólico dos frutos exerceu função anti-inflamatória através da inibição da fosforilação de I κ B α e inibição da translocação nuclear NF- κ B, em macrófagos RAW 264.7, induzidos por Lipopolissacarídeos (PARK et al., 2016b).

Os extratos de ramos inibiram a secreção de β -hexosaminidas, liberação de histamina, produção de prostaglandina E2 e citocinas inflamatórias em culturas de células de leucemia basofílica (RBL-2H3), estimuladas com antígeno DNP-BSA. Além disso, atenuaram a anafilaxia cutânea em ratos indicando efeito na prevenção e tratamento da alergia (LIM et al., 2015)

Extrato de folhas *H. dulcis* foram testados em ratos com diabetes induzida pelo aloxano e os resultados mostraram que o tratamento reduziu, significativamente, os níveis de glicose, aumentando a formação de glicogênio hepático, na comparação ao grupo controle diabético (JI et al., 2002). A exposição de *Giardia lamblia* à fração diclorometano do extrato metanólico levou a degenerações na superfície, alterações na forma do parasita e alterações na localização de núcleos. Além disso, a adesão da *G. lamblia* foi também alterada. Os experimentos também mostraram que a fração não apresenta efeitos citotóxicos em células de mamífero. Em resumo, a fração diclorometano tem fortes efeitos anti-giardial e pode se tornar uma substância nova e importante para o tratamento da giardiase (GADELHA et al., 2005)

Modelos biológicos para estudos de extratos vegetais

Culturas de células de carcinoma pulmonar (A549)

As culturas de células A549 foi obtida de um carcinoma de origem humana por DJ GIARD (1972), através da remoção e cultura de tecido pulmonar canceroso no tumor explantado de um homem caucasiano de 58 anos (GIARD et al., 1973). As culturas de células A549 é amplamente utilizada como um modelo *in vitro* de células epiteliais pulmonares de tipo II para o metabolismo de fármacos e como hospedeiro de transfecção. Esta linhagem já tem seu protocolo amplamente estabelecido em

laboratórios de cultura celular, sendo o seu manuseio de baixo custo, rápido e simples. É uma das linhagens de câncer de pulmão mais utilizadas como modelo biológico.

Culturas de células de rim de macaco-verde (Vero)

As culturas de células Vero foram estabelecidas por Nakamura e colaboradores (1962). São culturas contínuas de fibroblastos de rins do macaco-verde adultos da África (*Cercopithecus aethiops*) (BRETAS, 2011).

As culturas de células Vero são usadas como modelo de pesquisa pela Organização Mundial da Saúde para a produção imunobiológicos de uso humano (YOKOMIZO, 2001), avaliação da citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, teste de eficácia, teste de meios e micoplasma, além de ser usada como controle para ensaios com células neoplásicas (UNCHERN, 1999; TAKATA et al., 1994; ALVES et al., 2008).

Saccharomyces cerevisiae

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarioto anaeróbio facultativo, unicelular, com metabolismo semelhante ao de eucariotos superiores. Suas características, associadas às diferentes técnicas disponíveis, tornou-a uma importante ferramenta para estudos sobre reparo do DNA, mecanismos que respondem ao estresse oxidativo, mutagênese, funções mitocondriais, recombinação genética, deslocamento intracelular de proteínas, controle do ciclo celular, degradação de proteínas, processos de envelhecimento, aparecimento de doenças e indução de apoptose (BROZMANOVÁ et al., 2001; GERSON; GERSHON, 2000; JAKOBKIEWICZ-BANECKA et al., 2005; MAGER; WINDERICKX, 2005). *S. cerevisiae* possui seu genoma todo sequenciado permitindo a comparação da sequência de genes, com os de organismos eucariotos superiores, em busca de homólogos funcionais (função conservada).

A detecção de atividades tóxicas e/ou mutagênicas é uma medida prioritária para avaliar o risco no uso de diversos agentes. Estudos sobre mutagênese em *S. cerevisiae* têm sido empregados para avaliar a potencialidade mutagênica de diferentes substâncias, incluindo aquelas ocorrentes em plantas medicinais (SILVA et al., 2016).

Estudos de mutagênese em *S. cerevisiae* podem ser realizados através de sistema de resistência à canavanina. O gene *CAN1*, localizado no braço esquerdo do cromossomo V de *S. cerevisiae*, codifica a proteína arginina permease (*CAN1p*) (OPEKAROVÁ et al., 1998). A permeabilidade celular controlada pelo gene *CAN1*, é mediada por uma proteína associada à membrana celular. Durante o crescimento em meio mínimo, a permease da arginina é o único sistema de transporte desse aminoácido para dentro da célula (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979). O transporte da arginina através da membrana plasmática em levedura é mediado pela proteína permease que é codificado pelo gene *GAP 1* e pelo gene constitutivo altamente específico *CAN1*. O gene *CAN1* de *S. cerevisiae* possui grande afinidade e especificidade a arginina e, em menor grau, a lisina, (MATIJÈKOVÁ; SYCHROVÁ, 1997).

Linhagens de levedura, com o gene *CAN1* funcional, são sensíveis a um aminoácido análogo da arginina, que foi isolado da leguminosa *Canavalia ensiformis*, na forma de L-canavanina. A L-canavanina é um potente inibidor do crescimento de muitos microrganismos, incluindo *S. cerevisiae* (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979).

A célula produzindo a permease da arginina incorpora o aminoácido arginina e, por consequência, a L-canavanina, caso esteja presente no meio, o que provocará inibição do crescimento celular, enquanto o gene *CAN1* estiver sendo expresso. Porém, se o gene *CAN1* estiver mutado, deixa de produzir a arginina permease, não permitindo a entrada da L-canavanina, fazendo com que ocorra crescimento celular após alguns dias de incubação (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979).

Justificativa

A variedade de atividades biológicas apresentadas pela espécie *H. dulcis* e seu uso indiscriminado na medicina popular, indica a necessidade de estudos mais aprofundados dos efeitos dos extratos desta planta, tanto para a segurança de populações que fazem uso delas, quanto para a pesquisa de novas substâncias que possuam efeitos benéficos para a população.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar as potencialidades citotóxica, antineoplásica e mutagênica do extrato etanólico das folhas de *H. dulcis* Thunberg.

1.2 Específicos

- Analisar a potencialidade citotóxica e antineoplásica através das metodologias de exclusão por azul de Tripán, WST-1 e recuperação clonogênica em células de carcinoma pulmonar (A549) e na linhagem rim de macaco-verde (Vero)
- Detectar a presença de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo extrato na linhagem celular de carcinoma pulmonar (A549) e na linhagem rim de macaco-verde (Vero) através da metodologia de citometria de fluxo;
- Determinar a potencialidade citotóxica do extrato, através de curva de sobrevivência, em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138
- Determinar a influência do extrato no crescimento de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138;
- Determinar a potencialidade mutagênica em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, através do ensaio de mutagênese (sistema de resistência à canavanina);
- Avaliar a perda de função mitocondrial, em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, através do aumento na frequência de colônias *petites*, por coloração com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC);

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material botânico

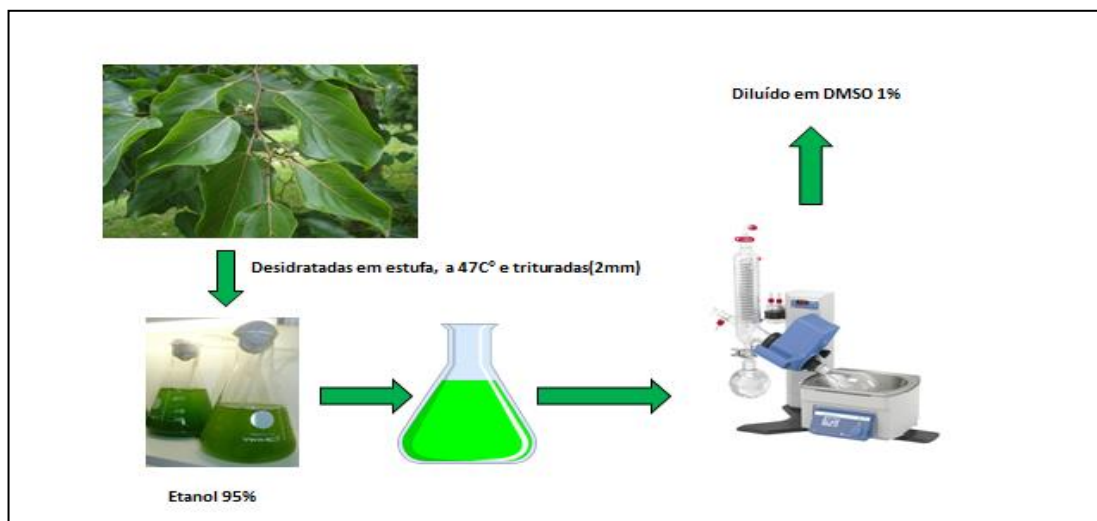
Folhas de *H. dulcis* Thunberg, foram coletadas nas dependências do Clube dos médicos em Petrópolis, RJ (22°30'01.1"S 43°13'32.8"W), no mês de outubro de 2015, priorizando-se as folhas íntegras. As folhas coletadas foram umidificadas e transportadas para o laboratório em sacos plásticos.

Um exemplar foi depositado no herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ 12818).

2.1.1 Preparo do extrato vegetal

Folhas frescas de *H. dulcis* (peso fresco = 1826 g) foram lavadas com água e secas em estufa (45° C) por 24 horas. Após secagem em estufa, resultou em peso seco de 532 g. O material seco foi macerado e imerso em álcool etílico 95% por 2 dias, e filtrado em papel Whatman (nº 1). O filtrado foi separado e armazenado, e mais álcool etílico a 95% foi adicionado ao material vegetal. Este processo foi realizado por 2 semanas. Posteriormente, todo o filtrado foi submetido à evaporação rotatória a 40°C, resultando em um resíduo de 26 g de extrato etanólico bruto (figura 3).

Figura 3 - Esquema representando o preparo do extrato



Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.2 Obtenção de culturas de células de carcinoma pulmonar (A549) e rim de macaco-verde (Vero)

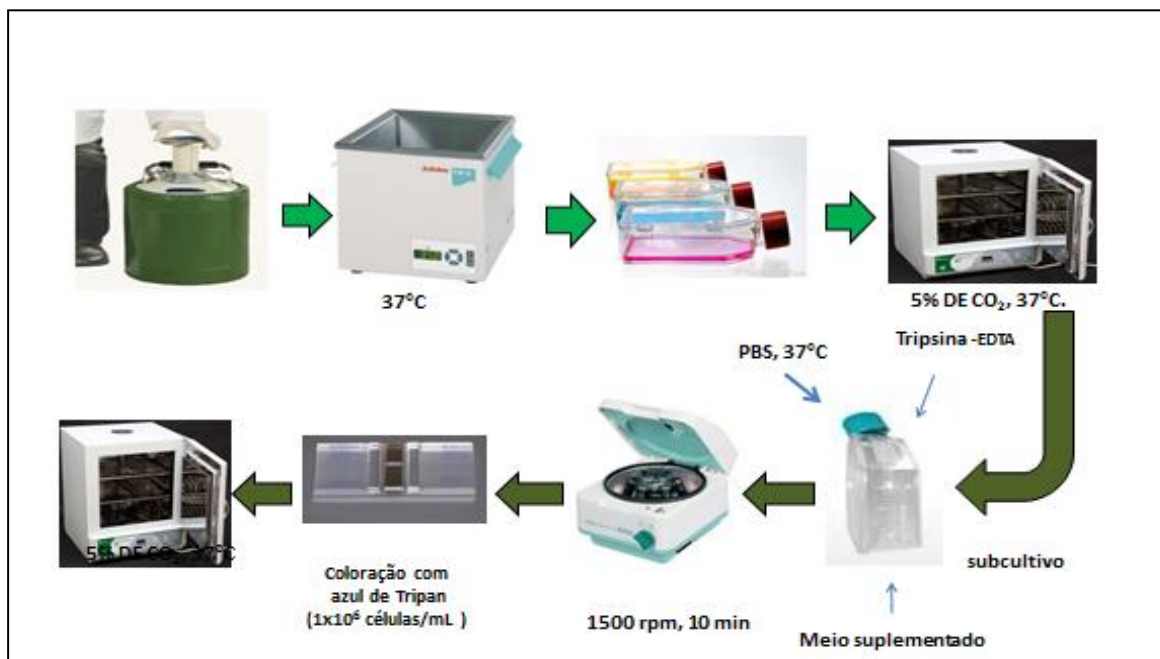
As culturas de células selecionadas para o estudo (A549 - carcinoma de pulmão humano e a Vero - rim de macaco-verde) foram gentilmente cedidas pela Doutora Alessandra Saliba do Departamento de Patologia e Laboratórios da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ (FCM-UERJ). Para a utilização, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em água estéril a 37°C. Logo em seguida, o conteúdo do tubo criogênico foi colocado na garrafa de cultura de 25cm² acrescido de 5mL de meio F12 no caso das culturas celulares A549 e 5mL de meio MEM nas culturas celulares Vero. Ambos em presença de anfotericina (0,0025 mg/mL), gentamicina (5 mg/mL) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), incubadas a 37°C a 5% de CO₂, por 24 horas, no dia seguinte foi feita a troca do meio de cultura.

2.2.1 Culturas de células (linhagens A549 e Vero)

As culturas celulares A549 foram cultivadas em meio F12 e as culturas celulares Vero em meio MEM, ambas em presença de fungizona e gentamicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para as subculturas, as garrafas foram

lavadas duas vezes com a solução salina de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 a 7,4 a 37°C. Logo em seguida, foi adicionada solução de tripsina-EDTA (0,1%:0,01%) e as culturas foram incubadas a 37°C até que as células soltassem da superfície da garrafa. A seguir, foi acrescentado meio F12 ou MEM suplementado, para inativação da tripsina. Após homogeneização, as células foram transferidas para o tubo de centrifuga de 15 mL centrifugadas a 37°C, 1500 rpm por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante o precipitado foi suspenso em 1 mL de meio F12 ou MEM. Na sequência, a suspensão foi contada em câmara de Neubauer e 1×10^6 células foram distribuídas em novas garrafas de cultura, as quais eram mantidas em atmosfera com 5% de CO₂, a 37°C (American Type Culture Collection-ATCC) (figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia empregada para cultura de células eucarióticas in vitro



Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.3 Avaliação da citotoxicidade em culturas de células de carcinoma pulmonar (A549) e rim de macaco-verde (Vero)

2.3.1 Tratamento das células com o extrato etanólico de folhas de *H. dulcis*

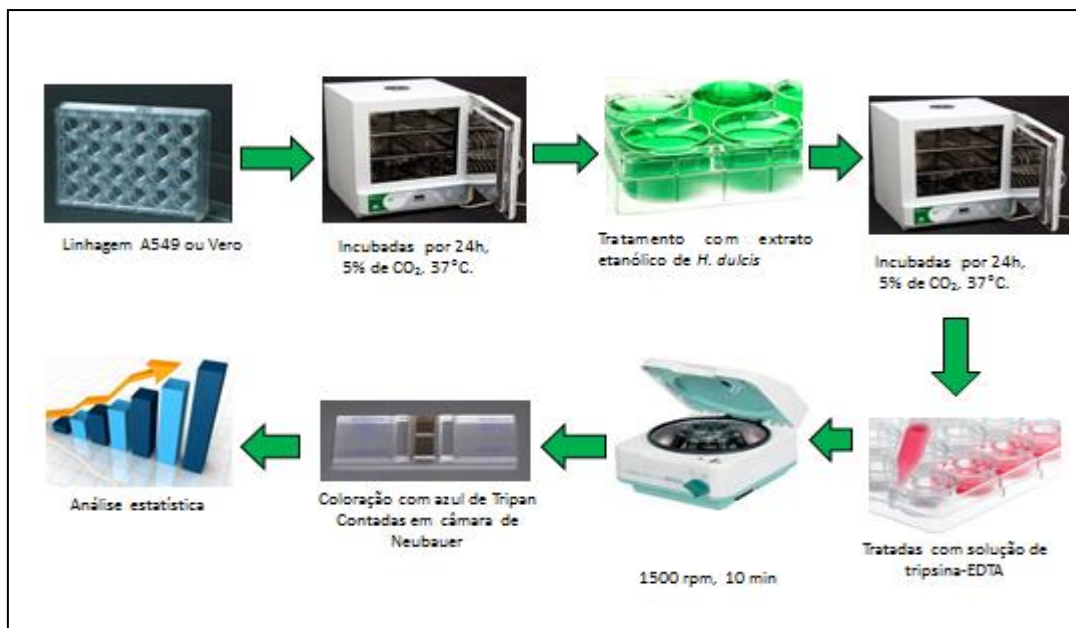
A partir de uma garrafa de cultura de 25 cm², as células foram submetidas ao tratamento com tripsina – EDTA (item 2.2.1) e uma alíquota (10µL) foi retirada e incubada, com 10 µL de azul de tripan (0,4%), para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Posteriormente, as células foram depositadas em placas de 24 poços, onde a concentração inicial era de 1,0x10⁵ células por poço, acrescidos de 500 µL de meio F12. As culturas foram, então, incubadas a 37°C, por 24 horas, para adesão celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em cada poço, foi aplicado o extrato em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 200; 225; 275; 300; 325µg/mL), com exceção do controle, ao qual era adicionado apenas meio de cultura. A Doxorubicina a 10nM foi utilizada como controle positivo, por ser um fármaco amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos (KIM, 2010). As placas foram, então, incubadas a 37°C por 24 horas, em atmosfera com 5% de CO₂ (MORAES et al., 2011). A fim de comprovar os efeitos observados foram provenientes, unicamente, dos componentes do extrato vegetal, as células foram também tratadas com dimetilsulfóxido (DMSO), a 1% em água (DMSO 1%). Após encontrar a IC₅₀ do extrato nas culturas celulares neoplásicas A549, essa concentração foi testada nas culturas celulares Vero, obedecendo o mesmo protocolo, com exceção do meio de cultivo, para a Vero foi utilizado o meio MEM.

2.3.2 Ensaio de viabilidade de exclusão do azul de tripan

Para analisar a viabilidade celular, após o tratamento com as diferentes concentrações de extrato de *H. dulcis*, foi utilizada a metodologia de exclusão do azul de tripan, pelo qual as células mortas são permeáveis ao corante devido a perda de seletividade da membrana celular e as células íntegras, devido à permeabilidade

seletiva das mesmas não adquirem nenhuma coloração. Após o tratamento, descrito no item 2.3.1, o sobrenadante foi recolhido e as culturas de células (A549 ou Vero) foram lavadas com PBS a 37° C, sendo, em seguida, acrescentada solução de Tripsina-EDTA a 37°C, após alguns minutos, adicionou-se meio com SFB (10%), realizando-se, então, fluxo-refluxo para que as células soltassem do fundo da placa. As células, já em suspensão, foram recolhidas e adicionadas ao sobrenadante separado anteriormente, e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 37°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em meio F12 suplementado, conforme descrito (item 2.2) anteriormente, sendo retirada uma alíquota (10 µL) de cada tubo e incubada com 10 µl de azul de tripan, por 1 minuto. A seguir, retirou-se uma alíquota (10 µL), que foi aplicada na câmara de Neubauer, para contagem de células viáveis e inviáveis em microscópio óptico invertido (FIDALGO et al., 2009). Foram realizados três experimentos em quintuplicata (figura 5).

Figura 5 - Esquema da metodologia de exclusão do azul de tripan



Fonte: Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.3.3 Ensaio de viabilidade WST-1

O WST-1 é um ensaio colorimétrico baseado na capacidade das células converterem o sal *Tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulphonate)* em corante *Formazan*. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial Succinato-tetrazolium redutase e somente ocorre em células viáveis. Com isso, através de variações na coloração do meio contendo WST-1, é possível avaliar a proporção de células viáveis comparando as diferentes condições de tratamento.

A partir de uma garrafa de cultura de 25 cm², as células foram submetidas ao tratamento com tripsina (item 2.2.1) e uma alíquota (10µL) foi retirada e incubada, com 10 µL de azul de tripan (0,4%), para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram depositadas em placas de 96 poços, onde a concentração inicial foi de 1x10⁵ células por poço, acrescidos de 150 µL de meio. A cultura foi então incubada a 37°C, por 48 horas, para adesão celular. Após esse período, foi feito o tratamento com as diferentes concentrações do extrato de *H. dulcis* (item 2.3.1), e as células foram novamente incubadas em estufa por 24 horas. Posteriormente, foi acrescentada a solução de WST-1 e as placas foram levadas a estufa por 30 minutos. Logo após, as placas foram lidas com o auxílio de um espectrofotômetro (leitor de Elisa) (Polaris leitora de microplacas), utilizando o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm (figura 6). Foram realizados três experimentos em quintuplicata. Para o ensaio foi utilizado o protocolo do fabricante com modificações no volume aplicado do reagente WST-1, padronizado para 2µL ao invés de 10µL, conforme indicado pelo fabricante (Cell Proliferation Reagent WST-1, ROCHE Applied Science).

Figura 6 - Esquema da Metodologia de WST-1





Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

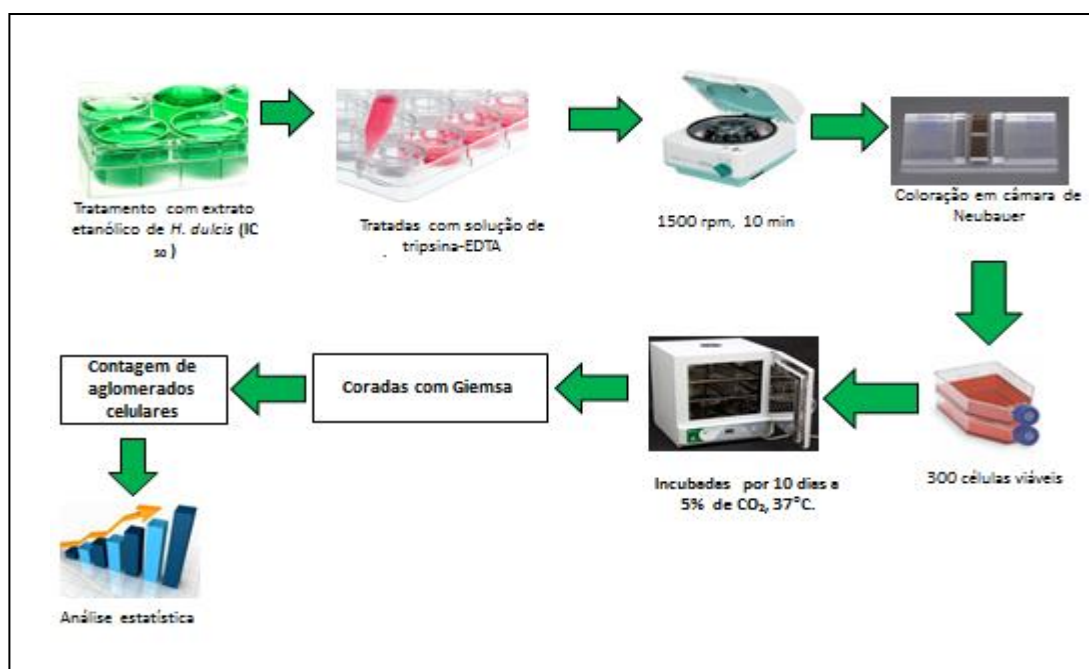
2.3.4 Recuperação clonogênica

No ensaio de recuperação clonogênica foram utilizadas as concentrações de IC₅₀ experimental encontradas nos ensaios de viabilidade por exclusão de azul de tripan (275µg/ml) e WST-1 (250 µg/ml) na linhagem A549.

Após o tratamento com o extrato etanólico de folhas de *H. dulcis* e contagem de células viáveis e inviáveis (item 2.3.1) foram retiradas 300 células viáveis e colocadas em garrafas de cultura de 25cm², na estufa, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, por dez dias, com meio de cultura suplementado. No quinto dia o meio de cultura foi trocado e acrescentou-se mais 5mL de meio F12 ou MEM. Logo após esse período, o meio foi vertido e as células foram lavadas, duas vezes, com PBS, a 37°C. Em seguida, foram adicionados em cada garrafa, 5mL de solução de fixação (metanol, ácido acético e água destilada na proporção de 1:1:8) por 30 minutos. Posteriormente, a solução de fixação foi vertida, sendo adicionados 5mL de solução corante [10mL Giemsa e 200mL tampão fosfato (50,8mL de KH₂PO₄ (solução A) + 49,2mL de Na₂HPO₄ (solução B)], pH 7,4 nas garrafas por 30 minutos. Subsequentemente, a solução corante foi descartada e as garrafas foram postas sobre a bancada, à

temperatura ambiente por 24 horas, para a total evaporação da solução corante, sendo, em seguida, realizada a contagem dos aglomerados celulares com o auxílio de uma lupa (SANTOS, 2011) (figura 7). Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Neste ensaio, avaliou-se o pela perda da capacidade mitogênica das células 10 dias após o tratamento.

Figura 7 - Esquema da metodologia de recuperação clonogênica



Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

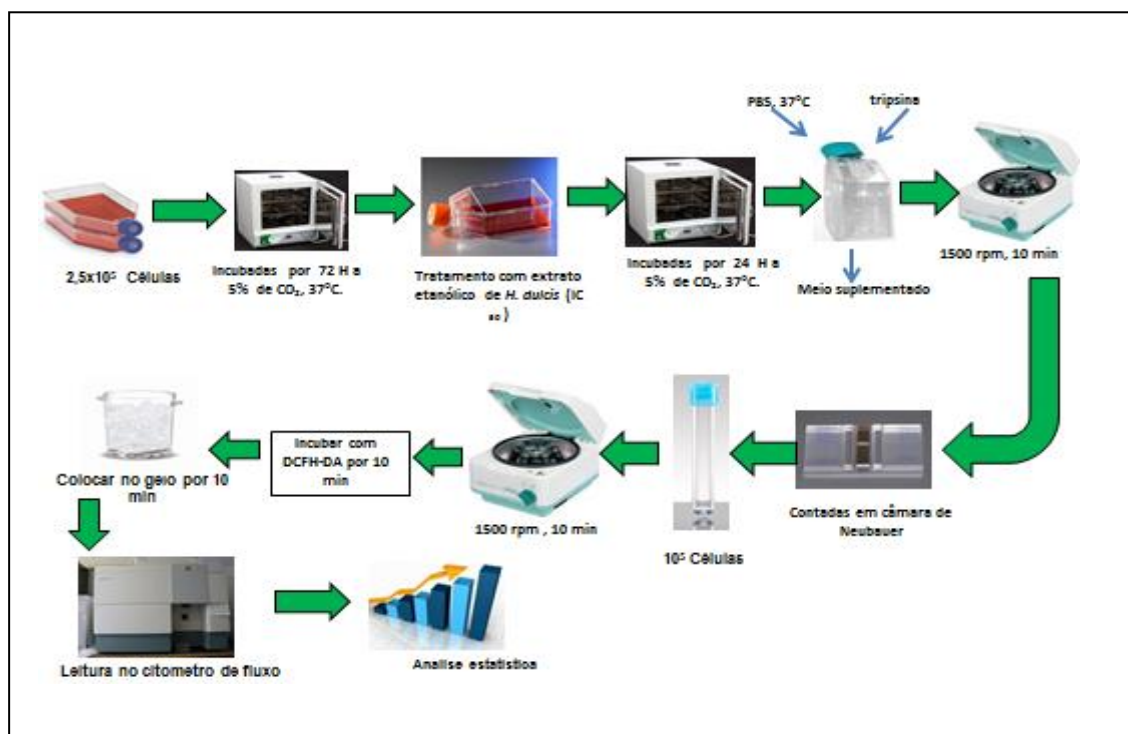
2.3.5 Deteccção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA

Após o tratamento com a concentração de IC₅₀, das frações mais citotóxicas, as células serão incubadas com o reagente 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA Sigma-Aldrich). A membrana plasmática é permeável ao reagente DCFH-DA, este quando entra na célula e reage com as espécies reativas de oxigênio (ERO), emite uma fluorescência que será absorvida pelos detectores do citômetro de fluxo (SRIVASTAVA et al., 2010).

As culturas de células (A549 ou Vero) foram tratadas durante 24 horas com a IC₅₀ (275µg/mL) obtida nos ensaios de viabilidade com as culturas de células A549. Logo após, foram submetidas ao tratamento com a solução de tripsina- EDTA (0,1%:

0,01%) inativadas com meio F12 suplementado com SFB (10%) e centrifugadas a 1500 rpm, a 37°C, por 5 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e ao precipitado acrescentou-se PBS. As células foram filtradas duas vezes em peneira de nylon 70µm (Corning) e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, foi transferido um volume de 1×10^5 células para um tubo FACS e centrifugado por mais 5 minutos, a 1500 rpm, a 37°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo FACS foi mantido na vertical, com a abertura voltada para baixo, para a evaporação do excesso de PBS. Foram então adicionados 10µL de DCFH-DA e o tubo foi incubado por 10 minutos protegido da luz, a temperatura ambiente. Passado esse período, foram adicionados 500µL de PBS e a amostra foi avaliada por citometria de fluxo (figura 8). Os dados obtidos foram analisados no programa CELL Quest (BD Biosciences). Neste ensaio, o reagente DCFH-DA entra na célula e reage com as espécies reativas de oxigênio (ERO) e emite uma fluorescência que será absorvida pelos detectores do citômetro.

Figura 8 - Esquema da metodologia de citometria de fluxo



Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.4 Cepas em estudo: *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 e CD138

As culturas de leveduras utilizadas, neste estudo foram as *S. cerevisiae* FF18733 (MATa, *leu2-3-112*, *trp1-289*, *his7-2*, *ura3-52*, *lys1-1*) (HEUDE; FABRE, 1993) e a *S. cerevisiae* CD138 (FF18733 com *ogg1 Δ::TRP1*) (THOMAS et al., 1997).

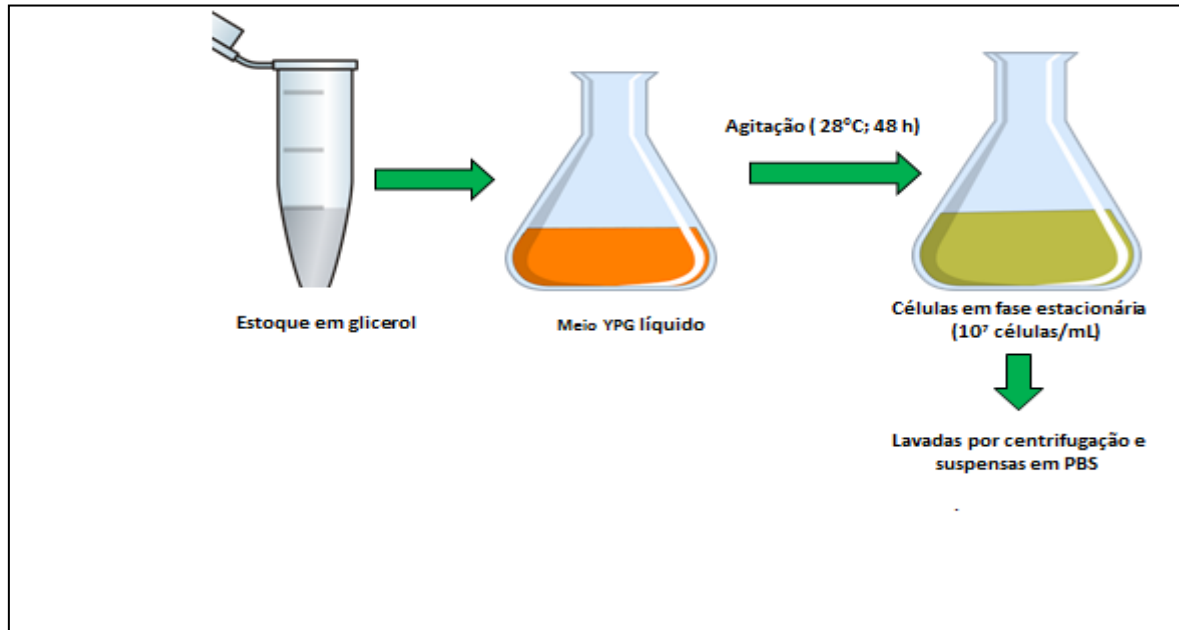
As culturas foram mantidas em estoque contendo a células na fase estacionária, em glicerol estéril 87% (Merck) na proporção de 1:1, a -70°C, sendo renovados a cada 12 meses.

2.4.1 Obtenção da cultura de *S. cerevisiae*

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

Para obtenção das culturas para os experimentos, foram feitas novas culturas, a partir da cultura já crescida, na proporção de 1:100 em meio YPG líquido estéril, o qual foi mantido a 28°C, sob agitação, por 48 horas. A densidade ótica, no comprimento de onda 600nm (DO_{600nm}), da cultura foi medida e o número de células viáveis foi determinado ($DO_{600nm} = 1$, corresponde a $\sim 10^7$ células/ml). As células foram lavadas duas vezes, por centrifugação durante 10 minutos a 4500 rpm, 20°C e suspensas em PBS (figura 9).

Figura 9 - Esquema da metodologia de obtenção das culturas de *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 e CD138



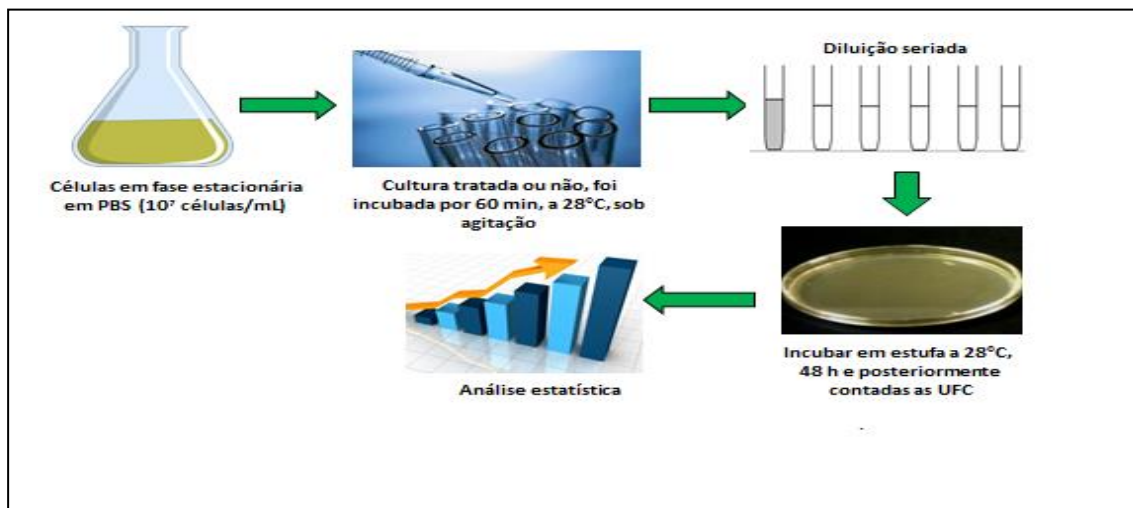
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.5 Efeito do extrato etanólico de *H. dulcis* na sobrevivência das culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

Para avaliar a capacidade citotóxica do extrato, alíquotas (2ml) de suspensões das culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, na fase estacionária de crescimento, em PBS estéril, foram incubadas com o extrato vegetal nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100; 125 e 150 µg/mL e também com controles (DMSO 1% e PBS) e com o controle positivo 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), na concentração de 1 µg/mL, um agente genotóxico e mutagênico (FRONZA et al., 1992), a 28°C, sob agitação constante por 60 minutos. Após este tempo, alíquotas foram retiradas e diluídas em PBS. Alíquotas desta diluição (100µl) foram semeadas em placas contendo meio YPG semi-sólido. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa, a 28°C, ao abrigo da luz, por períodos de 48 horas. Posteriormente, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) (figura 10). Durante este estudo foi determinada a IC₅₀.

Uma vez obtido o número de sobreviventes em cada tempo de incubação, as frações de sobrevivência ($FS = N/N_0$) foram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis após o tempo de tratamento (N), pelo número de células viáveis no tempo zero (N_0), sendo construídos os gráficos representativos dos resultados.

Figura 10 - Esquema da metodologia do ensaio de sobrevivência das culturas de *Saccharomyces cerevisiae*



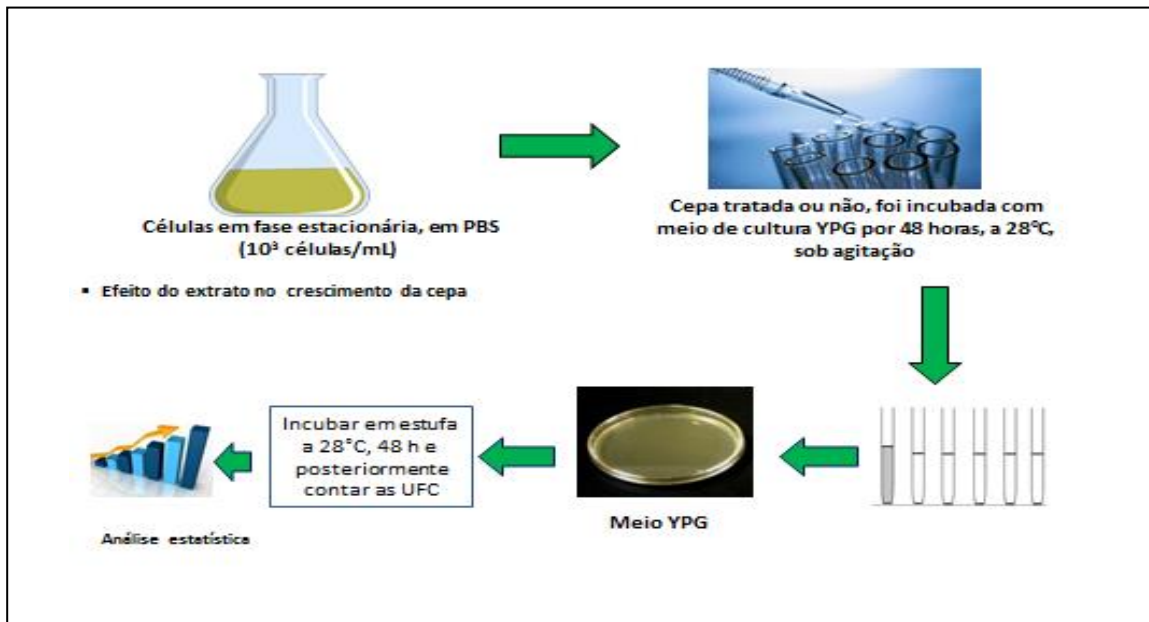
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.6 Efeito do extrato etanólico de *H. dulcis* no crescimento das culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

Este ensaio tem como objetivo verificar se extrato etanólico de *H. dulcis* interfere no crescimento normal das culturas de *S. Cerevisiae* FF18733 e CD138. Após a obtenção das culturas na fase estacionária de crescimento (ver item 3.4.1) foi realizado um pernoite de 48 horas para obtenção de culturas para este estudo. Este pernoite foi diluído 1:10 e a partir desta diluição, foram retirados 5 μ L e colocados em tubos de ensaio, contendo 2mL de meio YPG ($\sim 10^3$ células/mL). Cada tubo com a cultura diluída foi incubado com o extrato (IC_{50}), ou com os controles. As amostras foram submetidas à agitação (120rpm), por 48 horas, a 28°C. Para a realização da curva de crescimento, alíquotas foram retiradas, diluídas e semeadas em placas

contendo meio YPG semi-sólido e incubadas por 48 horas, a 28°C, para crescimento das colônias, contagem e construção da curva de viabilidade celular (figura 11).

Figura 11 - Esquema da metodologia do ensaio de crescimento em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*

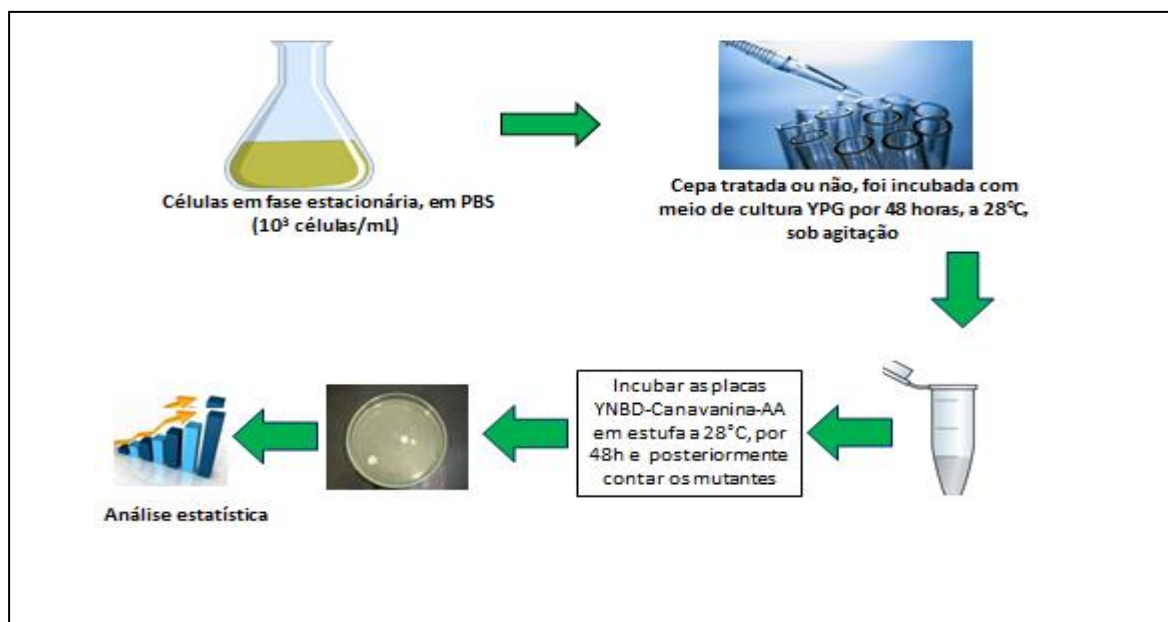


Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.7 Avaliação da potencialidade mutagênica do extrato etanólico de *H. dulcis* nas culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

Para a avaliação da capacidade mutagênica do extrato na cultura de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, as células foram tratadas com extrato (IC₅₀), em PBS estéril (item 3.5). Depois das 48 horas, foram retiradas alíquotas de 1mL (~10⁷ células/mL) de cada tubo, centrifugadas e suspensas em 250µL de PBS, para facilitar a semeadura em placas de Petri contendo meio YNBD semi-sólido, suplementado com aminoácidos e bases requeridos pela cepa em estudo e com canavanina (60mg/L). Após esta etapa, as placas foram incubadas em estufa (28°C), por 48 horas, e posteriormente, as UFC foram contadas para ser feito o cálculo da mutagênese (SILVA et al., 2016) (figura 12)

Figura 12 - Esquema da metodologia do ensaio de mutagênese em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*



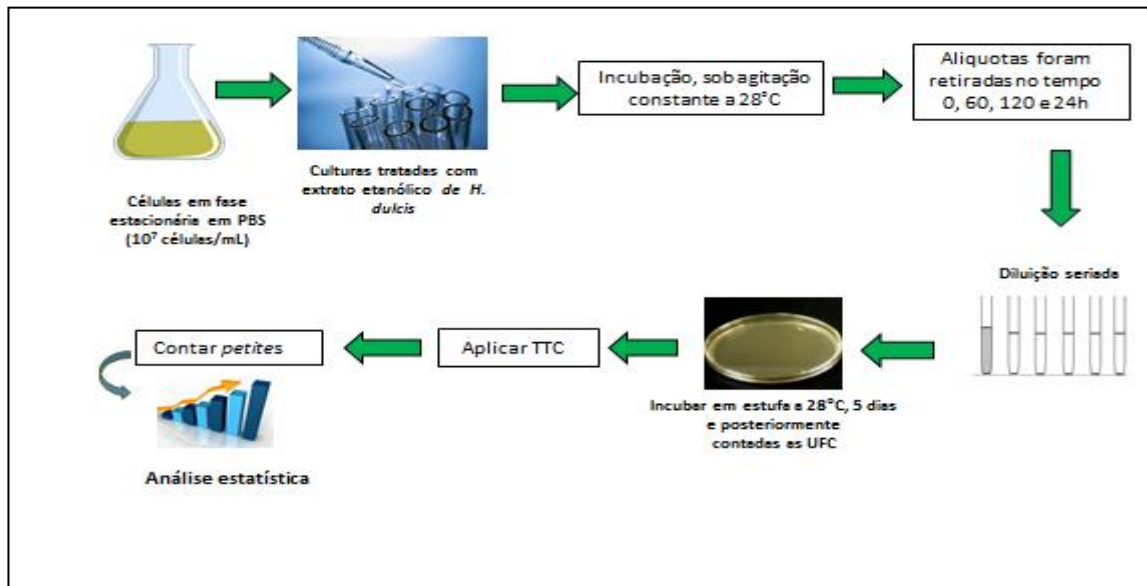
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.8 Teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio para análise de colônias *petites* nas culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

Para verificar a frequência de colônias *petites* nas culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, foi empregado o teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Neste teste, através da diferença de coloração, colônias que perderam a função mitocondrial, chamadas *petites* (apresentam cor branca) foram distinguidas daquelas que apresentarem seu metabolismo respiratório intacto (apresentam cor vermelha) (CHEN; CLARK-WALKER, 2000; OGUR; ST. JOHN; NAGAI, 1957).

As culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, tratadas com as diferentes concentrações do extrato ou não, foram semeadas em placas de Petri contendo YPG semi-sólido e incubadas a 28°C. Após 5 dias, as UFC foram contadas e logo em seguida, foi vertido 6-8mL de tampão fosfato com agar (0,7%) contendo TTC (0,05%), a 55°C, sobre as UFC. Após 15-20 minutos, tempo necessário para solidificação do ágar, as colônias que apresentarem cor branca, foram contadas (figura 13).

Figura 13 - Esquema da metodologia do ensaio de frequência de colônias pequenas nas culturas de *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

2.9 Análise estatística

A análise estatística, em cada um dos ensaios experimentais, foi realizada pela utilização do programa Graphpad InStat 4.0©, adotando-se um nível de certeza de 95%. Os dados obtidos foram testados, quanto à sua normalidade através do teste kolmogorov-smirnov. Para a análise dos resultados foi aplicado o teste t de Student pareado para comparar apenas duas amostras e ANOVA para comparar mais de duas amostras e o pós teste de Tukey.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação de citotoxicidade

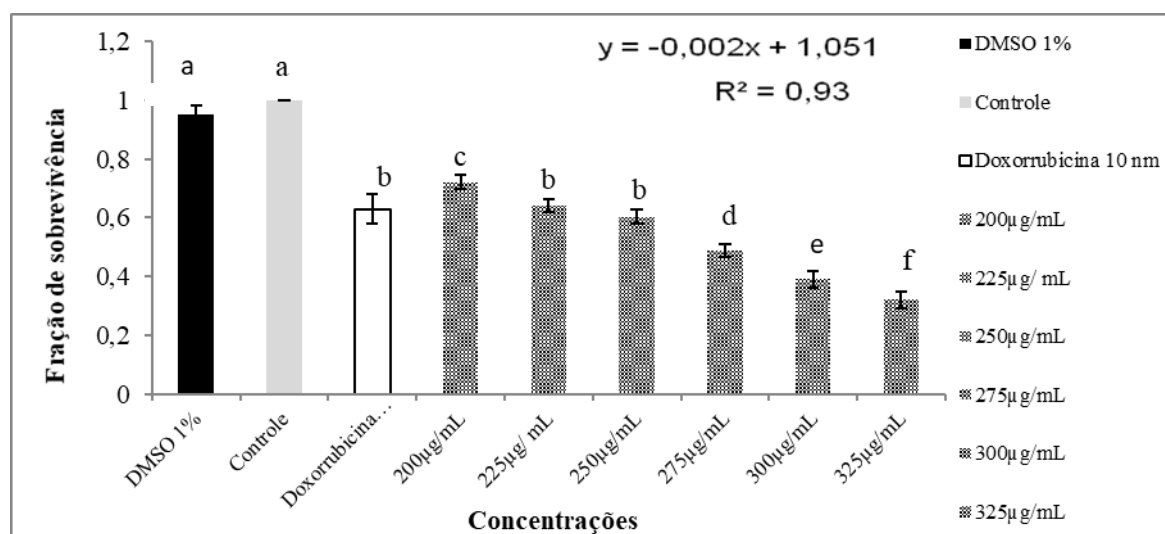
3.1.1 Exclusão do azul de tripan em culturas de células A549

Foi possível observar a diminuição da viabilidade das células tratadas com o extrato etanólico de folhas de *H. dulcis*, em relação ao controle para todas as concentrações testadas. Esta diferença foi comprovada estatisticamente. Porém, entre as concentrações de 225 µg/mL, 250 µg/mL e o controle positivo Doxorubicina não foi verificada diferença estatisticamente significativa (Figura 14).

Tendo como base nos resultados da tabela 1, foi calculada a IC₅₀, para isso, determinou-se a equação da reta utilizando o software Excel®, onde o valor do coeficiente de correlação R² foi de 0,93. De acordo com esta equação, a IC₅₀ calculada foi de 275,5 µg/mL e a experimental, 275µg/mL.

O DMSO na concentração de 1%, quantidade utilizada para diluir o extrato, também foi testado em culturas de células A549, no entanto não se mostrou citotóxico em relação ao controle, ou seja, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre eles.

Figura 14 - Fração de sobrevivência em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Cultura de células A549 foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para os três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

Tabela 1 - Fração de sobrevivência em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*

Concentrações	DMSO1%	Controle	Dox10nM	200µg/mL	225µg/mL	250µg/mL	275µg/ mL	300µg/mL	325µg/mL
Média	0,951	1	0,633	0,721	0,641	0,602	0,492	0,393	0,321
Máximo	1,003	1	0,725	0,763	0,684	0,643	0,536	0,444	0,373
Mínimo	0,899	1	0,541	0,679	0,598	0,561	0,448	0,342	0,269
Desvio padrão (95%)	0,052	0	0,092	0,042	0,043	0,041	0,044	0,051	0,052

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.1.2 Exclusão do azul de tripan em culturas células Vero

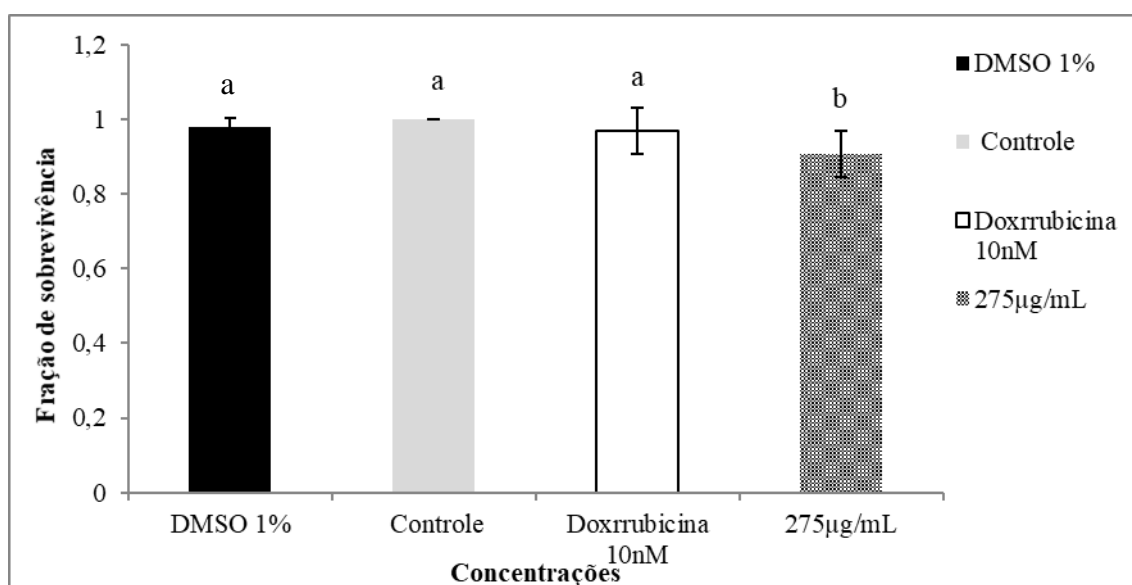
Foi determinada a concentração do extrato etanólico de *H. dulcis* que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀) em culturas de células A549 (Figura 14). Essa concentração, 275µg/mL, foi utilizada para avaliar a citotoxicidade em culturas de células Vero.

Na figura 15, encontram-se os dados obtidos nos experimentos de avaliação de citotoxicidade do extrato etanólico de *H. dulcis* em culturas de células Vero. Com

base nesses resultados, foi possível observar que houve uma diminuição de 10% da viabilidade das células tratadas com o extrato em relação ao controle. Esta diferença foi comprovada estatisticamente.

O DMSO na concentração de 1%, quantidade utilizada para diluir o extrato, também foi testado em culturas de células Vero, no entanto não se mostrou citotóxico em relação ao controle, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre eles.

Figura 15 - Fração de sobrevivência em culturas de células Vero tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Cultura de células Vero foram tratadas com extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para os três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

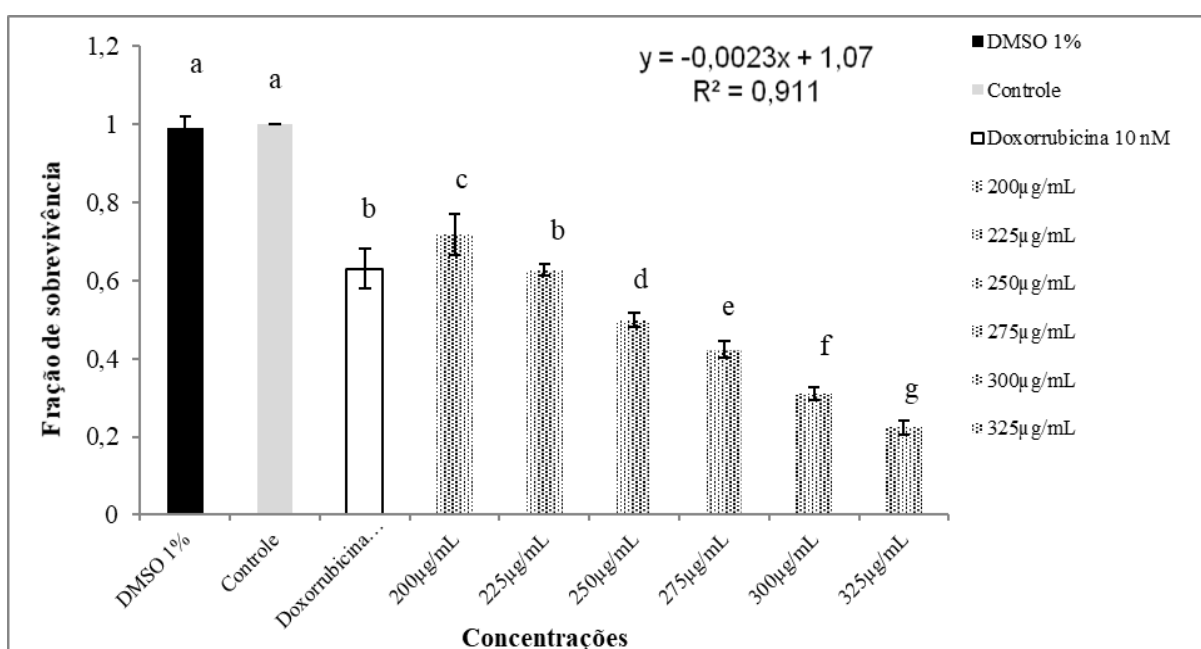
3.1.3. Viabilidade celular pelo ensaio com WST-1 em culturas de células A549

Foi possível comprovar que todas as concentrações do extrato apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. A concentração de 225µg/mL inibe o crescimento celular na mesma proporção do controle positivo Doxorrubicina 10nM, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre eles (figura 16).

Tendo como base os resultados da tabela 2, foi calculada a IC₅₀, para isso, determinou-se a equação da reta utilizando o software Excel®, onde o valor do coeficiente de correlação R² foi de 0,911. De acordo com esta equação, a IC₅₀ calculada foi de 247,5µg/mL e a experimental, 250µg/mL.

O DMSO na concentração de 1%, quantidade utilizada para diluir o extrato, também foi testada em culturas de células A549, no entanto, não se mostrou citotóxico em relação ao controle, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre eles.

Figura 16 - Fração de sobrevivência por WST-1 em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de células A549 foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para os três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

Tabela 2 - Fração de sobrevivência por WST-1 em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*

Concentrações	DMSO 1%	Controle	Doxo10nM	200µg/mL	225µg/mL	250µg/ml	275µg/mL	300µg/mL	325µg/mL
Média	0,966	1	0,633	0,711	0,621	0,493	0,421	0,301	0,221
Máximo	1,016	1	0,722	0,812	0,653	0,524	0,462	0,331	0,253
Mínimo	0,916	1	0,541	0,610	0,589	0,462	0,380	0,271	0,189
Desvio padrão (95%)	0,050	0	0,092	0,101	0,032	0,031	0,041	0,030	0,032

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

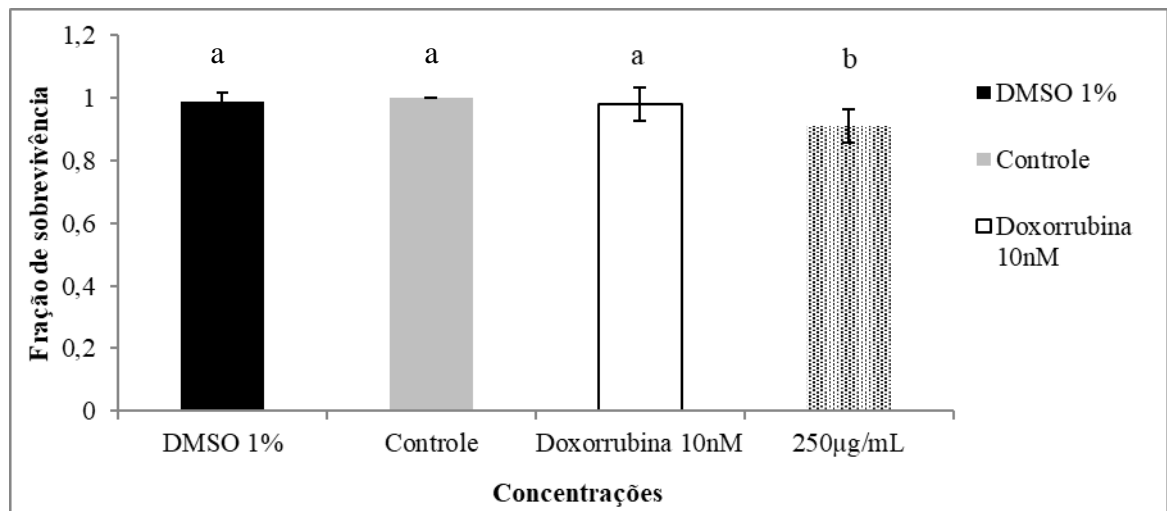
3.1.4. Viabilidade celular pelo ensaio com WST-1 em culturas de células Vero

Foi determinada a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}) em culturas de células A549 na presença do extrato etanólico de *H. dulcis* (figura16). Essa concentração, 250µg/mL, foi utilizada para avaliar a citotoxicidade em culturas de células Vero.

Na figura 17 encontram-se os dados obtidos sobre a citotoxicidade do extrato expressos sob a forma de fração de sobrevivência em culturas de células Vero. Com base nesses resultados, foi possível observar que houve uma diminuição de 9 % da viabilidade das células tratadas com o extrato em relação ao controle. Esta diferença foi comprovada estatisticamente.

O DMSO na concentração de 1%, quantidade utilizada para diluir o extrato, também foi testado em culturas de células Vero, no entanto não se mostrou citotóxico em relação ao controle, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre eles.

Figura 17 - Fração de sobrevivência por WST-1 em culturas de células Vero tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



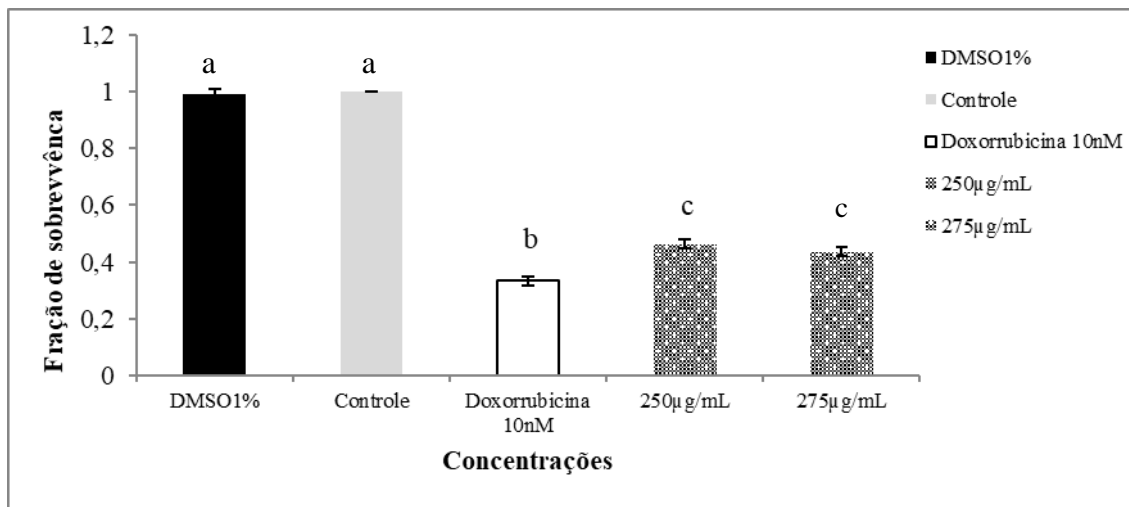
Legenda: Culturas de células Vero foram tratadas com extrato de *H. dulcis* a 37° C, e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para os três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$). Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.1.5. Recuperação clonogênica em culturas de células A549

Foi possível comprovar que as células tratadas com DMSO 1%, utilizado para diluir o extrato, não apresentaram diminuição na capacidade mitogênica, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Foi observado também, que as concentrações de 250µg/mL e 275µg/mL, apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparadas ao controle, mostrando a diminuição da capacidade mitogênica das células após o tratamento. Quando comparadas as concentrações de 250µg/mL e 275µg/mL, essas não apresentaram diferença estatisticamente significativa (figura 18).

Figura 18 - Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células A549 tratadas com extrato de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de células A549 foram tratadas com extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Dez dias após o tratamento foram contados os aglomerados celulares. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para os três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

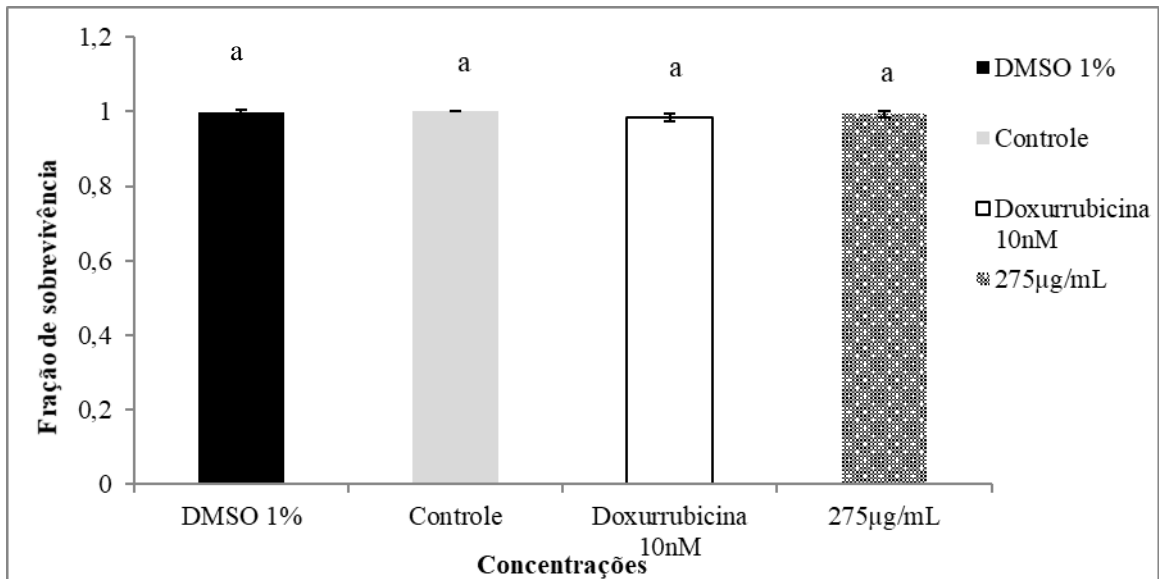
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.1.6 Recuperação clonogênica em culturas de células Vero

Foi possível comprovar que não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 250µg/mL e 275µg/mL, quando testadas em culturas de células A549 (figura 18). Com isso a maior concentração foi determinada para prosseguir com esses estudos. Essa concentração, 275µg/mL, foi utilizada para avaliar a capacidade mitogênica em culturas de células Vero.

Na figura 19, encontram-se os dados obtidos nos experimentos de recuperação clonogênica em culturas de células Vero na presença do extrato. Com base nesses resultados, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa na capacidade mitogênica das células induzida pelo extrato, nesta concentração, quando comparada ao controle e ao DMSO na concentração de 1%, quantidade utilizada para diluir o extrato.

Figura 19 - Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células Vero tratadas com extrato de *H. dulcis*



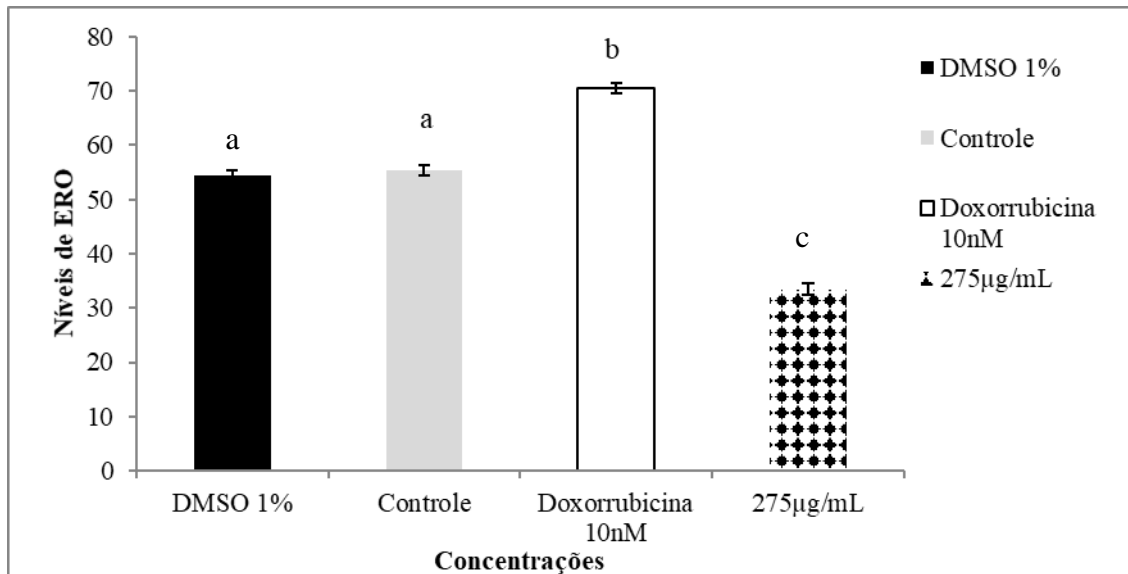
Legenda: Culturas de células Vero foram tratadas com extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, Dez dias após o tratamento foram contados os aglomerados celulares. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para os três experimentos, com quintuplicatas. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.1.7 Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo em culturas de células A549

Foi possível comprovar a diminuição estatisticamente significativa dos níveis de espécies reativas de oxigênio em culturas de células A549, quando tratadas com o extrato etanólico de *H. dulcis* na concentração de 275 µg/mL (figura 20).

Figura 20 - Avaliação de espécies reativas de oxigênio em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



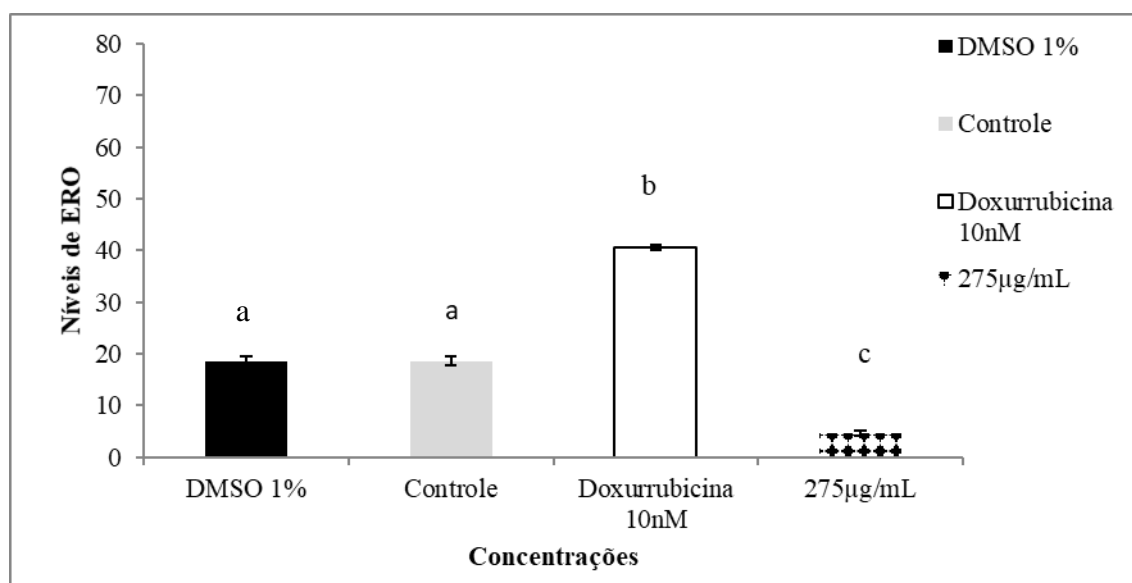
Legenda: Avaliação de espécies reativas de oxigênio detectada pelo corante DCFH-DA por citometria de fluxo em culturas de células A549 tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para seis experimentos. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.1.8 Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo em culturas de células Vero

Foi possível comprovar a diminuição estatisticamente significativa dos níveis de espécies reativas de oxigênio em cultura de células Vero, quando tratadas com o extrato etanólico de *H. dulcis* na concentração de 275µg/mL (figura 21).

Figura 21 - Avaliação de espécies reativas de oxigênio em cultura de células Vero tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Avaliação de espécies reativas de oxigênio detectada pelo corante DCFH-DA por citometria de fluxo em culturas de células Vero tratadas com extrato etanólico de *H. dulcis*. Os resultados estão expressos em um intervalo de 95% de confiança para seis experimentos. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.2 Avaliação de efeitos do extrato etanólico de *Hovenia dulcis* em cultura de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

3.2.1 Avaliação da sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com extrato *H. dulcis*

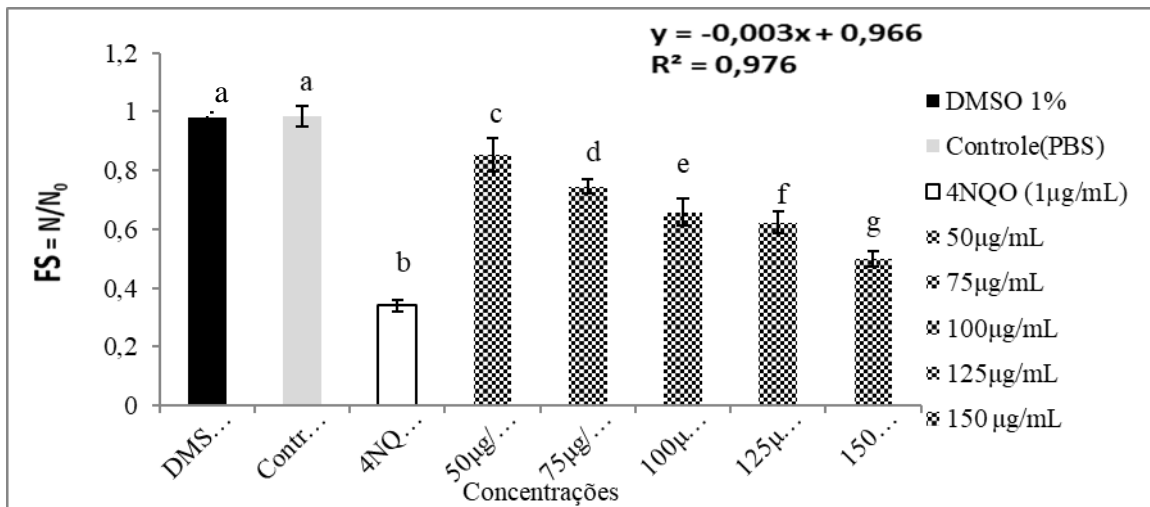
Foi possível comprovar a inativação celular estatisticamente significativa através da fração de sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 após 60 minutos de tratamento com as diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis*, indicando um importante efeito tóxico dose-dependente. Os resultados obtidos foram comparados com o controle positivo 4NQO (1 µg/mL) e com os controles PBS e o DMSO 1% (figura 22).

Tendo como base os resultados da tabela 3, foi calculada a IC_{50} , para isso, determinou-se a equação da reta utilizando o software Excel®, onde o valor do

coeficiente de correlação R^2 foi de 0,976. De acordo com esta equação, a IC_{50} calculada foi de 155 μ g/mL e a experimental, 150 μ g/mL.

O DMSO 1%, utilizado para diluir o extrato, não se mostrou citotóxico, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre o DMSO 1% e o controle.

Figura 22 - Fração de sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* FF18733 tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis* e com o controle positivo 4NQO (1 μ g/mL), durante 60 minutos, a 28 $^{\circ}$ C. Os resultados estão expressos com 95% de confiança para seis experimentos. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

Tabela 3 - Fração de sobrevivência de culturas de *S. cerevisiae* FF18733 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis*

Concentrações	DMSO1%	Controle	4NQO 1 μ g/mL	50 μ g/mL	75 μ g/mL	100 μ g/mL	125 μ g/mL	150 μ g/mL
Média	0,940	0,942	0,345	0,852	0,742	0,652	0,621	0,491
Máximo	01,01	0,974	0,386	0,943	0,782	0,733	0,692	0,533
Mínimo	0,870	0,910	0,304	0,761	0,702	0,571	0,55	0,449
Desvio padrão (95%)	0,070	0,032	0,041	0,091	0,040	0,081	0,071	0,042

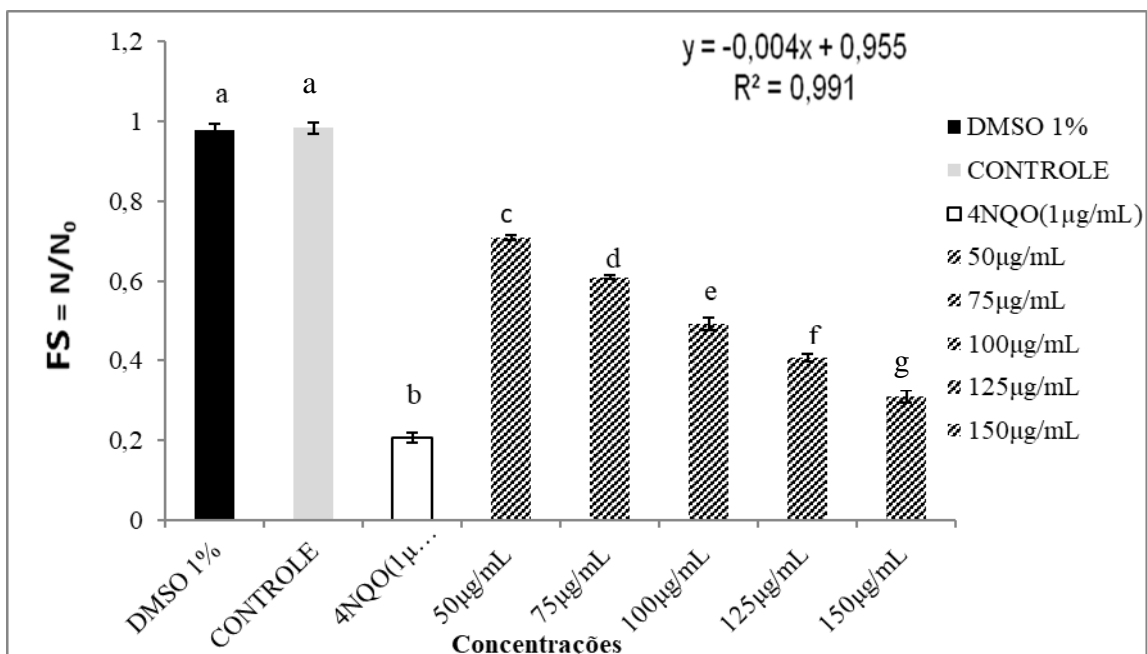
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.2.2 Avaliação da sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com extrato *H. dulcis*

Foi possível comprovar a diminuição estatisticamente significativa da fração de sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* CD138 quando tratada com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis* e com o controle positivo 4NQO (1µg/mL). Os resultados obtidos foram comparados com o controle positivo 4NQO (1µg/mL), que é um agente citotóxico e com os controles negativos PBS e o DMSO 1% (figura 23).

Tendo como base os resultados da tabela 4, foi calculada a IC₅₀, para isso, determinou-se a equação da reta utilizando o software Excel®, onde o valor do coeficiente de correlação R² foi de 0,991. De acordo com esta equação, a IC₅₀ calculada foi de 113µg/mL e a experimental, 100µg/mL.

Figura 23 - Fração de sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* CD138 tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis* ou controles (PBS e DMSO1%) durante 60 minutos, a 28°C. Os resultados estão expressos com 95% de confiança para seis experimentos. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

Tabela 4 - Fração de sobrevivência de culturas de *S. cerevisiae* CD138 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico de *H. dulcis*

Concentrações	DMSO 1%	Controle	4 NQO 1µg/mL	50µg/mL	75µg/mL	100µg/mL	125µg/mL	150µg/mL
Média	0,972	0,981	0,214	0,701	0,602	0,492	0,401	0,303
Máximo	0,993	1,004	0,225	0,712	0,614	0,531	0,411	0,324
Mínimo	0,951	0,958	0,203	0,690	0,590	0,460	0,391	0,282
Desvio padrão (95%)	0,021	0,023	0,011	0,011	0,012	0,032	0,010	0,021

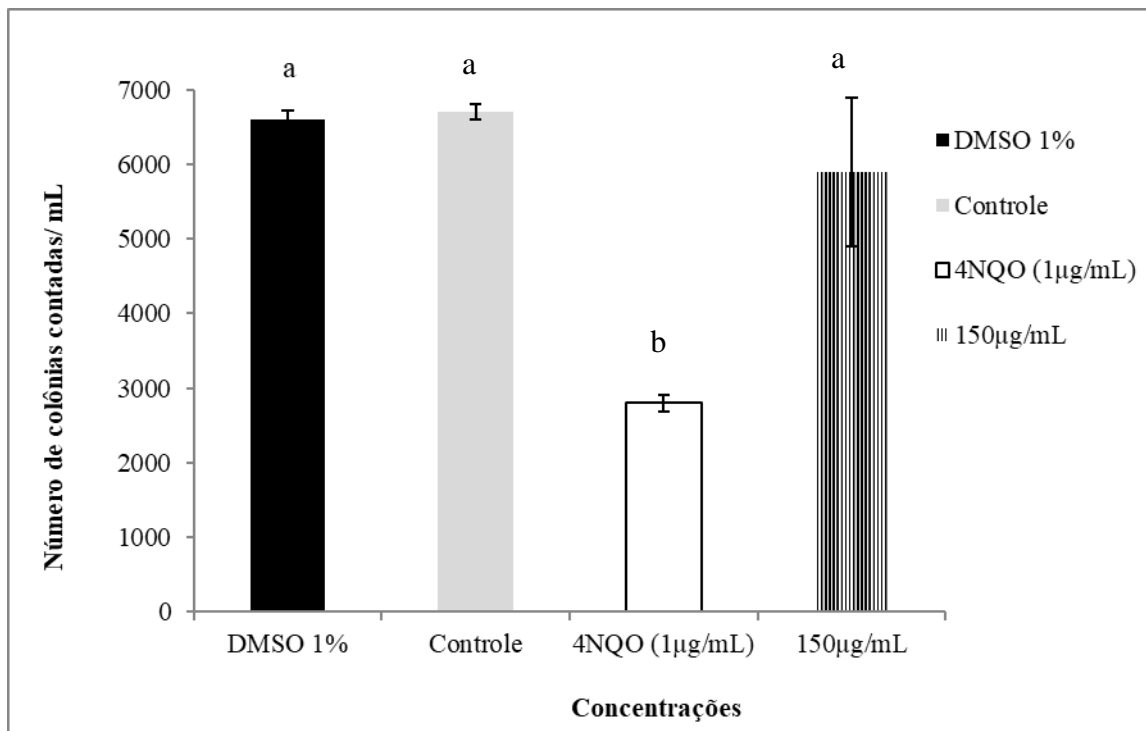
Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.2.3 Fração de crescimento em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com extrato de *H. dulcis*

Foi determinada a concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com o extrato etanólico de *H. dulcis*. Essa concentração, 150µg/mL, foi utilizada para avaliar a fração de crescimento das culturas, quando comparadas aos controles (PBS, DMSO 1%) e com o controle positivo 4NQO (1µg/mL) (figura 22).

Na figura 24 encontram-se os dados obtidos nos experimentos de crescimento em culturas de *S. Cerevisiae* incubadas com o extrato. Com base nesses resultados, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa da fração de crescimento das culturas de *S. cerevisiae* FF18733 tratadas com extrato, quando comparada aos controles (PBS e DMSO 1%).

Figura 24 - Fração de Crescimento em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* FF18733 ($\sim 10^3$ cells/mL) incubada em meio YPG líquido sob agitação, com extrato etanólico de *H. dulcis* (IC_{50}) por 48 horas. Os resultados estão expressos com 95% de confiança. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).
 Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

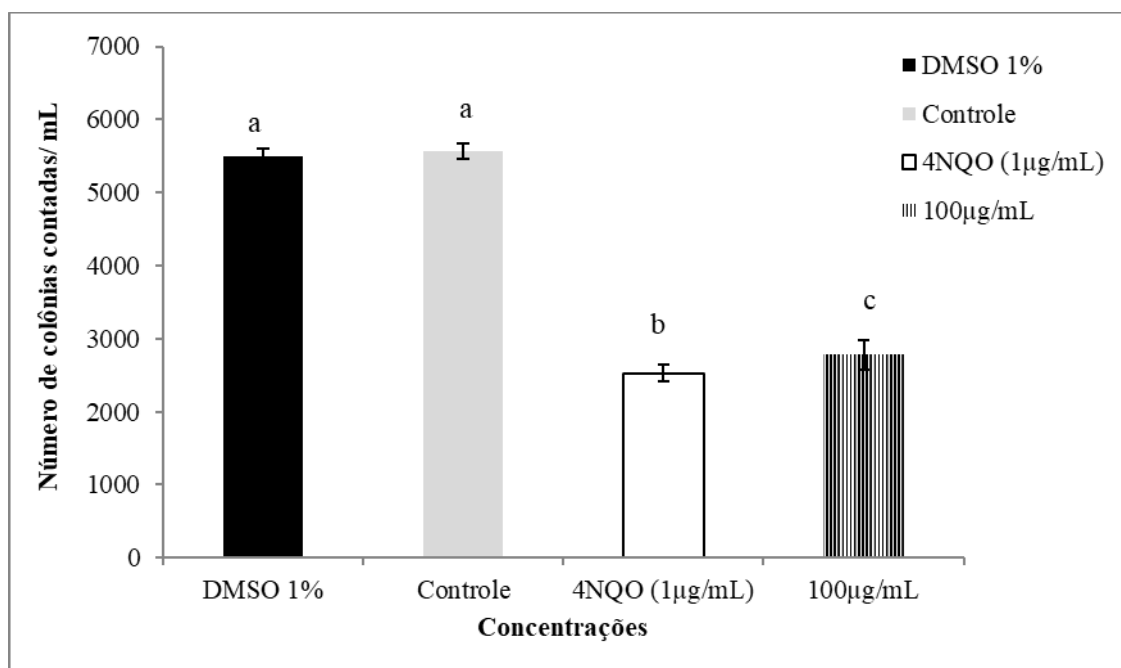
3.2.4 Avaliação da fração de crescimento em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com extrato de *H. dulcis*

Foi determinada a concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*. Essa concentração, 100µg/mL, foi utilizada para avaliar a fração de crescimento, quando comparadas aos controles (PBS, DMSO1%) e com o controle positivo 4NQO (1 µg/mL) (Figura 23).

Na figura 25, encontram-se os dados obtidos nos experimentos de crescimento em culturas de *S. Cerevisiae* incubadas com o extrato. Com base nesses resultados, foi possível observar que houve diminuição estatisticamente significativa da fração de

crescimento das culturas de *S. cerevisiae* CD138 tratadas com extrato, quando comparada aos controles (PBS e DMSO 1%).

Figura 25 - Fração de crescimento em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* CD138 ($\sim 10^3$ cells/mL) incubada em meio YPG líquido sob agitação, com extrato etanólico de *H. dulcis* (IC_{50}) por 48 horas. Os resultados estão expressos com 95% de confiança. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

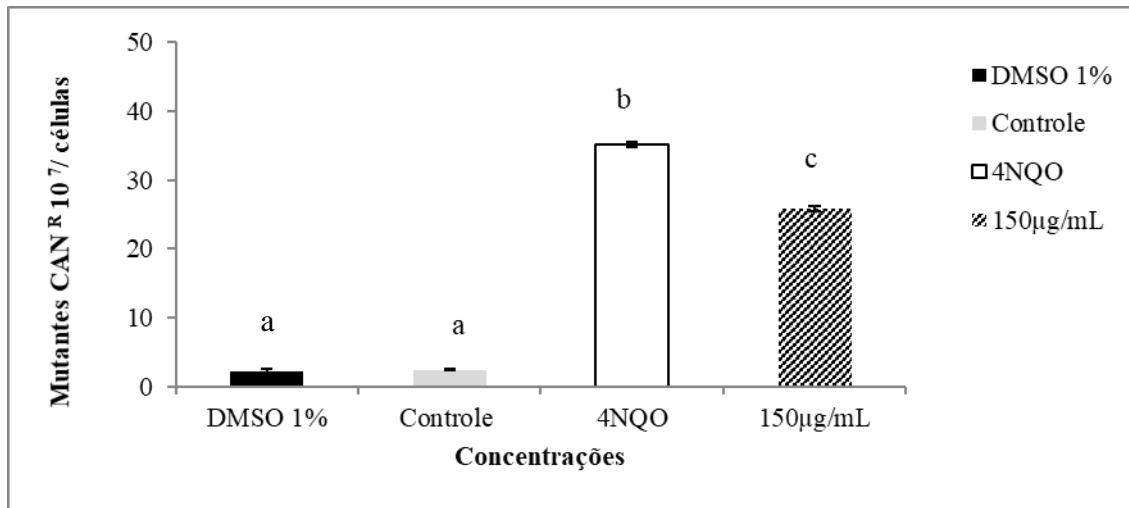
3.2.5 Avaliação da indução de mutagênese em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 pelo extrato de *H. dulcis*

Foi determinada a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}) em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*. Essa concentração, $150\mu\text{g/mL}$, foi utilizada para os ensaios de avaliação do potencial mutagênico (Figura 22).

Na figura 26 encontram-se os dados obtidos nos experimentos de mutagênese induzida pelo extrato etanólico de *H. dulcis*, durante o crescimento das culturas de *S. cerevisiae* FF18733. Com base nesses resultados, foi possível comprovar que houve um aumento estatisticamente significativo do número de mutantes induzidos pelo

extrato, nesta concentração. Os resultados obtidos foram comparados com o controle positivo 4NQO (1 µg/mL), que induz a mutagênese e com os controles negativos PBS e o DMSO 1%, que não induzem.

Figura 26 - Frequência de mutagênese pela exposição ao extrato etanólico de *H. dulcis* em culturas de *S. cerevisiae* FF18733



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* FF18733 (~10³cells/mL) foram incubadas em meio YPG líquido sob agitação, com extrato etanólico de *H. dulcis* (IC₅₀) por 48 horas. Os resultados estão expressos com 95% de confiança. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$). Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

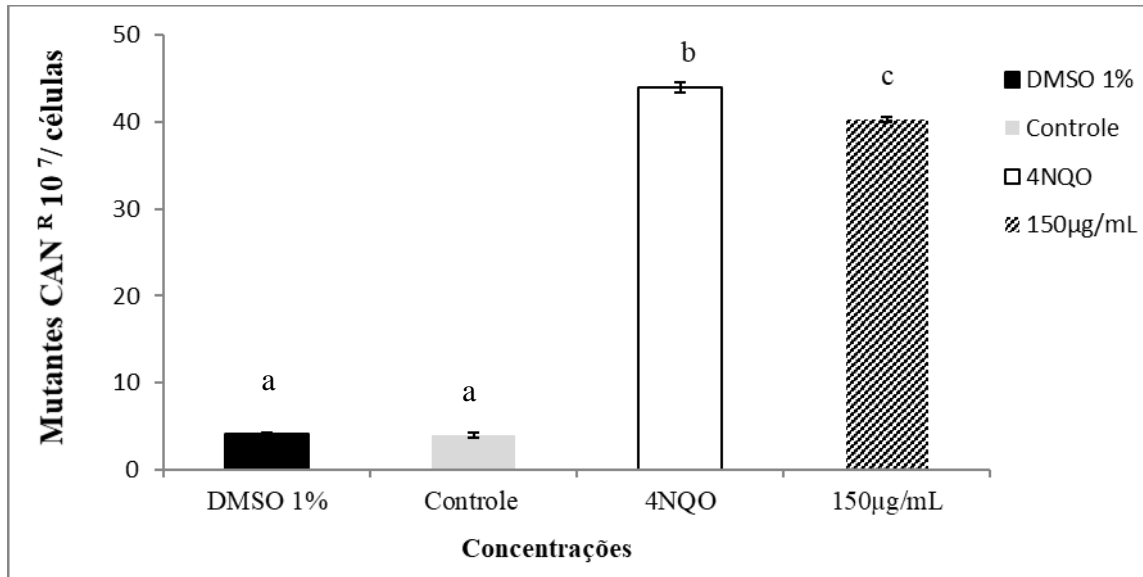
3.2.6 Avaliação da indução de mutagênese em culturas de *S. cerevisiae* CD138 pelo extrato de *H. dulcis*

Foi determinada a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀) em culturas de *S. cerevisiae* CD138 na presença do extrato etanólico de *H. dulcis*. Essa concentração, 100µg/mL, foi utilizada para os ensaios de avaliação do potencial mutagênico (Figura 23)

Na figura 27 encontram-se os dados obtidos nos experimentos de mutagênese induzida pelo extrato etanólico de *H. dulcis*, durante o crescimento das culturas de *S. cerevisiae* FF18733. Com base nesses resultados, foi possível comprovar que houve um aumento estatisticamente significativo do número de mutantes induzidos pelo extrato, nesta concentração. Os resultados obtidos foram comparados com o controle

positivo 4NQO (1 µg/mL), que induz a mutagênese e com os controles negativos PBS e o DMSO 1%, que não induzem.

Figura 27 - Frequência de mutagênese pela exposição ao extrato etanólico de *H. dulcis* em culturas de *S. cerevisiae* CD138

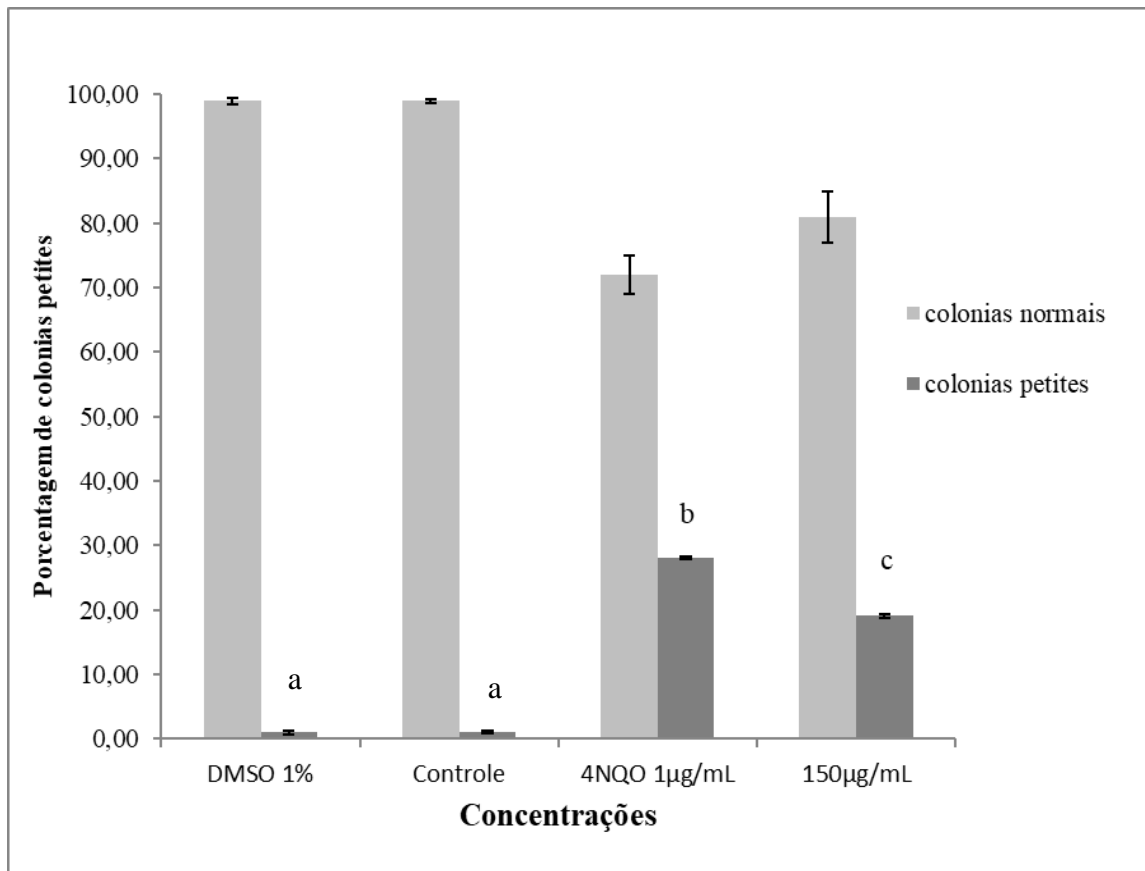


Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* CD138 (~10³cells/mL) foram incubadas em meio YPG líquido sob agitação, com extrato etanólico de *H. dulcis* (IC₅₀) por 48 horas. Os resultados estão expressos com 95% de confiança. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas (p < 0,05). Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.2.7 Avaliação da frequência de colônias *petites* em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*

A mutagênese do DNA mitocondrial foi analisada, pela indução de colônias *petites*, em culturas FF18733. O tratamento das culturas com a IC₅₀, do extrato etanólico de *H. dulcis*, induziu a mutagênese mitocondrial, indicando que houve alteração no metabolismo respiratório; figura 28. Neste estudo, resultados obtidos foram comparados com o controle positivo 4NQO (1 µg/mL), que induz a mutagênese mitocondrial e com os controles negativos PBS e o DMSO 1%, que não induzem a perda da função mitocondrial.

Figura 28 - Frequência de colônias *petites* em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



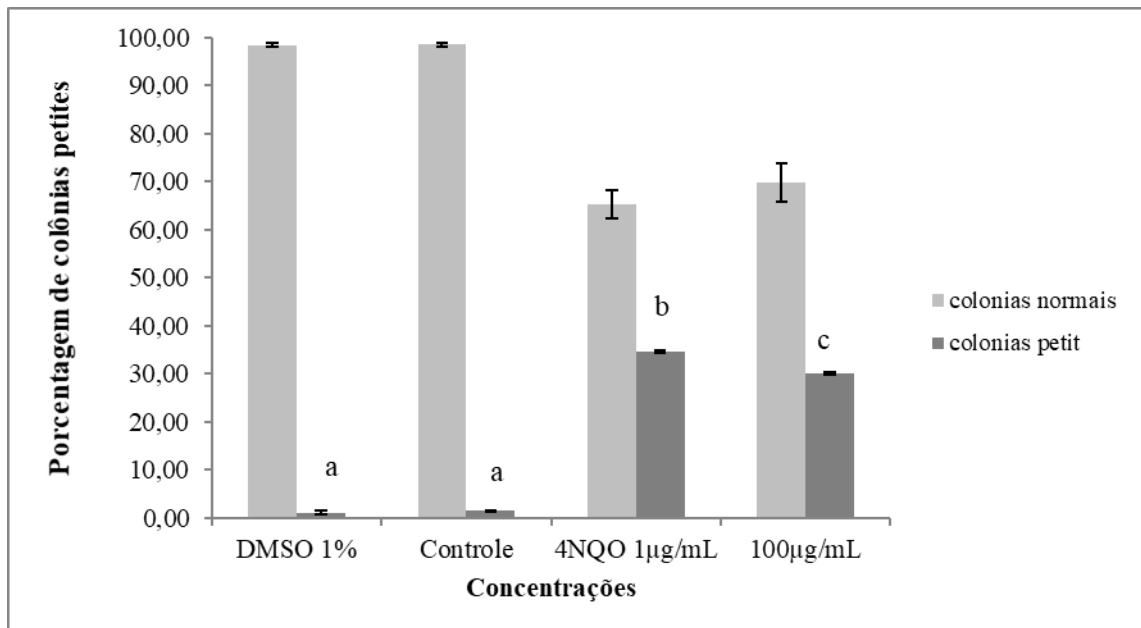
Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de coloração TTC em culturas de *S. cerevisiae* FF18733, após 60 minutos de incubação com a IC_{50} do extrato etanólico de *H. dulcis*. Os resultados expressam o percentual de colônias *petites* induzidas pelo etanólico de *H. dulcis*. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

3.2.8 Avaliação da frequência de colônias *petites* em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*

A perda de função mitocondrial ou deficiência no metabolismo respiratório foi analisada, pela frequência de colônias *petites*, em culturas de *S. cerevisiae* CD138. A incubação com a IC_{50} , do extrato etanólico de *H. dulcis*, induziu a mutagênese mitocondrial, indicando que houve alteração no metabolismo respiratório; figura 29. Neste estudo, resultados obtidos foram comparados com o controle positivo 4NQO (1µg/mL), que induz a mutagênese mitocondrial e com os controles negativos PBS e o DMSO 1%, que não induzem a perda da função mitocondrial.

Figura 29 - Frequência de colônias *petites* em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de coloração TTC em culturas de *S. cerevisiae* CD138, após 60 minutos de incubação com a IC_{50} do extrato etanólico de *H. dulcis*. Os resultados expressam o percentual de colônias *petites* induzidas pelo extrato etanólico de *H. dulcis*. Letras diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Fonte: Adaptado pela autora com base na pesquisa, 2017.

4 DISCUSSÃO

A espécie *H. dulcis* tem demonstrado um grande potencial bioativo. Quanto à sua composição química, possui derivados saponinícos, saponinas triterpênicas e flavonoides (HYUN, 2010). Extratos deste vegetal têm revelado propriedades, anti-gástrica (GADELHA et al., 2005), antidiabética (JI et al., 2002), antioxidante, hepatoprotetora, além da capacidade de detoxificação do etanol (XIANG; ZHU; LING., 2012) e antineoplásica (HYUN, 2010).

Em relação à avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *H. dulcis*, os resultados do ensaio de exclusão de azul de tripan foram semelhantes aos do ensaio com WST-1, onde encontramos uma $IC_{50} = 275\mu\text{g/mL}$ para os experimentos de azul de tripan e $250\mu\text{g/mL}$ para a técnica com WST-1. Ambos os ensaios foram realizados visando a confirmação do resultado, uma vez que no ensaio por exclusão do azul de tripan, é avaliada a morte celular pela perda da seletividade da membrana plasmática, e no ensaio de viabilidade por WST-1, a morte celular é observada pela perda da atividade mitocondrial.

Sabe-se que em relação à atividade antineoplásica de *H. dulcis*, existe relato na literatura de que os extratos de folhas na concentração de $250\mu\text{g/mL}$ inibem o crescimento das culturas de células BW (timona de camundongo), onde foi observado um percentual de inibição de 64,5% pelo extrato etanólico e 73,8% pelo extrato metanólico extraído das folhas de *H. dulcis* (CASTRO et al., 2002).

Outros autores observaram que extratos metanólicos de folhas nas concentrações de $100\mu\text{g/mL}$ de *H. dulcis* também inibiram o crescimento das culturas de células de hepatoma humano Hep G2 em 76% e do adenocarcinoma de cólon humano HT29 em 80% (PARK; CHANG; 2007).

Extratos etanólicos de frutos de *H. dulcis* também foram testados, quanto à sua atividade antineoplásica em cultura de células RAW 264.7, porém o extrato só se mostrou citotóxico para a maior concentração testada, a de $120\mu\text{g/mL}$ com inibição de 25% do crescimento celular (PARK et al., 2016b).

Além disso, estudos com a fração dietil éter dos extratos etanólicos da casca da árvore, mostraram a inibição do crescimento de culturas de células de hepatoma humano Hep3B ($IC_{50} = 0,25\text{ mg. mL}^{-1}$) e de adenocarcinoma de mama humano MCF7 ($IC_{50} = 0,1\text{ mg. mL}^{-1}$) (HYUN et al., 2010).

Os resultados encontrados na literatura, demonstram que atividades citotóxicas foram atribuídas aos extratos de *H. dulcis*, em concentrações acima de 100µg/mL (CASTRO et al., 2002; PARK; CHANG; 2007; HYUN et al., 2010; PARK et al., 2016b). Esses dados da literatura reforçam os resultados encontrados neste trabalho, onde extrato etanólico de folhas de *H. dulcis* inibiu o crescimento de culturas de células de carcinoma pulmonar(A549) na concentração na 250µg/mL.

Nos estudos de recuperação clonogênica, foi observada uma inibição da atividade mitogênica, nas concentrações de 250µg/mL e 275 µg/mL, dez dias após o tratamento com os extratos de *H. dulcis*. Essa inibição reforça que mesmo as células que sobreviveram ao tratamento, após o período de 10 dias não têm a capacidade de se dividir, o que reforça a atividade antineoplásica do extrato de *H. dulcis* nessas concentrações, mostrando um efeito biológico mais amplo, para avaliação da citotoxicidade, quando comparado a outros ensaios que avaliam efeitos breves.

Os valores de IC₅₀, que foram obtidas nos ensaios com as culturas de células A549, foram testadas nas culturas de células normais Vero, sendo que nestas, reduziram somente 10% da viabilidade nos ensaios de azul de tripan e 9% nos ensaios de WST-1. Com relação aos ensaios de recuperação clonogênica, o tratamento com o extrato de *H. dulcis* em culturas de células Vero não inibiu a capacidade mitogênica quando comparada ao controle. Esses resultados são promissores, pois o extrato apresenta uma maior citotoxicidade em culturas de células A549, e não gerou grandes danos em culturas de células Vero, sendo um agente promissor para a identificação de antineoplásico.

Nos experimentos de citometria de fluxo para avaliação de produção de ERO, foi possível observar um efeito antioxidante do extrato etanólico de folhas de *H. dulcis* em culturas de células A549 e Vero.

Essa diminuição de ERO em culturas celulares neoplásicas causa desequilíbrio da homeostase desta célula, podendo assim desencadear alguma via de ativação de morte celular (FOGG; LANNING; MACKEIGAN, 2011), uma vez que a diminuição de ERO em uma célula neoplásica pode levar a uma menor produção das citocinas pró-inflamatórias, conseqüentemente inibindo a progressão e invasão do tumor.

Em uma revisão recente na literatura, foi descrito que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), induz mutações que ativam o protooncogene c-Ha-ras. Nesta mesma revisão foi descrito que a mesma ERO produz uma mutação que inativa o gene supressor de

tumor p53 (GALADARI et al 2017), demonstrando assim que a diminuição de ERO na célula tumoral pode ser uma das vias da ativação do processo de morte celular.

Neste trabalho também foi utilizado o modelo biológico *S. cerevisiae*, que é um eucarioto inferior, que possui algumas características interessantes, uma delas como a proteína ogg1, que faz a remoção das lesões 8-OxoG (7,8-dihidro-8oxoguanina) e Fapi (2,6-diamino-4-hidroxi-5-(metil) formamidopirimidina) do DNA, estas lesões levam a mutagênese e a morte celular (SILVA et al., 2016). A inativação do gene *OGG1*, que codifica a proteína dna glicosilase ogg1, confere um fenótipo de mutante espontâneo levando a um acúmulo de transversões GC-TA, induzidas por agentes oxidantes.

Para avaliar a uma possível ação citotóxica pelo extrato etanólico de *H. dulcis*, foi analisada a sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae*, FF18733 (selvagem) e a mutante CD138 (deficiente no gene *OGG1*)

As células foram submetidas ao tratamento por 60 minutos com diferentes concentrações do extrato em ambas as culturas de *S. cerevisiae*, sendo a IC_{50} encontrada na concentração de 150µg/mL nas culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e em 100µg/mL na mutante CD138, sendo esta portanto mais sensível ao tratamento com o extrato de *H. dulcis*.

Estas concentrações de IC_{50} foram testadas com o objetivo de detectar uma ação do extrato de *H. dulcis* no crescimento celular das culturas de *S. cerevisiae* expostas por 48 horas, avaliando, portanto, o efeito do extrato no crescimento celular. Não houve uma diminuição significativa do crescimento celular para as culturas de *S. cerevisiae* FF18733 (selvagem), já na mutante CD138, houve diminuição estatisticamente significativa no crescimento quando exposta ao extrato por 48 horas.

Já no ensaio de mutagênese observou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência mutagênica em ambas as culturas, quando comparadas ao controle, mas esse aumento foi mais pronunciado na CD138 (mutante), quando comparada a FF18733 (selvagem). Esses resultados indicam que um ou mais componentes do extrato produzem lesões do tipo 8-oxoG ou Fapi e outras lesões ainda não identificadas.

Danos no genoma de mitocôndria, por agentes genotóxicos e/ou oxidantes podem ser avaliados através do teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Este teste permite a identificação, através de coloração, de colônias brancas, que apresentam alterações no seu metabolismo respiratório, das colônias sem alterações

(vermelhas). Nos experimentos que avaliam a indução de colônias *petites*, foi possível observar que houve um aumento estatisticamente significativo da porcentagem de colônias *petites* em ambas as culturas de *S. cerevisiae* tratadas quando comparadas ao controle, sendo que esse efeito foi maior na mutante CD138. Silva et al. (2014) já observaram esse mesmo efeito na cepa CD138 tratada com *Cassia augustifolia* (Sene). Esses resultados sugerem aumento de lesões no DNA mitocondrial, e conseqüentemente a alteração da atividade dessa organela. Comparando os resultados observados em eucarioto superior e inferior, observamos que nos dois casos ocorreu uma alteração nas vias oxidativas que afetam o metabolismo mitocondrial, sugerindo que esta organela é a mais afetada pelos produtos gerados pelo extrato de *H. dulcis*, sendo necessário estudo analisando a via de morte celular, e acerca da composição química do extrato.

CONCLUSÃO

Com base nestes resultados obtidos sobre o extrato etanólico de folhas de *Hovenia de dulcis* foi possível concluir que:

- O extrato de *H. dulcis* possui componentes que produzem morte celular diferenciada em uma célula neoplásica.
- Possui atividade antioxidante nas culturas de células A549 e Vero.
- O extrato de *H. dulcis* produz citotoxicidade em ambas as culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138.
- O extrato de *H. dulcis* produz lesões no DNA Mitocondrial e no DNA genômico de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138.
- O extrato de *H. dulcis* necessita de estudos fitoquímicos para a identificação e isolamento de substâncias quimioterápicas.

REFERÊNCIAS

ALONSO R. J. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis, 1998.

ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. 1ª edição. São Paulo: Roca, 2008.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Disponível em <http://www.atcc.org>. Prog.htm>Acesso em: 2 de agosto de 2016.

BAMPI, M.; BICUDO, M. O. P.; FONTOURA, P. S. G.; RIBANI, R. H. Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2361-2367, Novembro 2010.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. 1ª edição. Vitória: Edufes, 2008.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S.; Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa, UFV, 1984.

BRETAS, R. M. Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais. 2011. 154 f. **Dissertação** (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; HICKS, J.B. Transformation in yeast; development of a hybrid cloning vector and isolation of the can 1 gene. **Gene**, v. 8, n.1, p. 121-133, December 1979.

BROZMANOVA, J.; DUDAS, A.; HENRIQUES, J. A. P. Repair of oxidative dna damage – an important factor reducing cancer risk. **Neoplasma**, v. 48, n. 2, p. 85-93, 2001.

CASTRO, T. C; PELLICCIONE, V.L.B; FIGUEIREDO, M.R; SOARES, R. O. A; BOZZA, M. T; CAMPOS, V. R; ALBARELLO. N; FIGUEIREDO. S.F. L. Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. Cultivada in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Maringá, v. 12, n. 1, p. 96-99, 2002.

CAVALLAZZI, M. Plantas medicinais na Atenção Primária à Saúde. 2006. 144f. **Dissertação** (Mestrado em ciências médicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

CHEN, X. J.; CLARK-WALKER, D. **The petite mutation in yeasts: 50 years on**. **International Review of Cytology**. v.194, p. 197-238, 2000.

COSTA, O. A. *Hovenia dulcis* Thunb. Família das Rhamnaceas. **Revista da Flora Medicinal**. Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 230-239, 1934.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar**. 1ª edição. São Paulo: UNESP, 1996.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multi Ciência**, n.7, 2006.]

DUTHIE, S.; COLLINS, A.; DUTHIE, G.; DOBSON, V. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. V. 393, n. 3, p. 223-231, October 1997.

FERREIRA, V.F; PINTO, A.C. A. A fitoterapia no mundo atual. **Quimica Nova**. v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FIDALGO, T. K. S.; BARCELOS, R.; PETRÓPOLIS, D. B.; AZEVEDO, B. R.; PRIMO, L. G.; SILVA FILHO, F. C. Citotoxicidade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. **Revista Gaúcha de Odontologia**. Porto Alegre, v. 57, n.3, p. 317-321, Setembro 2009.

FOGG, V.C.; LANNING, N.J.; MACKEIGAN, J.P. Mitochondria in cancer at the crossroads of life and death. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 8, p. 526-539, August 2011.

FRONZA, G.; CAMPOMENOSI, P.; IANNONE, R.; ABBONDANDOLO, A. The 4-nitroquilonine 1-oxide mutational spectrum in single strand DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n.6, p.1283-1287, March 1992.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, December 2008.

GADELHA, A.P.; VIDAL, F.; CASTRO, T.M.; LOPES, C.S.; ALBARELLO, N. COELHO, M. G.; FIGUEIREDO, S.F.; MONTEIRO-LEAL, L. H. Susceptibilidade de *Giardia lamblia* para *Hovenia dulcis* extratos. **Parasitology Research**, v. 97, n.5 p. 399-407, September 2005.

GALADARIA, S; RAHMANA, A; PALLICHANKANDYA, S; THAYYULLATHILA, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144-168, March 2017.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.120, n. 1-3 p.1-22, December 2000.

GIARD, D.J.; AARONSON, S.A.; TODARO, G.J.; ARNSTEIN, P.; KERSEY, J.H.; DOSIK, H.; PARKS, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 51, n. 5, p. 1417–1423, November 1973.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HASE, K.; OHSUGI, M.; XIONG, Q.; BASNET, P.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n.4, p.381-385, April 1997.

HEUDE, M.; FABRE, F. α /alpha-control of DNA repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and physiological aspects. **Genetics**, v. 133, n. 3, p.489–498, March 1993.

HOBBSAWM, E. **Era dos extremos: o breve século XX – 1914 – 1991**. 2ª edição. São Paulo: Companhia das Letras, 1995.

HYUM, T. K.; EOM, S.H; YU, C.Y; ROITSCH, T. *Hovenia dulcis* – uma erva medicinal asiática. **Planta médica**, v.76, n. 10, p.943-949, 2010.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).2008. **Dissertação** (mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAKOBKIEWWICZ-BANECKA.; KLOSKA, A.; STEPNOWSKA, M.; BANECKI, B.; WEGRZYN, A.; WEGRZYN, G. A. Bacterial model for studying effects of human in vivo: *Escherichia coli* strains mimicking a common polymorphism in the human MTHFR gene. **Mutation Research**, v. 578, p. 175-178, October 2005.

JI, Y., CHEN, S., ZHANG, K., WANG, W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb. on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice. **Journal of chinese medicinal materials**, v.25, n. 3, p.190-191, March 2002.

JUNG, C.H.; CHO, I.; AHN, J.; JEON, T.I.; HA, T.Y. Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. **Phytotherapy Research**, v.27, n. 1, p.139-143, 2013.

JÚNIOR, C. V. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Química Nova**. São Paulo, v.26, n.3, p. 390-400, June 2003.

KAMALA-KANNAN, S.; HAN, S.; LEE, K.; VELMURUGAN, P.; LEE, Y. H.; CHAE, J.; LEE, Y.; LEE, J. OH, B. Association of elm yellows subgroup 16SrV-B phytoplasma with a disease of *Hovenia dulcis*. **Journal of Phytopathology**. v. 159, p. 171-174, January 2011.

KIM J. H.; LEE S. C.; RO. J.; KANG, H. S.; YOON, S. Jnk signaling Pathway-mediated regulation of stat3 activation is linked to the development of doxorubicin

resistance in cancer cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 373-380, February 2010.

KIM, S.; HAN, J. Breeding of Korean raisin tree (*Hovenia dulcis* var. *koreana* Nakai) for high productivity in Korea. *The Korean Journal of Breeding Science*, **Gwonseon-Gu Suwon**. v. 40, n. 4, p. 371-376, 2008.

LEE, S.B.; CHA, K.H.; SELENGE, D.; SOLONGO, A.; NHO, C.W. The chemo preventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.30, n.6, p.1074-1079, June 2007.

LIM, S. J; KIM, M.; RANDY, A.; NHO, C.W. Inhibitory effect of the branches of *Hovenia dulcis* Thunb and its constituent pinosylvin on the activities of IgE-mediated mast cells and passive cutaneous anaphylaxis in mice. **Food e Function**, v. 6, n. 4, p. 1361–1370, April 2015.

LIMA, R. B. A família Rhamnaceae no Brasil: diversidade e taxonomia. 2001. **Tese** (Doutorado em Biociências) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. DE. A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. 2ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. 1ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003.

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

MAHOMOODALLY, M. F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A. H. Antimicrobial Activities and Phytochemical Profiles of Endemic Medicinal Plants of Mauritius. **Pharmaceutical Biology**, v.43, n. 3, p. 237–242, January 2005.

MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; LIU, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 703–714, October 2010.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATÌJÈKOVÁ, A.; SYCHRIVÁ, H. Biogenesis of *Candida albicans* Can1 permease expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 408, n. 1, p. 89-93, May 1997.

MEDEIROS, K.; FIGUEIREDO, C.; FIGUEREDO, T.; FREIRE, K. R. I.; SANTOS, F. A. R.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; SILVA, T. M.; PIUVEZAM, M. R. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n.1, p.41-46, September 2008.

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

MORAES, K. S.; GIUBEL, S. R.; SILVEIRA, G. F.; COMUNELLO, L.; OLIVEIRA, C. B.; GOSMANN, G.; BUFFON, A.; BRUNO, A. N. Inibição da viabilidade de células tumorais de câncer de útero humano após tratamento com extratos vegetais nativos brasileiros. In: 12ª MOSTRA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO-CIENTÍFICA DO IFRS, 2011, Porto Alegre (Resumo de iniciação científica Técnica-Científica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul) IFRS, 2011. Disponível em: http://mostratec.poa.ifrs.edu.br/2011/trabalhos/trabalhos_premiados.pdf. Prog. htm> Acesso em: 15 de abril de 2016.

MOREIRA, T. F. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae).2012. 93 f. **Dissertação** (Mestrado em ciências farmacêuticas), setor de ciências da saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná.2012.

OGUR, M.; ST. JOHN, R.; NAGAI, S. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. **Science**, v. 10, n. 3254, p.928-929, May 1957

OLIVEIRA, E.R. **O que é Medicina Popular (Coleção Primeiros Passos)**. 1ªedição. São Paulo: Editora Brasiliense, 1985.

ONG, K.C.; KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, n. 14, p. 1695-1705, August 2000.

OPEKAROVÁ, M., T. CASPARI, B. PINSON, D. BRÉTHES.; W. TANNER. Post-translational fate of CAN1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 14, n. 3, p. 215–222, February 1998.

PÁDULA, M.; SLEZAK, G.; AUFFRET VAN DER KEMP, P.; BOITEUX, S. The port-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v.17, n. 32, p. 5003-5010, September 2004.

PARK, J.S.; KIM, I. S.; REHMAN, S. U.; NA, C. S.; YOO, H. H. HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hovenia dulcis* Fruit Extracts. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 2, p. 130-135, February 2016a.

PARK, S. H; CHANG, E.Y. Antimutagenic and cytotoxic effects of *Hovenia dulcis* Thunberg. **The Korean Journal of Food and Nutrition**, v. 36, n. 11, p.1371-1376, 2007.

PARK.J. Y; MOO, J.Y; PARK, S.D; PARK, W.H; KIM, H; KIM, J.E. Fruits extracts of *Hovenia dulcis* Thunb. suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses through nuclear factor-kappa B pathway in Raw 264.7 cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 357-365, April 2016b.

PIMENTEL, A.; PUTTON, V.; WATZLAWICK, L. F.; VALÉRIO, A. F.; SAUERESSIG, D. Fitossociologia do sub-bosque do Parque Ambiental Rubens Dallegre, Irati, PR. Floresta., **Curitiba**, v. 38, n. 3, p. 479-486, Dezembro 2008.

RIBEIRO, I. G; CASTRO, T. C; GAYER, C. R. M; COELHO, M. G. P; ALBARELLO, N. Phytochemical screening of field-grown plants and in vitro tissue culture of *Hovenia dulcis* Thunb. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, v. 6, n. 2, p. 57-104, Junho 2010.

RICHARDSON, J. E. et al. A phylogenetic of Rhamnaceae using rbcl and trn-F plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 9, p.1309-1324, September 2000.

RIGATTO, P. A.; PEREIRA, J. C.; MATTOS, P. P.; SCHAITZA, E.
G. **Características físicas, químicas e anatômicas da madeira de *Hovenia dulcis***. 1ª edição. Colombo: Embrapa Florestas, 2001.

ROCHE APPLIED SCIENCE. **Cell proliferation reagent WST-1**. Disponível em: <http://www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-2/J2-2.pdf>.Prog.htm>Acesso em: 02 de Agosto de 2016.

ROSA, S. F.; LONGHI, S. J.; LUDWIG, M. P. Aspectos florísticos e fitossociológicos da Reserva Capão, Tupanciretã, RS, Brasil. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 15-25, Março 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ª Edição, New York, 1989.

SANTOS, G. S. Avaliação do efeito radio modificador da própolis em células de ovário de hamster chinês (cho-k1) e em células tumorais de próstata (pc3), irradiadas com co-60. 2011. **Dissertação** (Mestrado em tecnologia nuclear), Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

SANTOS, J. B.; SILVEIRA, T. P.; COELHO, P. S.; COSTA, O. G.; MATTA, P. M.; SILVA, M. B.; DRUMOND NETO, A.P. Interferências de plantas daninhas na cultura do quiabo. **Planta Daninha**, v.28, n.2, p. 255-262, 2010.

SCHULZ, V., HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: Aspectos Taxonômicos, Agroecológicos, Etnobotânicos e Terapêuticos**. 1ª edição. São Paulo: Diretoria da Imprensa Oficial e Editora de Santa Catarina (DIOESC), 2002.

SELLE, G. L. Guias de densidade e índices de sítios para *Hovenia dulcis* Thunberg na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Tese** (Doutorado em engenharia florestais), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SHEN, Y.; LINDEMEYER, A. K.; GONZALEZ. C.; SHAO, X. M.; SPIGELMAN, I.; OLSEN, R.W.;LIANG, J. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 390-401, January 2012.

SILVA, C. R.; ALMEIDA G. S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO A; LEITÃO A. C; DE PÁDULA. M. Influence of Ogg1 repair on the genetic stability of ccc2 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* chemically challenged with 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO). **Mutagenesis**, v. 31, n. 1, p. 107-114. January 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição. Florianópolis: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 1ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SRIVASTAVA R. K.; LOHANI M.; PANT A. B.; RAHMAN Q.; Cyto-genotoxicity of amphibole asbestos fibers in cultured human lung epithelial cell line: role of surface iron. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, n. 9, p. 575-582, June 2010.

STILLNER, F.J.; AMARAL, H.R.B.; PEDROSO, O.; TREVISAN, R. Estudo sobre a madeira da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunb.). **Roessléria**, v.5, n.2, p.361-370, 1983.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAKATA, C. S.; KUBRUSLY, F. S.; MIYAKI, C.; MENDES, I. F.; RIZZO, E. D. Susceptibility of Vero cell line to vaccine strains of the measles virus. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 28, n.3, p. 209-212, June 1994.

THOMAS, D.; SCOT, A.D.; BARBEY, R.; PÁDULA, M.; BOITEX, S. Inactivation of OGG1 increases the incidence of G. C-->T. A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. **Molecular & General Genetics**, v. 254, n.2, p.171-178, March 1997.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. **In: DRUG DELIVERY SYSTEM (Workshop Bangkok)**, Thailand, 1999.

UNIVERSIDADE DO ESTRADO DO RIO DE JANEIRO. I.G. RIBEIRO; N. ALBARELLO; M.G.P. COELHO; T.C. CASTRO. **Produção de saponinas em culturas do tipo CCC (compact callus clusters) de Hovenia dulcis Thunberg (Rhamnaceae)**.BR n. PI1020140233105, 19 setembro 2014.

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

XAVIER, C.P.; LIMA, C.F.; ROHDE. M.; PEREIRA-WILSON, C. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53

modulation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.68, n.6, p.1449-1457, 2011.

XIANG, J.; ZHU, W.; LING, S. Effects of juice and fermented vinegar from *Hovenia dulcis* peduncles on chronically alcohol-induced liver damage in mice. **Food and function**, v.3, n. 6, p. 628- 635, 2012.

YOKOMIZO, A. Y. Obtenção de antígeno viral a partir de culturas de células vero em microcarregadores poroso, 2001. **Dissertação** (Mestrado em biotecnologia), Interunidades de biotecnologia, Universidade de São Paulo, São paulo, 2001.

YOO, S. M.; MUN, S.; KIM, J. H. Recovery and pre-purification of (+)-dihydromyricetin from *Hovenia dulcis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n.3, p. 567-570, March 2006.

APÊNDICE - Preparo de meios e soluções das culturas de células de carcinoma pulmonar A549 e rim de macaco-verde (Vero).

Todos os reagentes para o cultivo das células foram das marcas Gibco, Cultilab e Invitrogen e Interlab. Todos foram preparados conforme indicação do fabricante.

Preparo do meio F12

Para o preparo do meio F12, específico para linhagem A549, ao volume de 1000mL de F12 desidratado foi adicionado 2,2 g de bicarbonato de sódio diluído e, um litro de água destilada; em seguida o pH foi ajustado, entre 7,2 e 7,4. Uma vez preparado, o meio de cultura foi filtrado e conservado em geladeira.

Preparo do meio MEM

Para o preparo do meio MEN, específico para linhagem Vero, ao volume de 1000mL de MEN desidratado foi adicionado 2,2g de bicarbonato de sódio diluído e, um litro de água destilada; em seguida o pH foi ajustado, entre 7,2 e 7,4. Uma vez preparado, o meio de cultura foi filtrado e conservado em geladeira.

Preparo do tampão PBS

O tampão PBS foi preparado da seguinte forma: ao volume de 1000mL de água destilada foi adicionado 1000g de PBS, em seguida o pH foi ajustado entre 7,2 a 7,4. Depois de preparado o PBS foi distribuído em garrafas de 250mL submetidas a esterilização por autoclave por 20 minutos, a 121°C. Após a esterilização, o PBS foi conservado em geladeira.

Preparo da tripsina–EDTA (0,1%:0,01%)

A tripsina –EDTA (0,1%:0,01%), foi preparada da seguinte forma: ao volume de 1000mL de água destilada foi adicionado 1,0g de tripsina, 100mL de base

Dulbecco, 0,1g de EDTA e vermelho de fenol. O pH da solução foi ajustado para 7,4. Em seguida a tripsina foi filtrada e conservada em geladeira.

Suplementação do meio F12 e MEN

O meio F12 e MEM, foram suplementados da seguinte forma: em 200mL de meio de cultura F12 e MEM, foram adicionados soro fetal bovino a uma concentração final de 10%, 5 mg/mL de gentamicina, 0,0025mg/mL de fungizona.

Soluções para Ensaio de Recuperação Clonogênica

As soluções para o Ensaio de recuperação clonogênica foram preparadas da seguinte maneira: ao volume de 160mL de água destilada foi adicionado 20mL de metanol e 20mL de ácido acético para a preparação da solução de fixação. Em seguida foi retirado 50,8mL da solução A (35g de KH_2PO_4 em 250mL de H_2O destilada) e 49,2mL da solução B (35,49g de Na_2HPO_4 em 250mL de H_2O destilada). Ambas as soluções foram misturadas e ao produto foi acrescentada 10mL de giemsa para obter a solução corante. O pH da solução resultante foi ajustado para 7,4.

Preparo de soluções e meios de cultura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Os meios de cultura e soluções empregadas foram preparados conforme orientações contidas em MELO; LEITÃO; PADULA (2004), PADULA et al. (2004), SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (1989), SILVA et al. (2015). Suas composições encontram-se descritas nos itens 8.2.1 a 8.2.5.

Os reagentes foram adquiridos na “Difco Laboratories” e/ou Sigma (EUA), da Reagen Quimibrás indústrias químicas S.A. e/ou Merck S.A. Industrias químicas (Brasil).

Para suspensão, lavagem por centrifugação e diluição das culturas de leveduras foi utilizada PBS estéril (MELO; LEITÃO; PADULA, 2004; SILVA et al., 2015).

Preparo da solução de glicose

A solução de glicose foi preparada adicionando-se ao volume de 500mL de água destilada, 100g de glicose. A solução foi então distribuída em frascos de 100mL e submetidos a autoclave por 20 minutos a 121°C. Após este procedimento, os frascos foram armazenados, em temperatura ambiente.

Meio de Cultura – YPG líquido

O meio de Cultura – YPG líquido foi preparado da seguinte maneira: ao volume de 900mL de água destilada foi adicionado 10g de bacto-peptona e 10g de extrato de levedura. Posteriormente foi distribuído em garrafas de 90mL, submetidas a autoclave por 20 minutos a 121°C. Após este procedimento, os frascos foram armazenados em temperatura ambiente. Antes da utilização, o meio YPG líquido foi suplementado com 10mL de solução de glicose 20%.

Meio de Cultura – YPG semi-sólido

O meio de Cultura – YPG semi-sólido foi preparado da seguinte maneira: ao volume de 900mL de água destilada foi adicionado 10g de bacto-peptona, 10g de extrato de levedura e 20 g de Agar e posteriormente submetidos a autoclave por 20 minutos a 121°C. Antes da utilização, o meio YPG, mantido a 45°C, foi suplementado com 100mL de solução de glicose 20% e, em seguida, distribuído em placas de Petri descartáveis (~20mL/placa).

Meio de Cultura – YNBD semi-sólido

O meio de cultura – YNBD semi-sólido foi preparado da seguinte maneira: no frasco 1 ao volume de 200mL de água destilada foi adicionado 7g de YNB; no frasco 2 ao volume de 500 mL de água destilada foi adicionado 20 g de ágar e no frasco 3 ao volume de 250mL foi adicionado 20g de glicose. Os três frascos foram submetidos a autoclave, por 20 minutos, a 121°C. O frasco 2 foi mantido a 45°C e os frascos 1 e 3, mantidos em temperatura ambiente. Antes da utilização, ao meio YNBD (frasco 1), foi adicionado o conteúdo dos frascos 2 e 3, ambos mantidos a 45°C. Após este procedimento, o meio YNBD semi-sólido foi suplementado com 60mg de canavanina

e com 10mL de cada uma das soluções de aminoácidos (histidina, lisina, leucina, triptofano) e base (uracil) e, em seguida, distribuído em placas de Petri descartáveis (~20mL/placa).

Soluções de aminoácidos e base para suplementar o meio de cultura YNBD-canavanina

As soluções de aminoácidos para suplementação do meio de cultura YNBD-canavanina foram preparados da seguinte forma: em cinco frascos, protegidos da luz, contendo 100ml de Água destilada foi acrescentada para cada 0,2 g de uracila (frasco 1), 2 g de histidina (frasco 2), 1 g de leucina (frasco 3), 0,4g de lisina (frasco 4), 0,2g de triptofano (frasco 5), perfazendo, cinco frascos com soluções específicas. As soluções foram submetidas à esterilização, em autoclave, por 15 minutos, a 121°C. Após este procedimento, os frascos foram armazenados em temperatura ambiente.

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

As soluções de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) foram preparadas da seguinte forma: em um frasco contendo 1000mL de água destilada foi acrescido 3,55 g de K_2HPO_4 e 14,64 g de $NAHPO_4 \cdot 12H_2O$. Posteriormente 900mL deve ser alíquota do e adicionado 1 g de ágar, e submetido a autoclave por 20 minutos a 121 ° C.

Solução de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) para detecção de colônias *petites*

As soluções de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) foram preparadas da seguinte forma: em um frasco contendo 1000mL de água destilada foi acrescido 0,355 g de K_2HPO_4 e 1,464 g de $NAHPO_4 \cdot 12H_2O$, posteriormente o frasco foi protegido da luz e submetido a autoclave por 20 minutos, a 121° C. Após esse procedimento foi acrescentado 1 g de TTC na solução e dissolvido em banho maria a 37° C