



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

Luana Brito do Nascimento de Araújo

**Estudo dos potenciais antitumoral e mutagênico das frações do extrato  
foliar de *Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae)**

Rio de Janeiro

2022

Luana Brito do Nascimento de Araújo

**Estudo dos potenciais antitumoral e mutagênico das frações do extrato foliar de *Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae)**



Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Albarello

Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Rio de Janeiro

2022

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

A663

Araújo, Luana Brito do Nascimento de.

Estudos dos potenciais antitumoral e mutagênico das frações do extrato foliar de *Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae)/ Luana Brito do Nascimento de Araújo. - 2022.

68 f. : il.

Orientador.: Flávio José da Silva Dantas

Coorientadores: Norma Albarello, André Luiz Mencialha

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

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

CDU 633.88

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

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

---

Assinatura

---

Data

Luana Brito do Nascimento de Araújo

**Estudo dos potenciais antitumoral e mutagênico das frações do extrato foliar de *Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae)**

Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 7 de fevereiro de 2022

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Sebastião José da Silva Neto  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Marco Andre Alves de Souza  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

Rio de Janeiro

2022

## **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 Iozélia, 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 prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo (*in memoriam*), pela grande oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Rádio e Foto biologia;

Ao meu orientador, prof. 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;

Aos meus coorientadores, prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Albarello e prof. Dr. André Luiz Mencialha, que muito contribuíram com suas experiências, correções e sugestões durante o trabalho.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Maria da Graça Justo Araújo por ter feito a revisão deste trabalho.

À bióloga Dra. Cláudia Ribeiro, pela amizade, incentivo, ensinamentos e discussões de resultados.

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 (*in memoriam*), pela amizade, carinho e ensinamentos, fazendo nossos almoços mais longos e divertidos.

Ao Brenno de Mendonça Nunes, por toda ajuda na parte experimental.

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

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

A Simone Simplicio pelo carinho e cuidado na limpeza dos materiais do laboratório.

Ao prof. Dr. Douglas Chaves e ao prof. Dr. Adenilson Fonseca pela viabilização de equipamentos para a condução das diferentes etapas da parte experimental.

Ao prof. 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 Foto biologia 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 Faperj pela concessão da bolsa.

## RESUMO

ARAÚJO, Luana Brito do Nascimento de. **Estudo dos potenciais antitumoral e mutagênico das frações do extrato foliar de *Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae)**. 2022. 68 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O uso de plantas é uma forma antiga de tratamento de doenças, adotada por praticamente todos os povos do mundo. *Hovenia dulcis* Thunberg é popularmente conhecida como uva-do-japão, ocorrendo naturalmente na China, Japão e Coreias. A espécie, encontrada no sul e sudeste do Brasil, apresenta atividades biológicas importantes, destacando-se a atividade anti-inflamatória, hepatoprotetora, hipoglicemiante e antineoplásica, sobre diversos tipos celulares. Este trabalho visou estudar vias de resposta relacionadas aos potenciais antioxidante, mutagênico, antitumoral e anti-inflamatório frente às frações do extrato etanólico de folhas de *H. dulcis*, indicando os componentes farmacologicamente ativos. Neste trabalho, os extratos de folhas foram preparados em etanol 95% e posteriormente particionados, usando solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* FF18733(selvagem) e CD138 (mutante) foram utilizadas como modelos biológicos neste estudo. Ambas foram avaliadas quanto à inativação celular, inibição de crescimento e mutagênese (ensaio de resistência à canavanina), e colônias *petites*. Os resultados apontam que, após o tratamento com as frações do extrato, houve uma diminuição em 50% da viabilidade celular em ambas as cepas. No ensaio de crescimento, as cepas foram expostas por 48 horas às frações do extrato de *H. dulcis*. Foi observada diminuição estatisticamente significativa em ambas as cepas quando comparadas ao controle DMSO 1%. Entretanto, no ensaio de resistência à canavanina, o extrato de *H. dulcis* se mostrou mutagênico para a cepa mutante (CD138). Nos experimentos para avaliar a perda da função mitocondrial, foi observado que as frações acetato de etila e butanol apresentaram aumento da taxa de colônias *petites* na cepa mutante (CD138). No ensaio para avaliação da atividade antitumoral, células pulmonares humanas de carcinoma (A549) foram tratadas com diferentes concentrações da fração acetato de etila e butanol, as mais tóxicas para *Saccharomyces cerevisiae*. Após o período de tratamento de 24 horas, a atividade citotóxica foi analisada pelos métodos de WST-1 e recuperação clonogênica. A dose que inibiu 50% do crescimento celular foi verificada, quando as células foram expostas ao extrato na concentração de 75 e 150 µg/mL respectivamente. Essas concentrações foram testadas na linhagem normal de rim de macaco-verde (Vero). Nesta linhagem também foi observada a diminuição na viabilidade celular, através do ensaio de WST-1, sendo essa diminuição significativamente inferior quando comparada à linhagem tumoral. Já no ensaio de recuperação clonogênica, foi observada diminuição estatisticamente significativa na capacidade mitogênica das células quando comparadas ao controle DMSO1% somente na linhagem A549, quando tratadas com as frações acetato de etila e butanol. Os estudos indicam um potencial mutagênico relatado pela primeira vez para a espécie, o que denota cuidado com o uso não seguro de seus produtos. Mas também mostra que *H. dulcis* possui características de agente com atividade antitumoral.

Palavra-chave. Planta medicinal. Atividade biológica. Linhagem A-549. Linhagem Vero. *Saccharomyces cerevisiae*. Uva-do-japão.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Luana Brito do Nascimento de. **Study of antitumor and mutagenic potentials of the leaf extract fractions of *Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae)**. 2022. 68 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The use of plants is an ancient way of treating diseases, adopted by practically all people in the world. *Hovenia dulcis* Thunberg is popularly known as Japanese grape, occurring naturally in China, Japan and the Koreas. The species, found in southern and southeastern Brazil, has important biological activities, highlighting its anti-inflammatory, hepatoprotective, hypoglycemic and antineoplastic activities on various cell types. This work aimed to study response pathways related to antioxidant, mutagenic, antitumor and anti-inflammatory potentials against the ethanol extract fractions of *H. dulcis* leaves, indicating the pharmacologically active components. In this work, leaf extracts were prepared in 95% ethanol and subsequently partitioned using increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol). *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (wild) and CD138 (mutant) strains were used as biological models in this study. Both were evaluated for cell inactivation, growth inhibition and mutagenesis (canavanin resistance assay) and petite colonies. The results show that, after treatment with the extract fractions, there was a 50% decrease in cell viability in both strains. In the growth assay, the strains were exposed for 48 hours to the *H. dulcis* extract fractions. A statistically significant decrease was observed in both strains when compared to 1% DMSO control. However, in the canavanin resistance assay, the *H. dulcis* extract was shown to be mutagenic for the mutant strain (CD138). In experiments to assess the loss of mitochondrial function, it was observed that the ethyl acetate and butanol fractions showed an increase in the rate of petite colonies in the mutant strain (CD138). In the assay to evaluate the antitumor activity, human lung carcinoma cells (A549) were treated with different concentrations of the ethyl acetate and butanol fraction, the most toxic for *Saccharomyces cerevisiae*. After the 24-hour treatment period, cytotoxic activity was analyzed by WST-1 and clonogenic recovery methods. The dose that inhibited 50% of cell growth was verified when the cells were exposed to the extract at a concentration of 75 and 150 µg/mL, respectively. These concentrations were tested in the normal green monkey kidney lineage (Vero). In this strain, a decrease in cell viability was also observed through the WST-1 assay, this decrease being significantly lower when compared to the tumor strain. In the clonogenic recovery assay, a statistically significant decrease was observed in the mitogenic capacity of cells when compared to DMSO1% control only in the A549 lineage, when treated with ethyl acetate and butanol fractions. The studies indicate a mutagenic potential for the first time reported for the species, which denotes caution with the unsafe use of its products. But also show that *H. dulcis* has characteristics of an agent with antitumor activity.

Keyword. Medicinal plant. Biological activity. Lineage A549. Vero lineage. *Saccharomyces cerevisiae*. Japanese grapefruit.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema geral simplificado da interface entre o metabolismo primário e as vias de síntese dos metabolitos secundários.....	18
Figura 2 - Aspectos morfológicos de <i>Hovenia dulcis</i> .....	22
Figura 3 - Processo de redução monoelétrica da molécula de oxigênio até a água.....	25
Figura 4 - Formação de ERO através das reações de Fenton e do ciclo Haber-Weiss.....	26
Figura 5 - Reparo por excisão de bases em humanos e em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
Tabela 1- Citotoxicidade de frações do extrato etanólico de <i>Hovenia dulcis</i> em cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	42
Tabela 2- Citotoxicidade das frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de <i>Hovenia dulcis</i> em linhagem A549.....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise cromatográfica do extrato de <i>Hovenia dulcis</i> a 280 nm.....	38
Gráfico 2 - Fração de sobrevivência de culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	40
Gráfico 3 - Fração de sobrevivência de culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	41
Gráfico 4 - Avaliação do crescimento em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138 incubadas com frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	43
Gráfico 5 - Fração de mutagênese após exposição às frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> pelas culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	44
Gráfico 6 - Avaliação da frequência de colônias <i>petites</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 incubadas com as frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	45
Gráfico 7 - Avaliação da frequência de colônias <i>petites</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> CD138 incubadas com as frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	46
Gráfico 8 - Viabilidade em culturas de células A549 tratadas com a fração acetato e etila do extrato etanólico <i>H. dulcis</i> .....	47
Gráfico 9 - Viabilidade em culturas de células A549 tratadas com a fração butanol do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	48
Gráfico 10 - Viabilidade em culturas de células VERO tratadas com a fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	49
Gráfico 11 - Viabilidade em culturas de células VERO tratadas com a fração butanol do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> .....	49
Gráfico 12 - Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células A549 tratadas com a fração acetato de etila do extrato de <i>H. dulcis</i> .....	50
Gráfico 13 - Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células A549 tratadas com a fração butanol do extrato de <i>H. dulcis</i> .....	51

Gráfico 14 - Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células VERO tratadas com a fração acetato de etila do extrato de <i>H. dulcis</i> .....	52
Gráfico 15 - Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células VERO tratadas com a fração acetato de etila do extrato de <i>H. dulcis</i> .....	52

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

8oxoG	7,8-dihidro-8oxoguanina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
CAN <sup>R</sup>	Resistente a canavanina
CO <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HRJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IC <sub>50</sub>	Concentração da amostra que inibe 50% do efeito observado
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
MtDNA	DNA mitocondrial
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
•OH	Radical hidroxila
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Tampão fosfato salino
RPM	Rotação por minuto
<i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SFB	Soro fetal bovino
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 HISTÓRICO ACERCA DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS PARA FINS MEDICINAIS .....	15
1.1 Metabólitos secundários.....	16
1.2 Família Rhamnaceae A. L. Jussieu.....	20
1.3 <i>Hovenia dulcis</i> Thunberg.....	20
1.4 Aspectos químicos e farmacológicos de <i>H. dulcis</i> .....	22
1.5 Estresse oxidativo.....	24
1.6 Reparo por Excisão de Base em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
1.7 Justificativa.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Material botânico.....	30
3.1.1 Preparo do extrato etanólico.....	30
3.1.2 Partição líquido-líquido.....	30
3.1.3 Análises de Cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
3.2 Manutenção das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FF18733 e CD138.....	31
3.2.1 Cultura celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
3.2.2 Efeito das frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> na sobrevivência das cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	32
3.2.3 Efeito das frações do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i> no crescimento das cepas de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	32
3.2.4 Avaliação da potencialidade mutagênica das frações do extrato etanólico de <i>H.</i> <i>dulcis</i> nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> .....	33
3.2.5 Teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio para análise de colônias <i>petites</i> nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> .....	34
3.3 Culturas celulares de carcinoma pulmonar (A549) e de rim de macaco-verde (VERO).....	34
3.3.1 Avaliação da citotoxicidade por WST-1.....	35

3.3.2	<u>Recuperação clonogênica</u> .....	36
3.4	<b>Análise estatística</b> .....	37
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Análise CLAE-DAD</b> .....	38
4.2	<b>Avaliação de sobrevivência com a cepa <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138</b> .....	38
4.3	<b>Avaliação do crescimento em culturas de <i>S. cerevisiae</i> das cepas FF18733 e CD138</b> .....	42
4.4	<b>Avaliação da indução de mutagênese em culturas de <i>S. cerevisiae</i> das cepas FF18733 e CD138 pelo extrato de <i>H. dulcis</i></b> .....	43
4.5	<b>Avaliação da frequência de colônias <i>petites</i> em culturas de <i>S. cerevisiae</i> FF18733 e CD138</b> .....	44
4.6	<b>Avaliação da citotoxicidade em células A549 e VERO</b> .....	46
4.6.1	<u>Viabilidade celular pelo ensaio do WST-1 em culturas de células A549 tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i></u> .....	46
4.6.2	<u>Viabilidade celular pelo ensaio com WST-1 em culturas de células VERO tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i></u> .....	48
4.7	<b>Recuperação clonogênica em linhagens celulares</b> .....	50
4.7.1	<u>Recuperação clonogênica em culturas de células A549 tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i></u> .....	50
4.7.2	<u>Recuperação clonogênica em culturas de células VERO tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de <i>H. dulcis</i></u> .....	51
5	<b>DISCUSSÃO PARCIAL</b> .....	52
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como recurso terapêutico pela população é uma cultura milenar, desde as primeiras civilizações, tendo sido por muitos anos a única alternativa utilizada para tratar diversas doenças (BADKE et al., 2011; DALLAQUA; DAMASCENO, 2011; LOPES et al., 2010; SOUZA et al., 2012; ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2012). Dessa forma, o conhecimento sobre plantas medicinais foi transmitido através dos tempos, de geração a geração, podendo-se considerar a fitoterapia como a medicina mais ancestral (BASTOS; LOPES, 2010). Extratos brutos de plantas constituíram os primeiros medicamentos usados para o alívio da dor e do sofrimento, para curar feridas e para tratar todos os tipos de doenças. O mais importante entre esses produtos naturais era o ópio, obtido da papoula (*Papaver somniferum*), que continha o poderoso analgésico morfina.

## 1 HISTÓRICO ACERCA DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS PARA FINS MEDICINAIS

A partir do início do século XIX, os químicos se dedicaram a isolar e determinar a estrutura de substâncias ativas de plantas, conhecidas e experimentadas pela sociedade daquela época. Dentre essas substâncias, podemos citar a morfina, isolada em 1803 por Seturner, a codeína em 1932 por Robiquet e a Papaverina em 1948 por Merck, todas da planta *Papaver somniferum*. Além dessas, a efedrina, isolada por Nagai em 1887, de *Ephedra Sinica*, potente broncodilatador; a atropina, usada em doenças do sistema nervoso, isolada da *Atropa Belladonae* em 1819; a salicina de *Felipendula ulmaria*, isolada em 1827-cujos efeitos também eram conhecidos através da casca do salgueiro (*Salix alba*) e a cocaína, extraída das folhas de coca (*Erithroxylum coca*) em 1860, um anestésico local que tornou possível muitas cirurgias (YUNES; CALIXTO, 2001).

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa (BRUNING et al., 2012). Com o desenvolvimento crescente da química, novas substâncias foram isoladas em laboratório e, delas, novos produtos de síntese surgiram, levando à substituição do uso das plantas pelo uso dos medicamentos sintetizados em laboratório, o que ocorreu de forma intensa nesse período (FIGUEIREDO; GURGEL; GURGEL JÚNIOR, 2014; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001), quando se consolidou a indústria farmacêutica.

Ao longo da segunda metade dos anos 70 e década de 80, houve o crescimento da chamada "medicina alternativa" e a fitoterapia teve destaque (ALVES; SILVA, 2002). Com isso, farmacêuticos, botânicos, microbiologistas, nutricionistas e químicos de produtos naturais passaram a investir em estudos na busca de novas moléculas de valor terapêutico (MAHOMOODALLY; GURIB-FAKIM; SUBRATTY, 2005). Um exemplo disso é o Paclitaxel, utilizado em neoplasias, isolado em 1971 da espécie *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971). A síntese química do paclitaxel foi conseguida primeiramente por Holton e por Nicolau em 1994; contudo, o baixo limite do rendimento combinado com a complexidade de sua biosíntese impediu de sua aplicabilidade (TABATA, 2004; KHANI et al., 2012).

As culturas celulares de plantas representam uma fonte alternativa e sustentável de paclitaxel. Algumas vantagens deste método incluem o crescimento do material que é independente de seu lugar original, impedindo que estes materiais sejam sujeitos à sazonalidade ou ao tempo. A seleção das linhagens celulares, junto com a adição de precursores e a otimização de condições da cultura são as estratégias que mostraram aumento no rendimento do paclitaxel em culturas de plantas (TABATA, 2004; KHANI et al., 2012).

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 (CAVALLAZZI; COSTA, 2003). Essas substâncias vêm despertando interesse como novas possibilidades de fármacos para o tratamento de diversas doenças (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Diante do número crescente de usuários de práticas da medicina popular, tornam-se cada vez mais importantes as pesquisas sobre plantas medicinais, principalmente no que diz respeito às suas potencialidades terapêuticas, mas também sobre seus possíveis efeitos tóxicos (PANEE, 2015; ZAHOOR et al., 2017).

### 1.1 Metabólitos Secundários

O metabolismo vegetal representa o conjunto de reações químicas que está sempre ocorrendo em cada célula. As substâncias químicas que são formadas, degradadas, ou transformadas, recebem o nome de metabólitos (SIMÕES et al., 2010) que, por sua vez, podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os metabólitos secundários, também denominados de especiais, podem ser definidos como moléculas orgânicas produzidas pelo vegetal, que não têm função direta nas reações do metabolismo basal, tais como: fotossíntese, respiração, transporte celular, translocação, assimilação de nutrientes ou síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos. Os metabólitos secundários são característicos de um determinado grupo de plantas, enquanto os metabólitos primários são produzidos por todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2017). O reino vegetal fabrica mais de 200.000 substâncias químicas distintas, muitas das quais surgem do metabolismo especializado (PYNE; NARCROSS; MARTIN, 2019). Apesar da grande diversidade, todas essas substâncias produzidas são sintetizadas a partir de quatro vias metabólicas principais (figura 1): via do acetato-malonato, via acetato-mevalonato, via do metileritritol fosfato e a via do ácido chiquímico. Em todas essas vias, os seus precursores são provenientes do metabolismo primário, ou seja, aquele conjunto de reações ligado aos processos vitais. Os precursores mais importantes para a biossíntese dos metabólitos secundários são: a acetil coenzima A, o ácido chiquímico, o ácido mevalônico e o metileritritol fosfato (DEWICK, 2009).

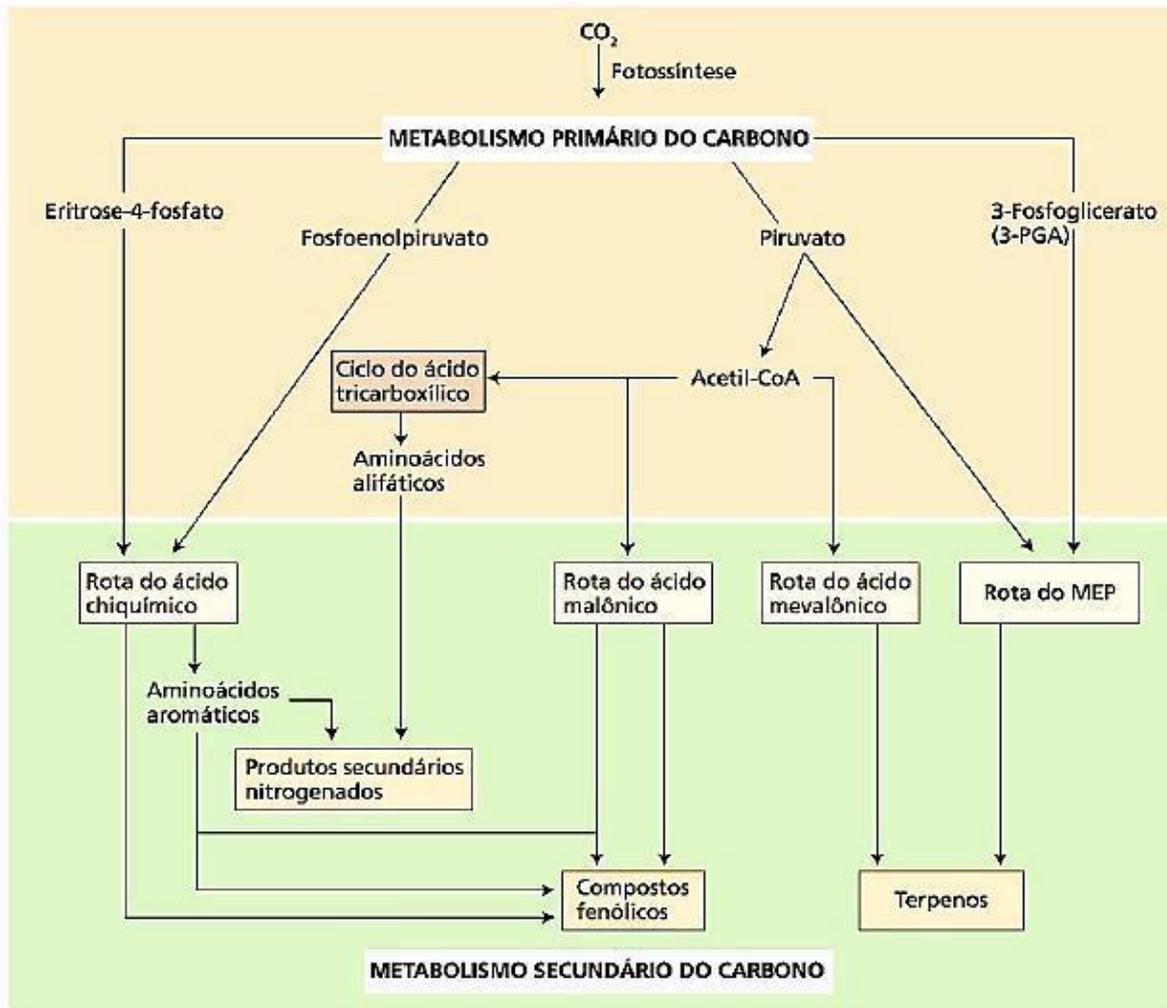
As substâncias envolvidas no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios,

carboidratos e da clorofila (SIMÕES et al., 2010). Já os metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades e diferem dos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disto, são conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando mais difícil seu isolamento e purificação. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero e espécie botânica pode ser responsável pela síntese de uma categoria química característica e, por vezes, pode ser utilizada como característica taxonômica na classificação das plantas (THRANE, 2001., WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Além disso, muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas importantes nos vegetais, como por exemplo: proteção contra os herbívoros e infecção por micro-organismos patogênicos; atuação como atrativos (odor, cor ou sabor) para animais polinizadores e dispersores de sementes; atuação como agentes na competição planta-planta e nas simbioses plantas-micro-organismos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Acrescida às respostas a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas, ou fatores abióticos, como temperatura, umidade, raios UV e deficiência de nutrientes minerais (ALVES, 2001; PERES, 2004; SIMÕES et al., 2010).

Os fatores que podem influenciar o conteúdo dos metabólitos secundários podem variar desde a época em que uma planta é coletada até o estágio de desenvolvimento da planta. A quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo o ano (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000). Existem também há outros fatores importantes, como as condições de coleta e a estabilização e estocagem dos metabólitos, que podem ter grande influência na qualidade, e, conseqüentemente, no valor terapêutico de preparados fitoterápicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: substâncias fenólicas, terpenos e substâncias nitrogenadas, com ênfase nos alcaloides (Figura 1) (SIMOES, 2010). As substâncias fenólicas são derivadas do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma), ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitorreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004).

Figura 1 - Esquema geral simplificado da interface entre o metabolismo primário e as vias de síntese dos metabolitos secundários



Fonte: TAIZ; ZEIGER, 2013.

Através das vias acetato-mevalonato (ou do ácido mevalônico) e metileritritol fosfato (MEP) são produzidas as substâncias referidas como terpenos (também chamados de isoprenoides). Essas substâncias são formadas pela união de unidades pentacarbonadas (C5) chamadas de isoprenos, sendo agrupadas de acordo com o número dessas unidades na molécula: hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoide (C15), diterpenoides (C20), triterpenoides (C30) e tetraterpenoides (C40) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os terpenos são a maior classe de metabólitos secundários de plantas, compreendendo mais de 50.000 produtos naturais (CONNOLLY E HILL, 1991). Alguns terpenos apresentam funções no crescimento e desenvolvimento vegetal, como é o caso da giberelina, um diterpeno (TAIZ; ZEIGER, 2013).

As substâncias fenólicas, também conhecidas como polifenóis, constituem um grupo quimicamente heterogêneo com aproximadamente 10.000 estruturas identificadas, e largamente distribuídas. Essas substâncias apresentam, como modelo estrutural básico, um

grupo fenol, constituído por um anel aromático hidroxilado. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese das substâncias fenólicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. A rota do ácido chiquímico participa da biossíntese da maioria das substâncias fenólicas vegetais. A rota do ácido malônico, embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos expressiva nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os polifenóis apresentam ampla diversidade estrutural, sendo agrupados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química básica, entre elas: ácidos fenólicos e flavonoides. Os ácidos fenólicos constituem os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, geralmente são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular. Os principais flavonoides apresentam cinco subclasses: antocianidinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e flavononas (MARTINS et al., 2016; LIU et al., 2015; SILVA et al., 2016b).

Os ácidos fenólicos e flavonoides são antioxidantes naturais capazes de inibir ou reduzir a ação de radicais livres. Evidências indicam que os radicais livres participam na patologia de diversas doenças, como: doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes, uma vez que aumentam o estresse oxidativo, e potencialmente, podem danificar moléculas biológicas, tais como proteínas, hidratos de carbonos, lipídios e DNA (ALVES et al., 2013; BORLINGHAUS et al., 2014; CAROCHO et al 2013; FINOCHIARO et al., 2010; IRONDI et al., 2015; KUMAR et al., 2013; SHAO et al 2014; TAOFIQ et al., 2015).

Os alcaloides são metabólitos de baixo peso molecular contendo um ou mais átomos de nitrogênio dispostos como aminas primárias, secundárias e terciárias, conferindo a essas substâncias, um caráter básico. A maioria dos alcaloides é sintetizada a partir de aminoácidos, sendo os principais: ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histina, podendo haver incorporação às estruturas de porções provenientes de outras vias, como acetato-malonato, chiquimato e acetato-mavalonato (TAIZ; ZEIGER, 2017). São exemplos de alcaloides, derivados de aminoácidos: os pirrolidínicos, derivados da ornitina; peperidínicos, derivados da lisina; quinolínicos, derivados do ácido antranílico; isoquinolínicos, derivados da tirosina, e os indólicos, derviados do triptofano. (CROTEAU et al, 2000; DEWICK, 2009).

São conhecidos cerca de 20.000 alcaloides naturais, muitos dos quais exibem função: analgésica (morfina), estimulante (cafeína e efedrina), psicotrópica (mescalina e cocaína), antibacteriana (sanguinarina), anticâncer (vimblastina e vincristina), antitussígena (codeína), anti-inflamatória (berberina), antiespasmódicas (papaverina) ou antimaláricas (quinino)

(PYNE; NARCROSS; MARTIN, 2019), constituindo-se de grande interesse para humanos, devido às suas propriedades medicinais.

O conteúdo total dessas substâncias sofre variações temporais e espaciais, assim como as suas proporções relativas (sazonais e diários; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da produção dessas substâncias estarem sob controle genético, a expressão pode sofrer modulações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (DARROW; BOWERS, 1997; GOBBONETO; LOPES, 2007; HARTMANN, 1996; ZAYNAB et al, 2018).

Estudos fotoquímicos demonstram a presença de diversos metabólitos secundários na família Rhamnaceae, dentre eles, os alcaloides ciclopeptídicos (MISSAU, 2003), saponinas (YU; WANG; HU, 2014), terpenoides (GUO et al., 2009), e flavonoides (LI et al., 2013).

## 1.2 Família Rhamnaceae A. L. Jussieu

A família Rhamnaceae compreende aproximadamente 58 gêneros e 900 espécies de distribuição cosmopolita, incluindo arbustos, árvores, ervas, liana, trepadeiras e subarbustos (RICHARDSON et al., 2000; REFLORA, 2020). 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 14 gêneros na família, que são: *Alvimiantha* Crey-Wilson, *Ampelozizyphus* Ducke, *Colletia* Comm. ex Juss., *Colubrina* Rich ex Brongn., *Condalia* Cav., *Crumenaria* Mart., *Discaria* Hook., *Frangula* Reisseki, *Gouania* Jacq., *Hovenia* Thunb. *Reissekia* Endl., *Rhamnidium* Reissek, *Rhamnus* L., *Scutia* (Comm. ex DC) Brongn., *Zizyphus* Mill. É uma família pouco representada no Brasil, com 51 espécies, duas subespécies e uma variedade, mas que possui ocorrência geográfica em todas as regiões do Brasil (REFLORA, 2020).

## 1.3 *Hovenia dulcis* Thunberg

*Hovenia dulcis* Thunb. é uma árvore decídua, amplamente utilizada como suplemento alimentar e importante na medicina tradicional da China, Japão e Coréias (WANG et al., 2013; HYUN et al., 2010), onde ocorre naturalmente entre 25° e 41° N e 100° e 142° L (RIGATTO

et al., 2001). Segundo Lim (2013), ocorre também em florestas montanhosas do norte da Tailândia e do Vietnã, até altitudes acima de 2.000 metros.

No Brasil, a espécie é conhecida popularmente por uva-do-Japão (PR), banana-do-Japão (SC), caju-do-Japão (RJ), pau-doce (MG) e Chico-magro ou mata-fome (SP).

Segundo Carvalho (1994), a espécie foi introduzida no Brasil quando a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária recebeu da Academia Chinesa de Florestas, sementes de *H. dulcis* de duas localidades da antiga República Popular da China, para fins ornamentais e de reflorestamento. *H. dulcis* vem sendo cultivada na Argentina, Uruguai, Paraguai e no sul do Brasil, de forma isolada ou em pequenos povoamentos, principalmente nas regiões de clima temperado úmido com verão quente (Cfa), clima temperado úmido com verão temperado (Cfb) e clima temperado úmido com inverno seco e verão quente (Cwa), segundo a classificação de Köppen (RIGATTO et al., 2001).

No Brasil, a espécie ocorre com grande intensidade na Floresta Ombrófila Mista, 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).

Em relação aos caracteres botânicos, *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, com a parte interna esbranquiçada (Figura 2).

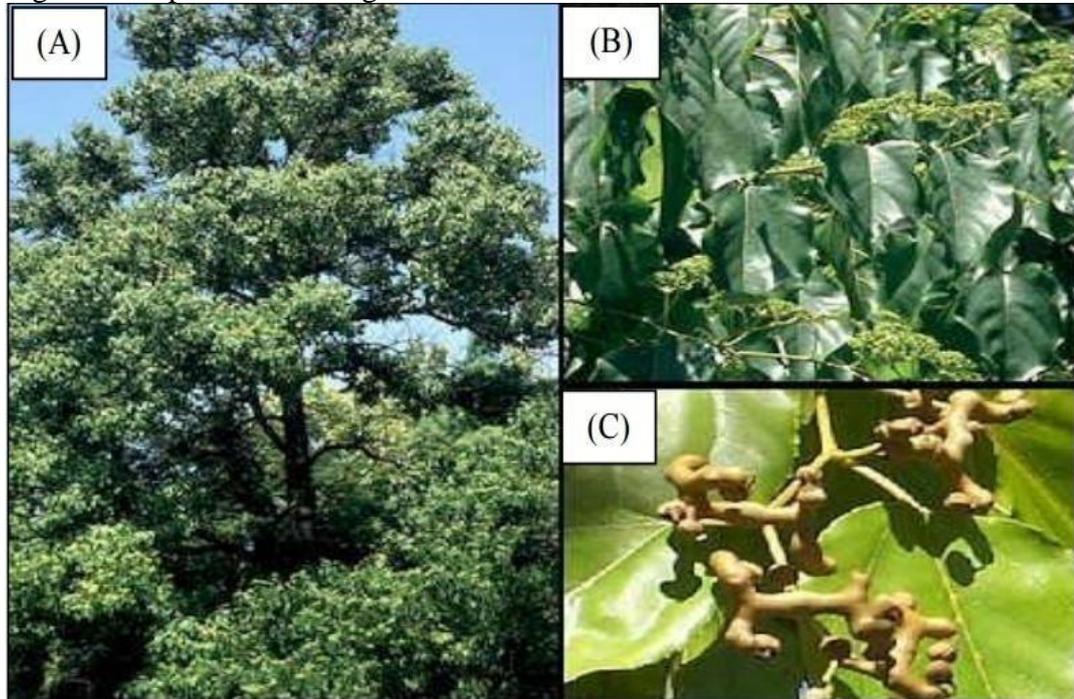
O fruto consiste em uma pequena cápsula globosa seca com 2 a 4 sementes, preso a um pedúnculo carnoso de cor de canela, com sabor doce e agradável, rico em sacarose, tendo a polpa um aroma idêntico ao da pêra, podendo ser consumido *in natura*, como uvas passas, ou ainda usado para fazer vinagres ou geleias (HYUN et al., 2010).

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

Sobre o potencial medicinal da espécie, já foram descritas várias atividades biológicas, de produtos oriundos de vários órgãos da planta (YANG; WU; LI., 2013; NA et al., 2013; JI et al., 2002; LI et al., 2005; HASE et al., 1997). Recentemente, vários estudos revelaram que o

extrato de *H. dulcis* contém uma variedade de substâncias de ação farmacológica (PARK et al., 2016a; KANG et al., 2017).

Figura 2- Aspectos morfológicos de *Hovenia dulcis*



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

#### 1.4 Aspectos Químicos e Farmacológicos de *H. dulcis*

Já foram descritos constituintes químicos de *H. dulcis* tais como flavonoides, incluindo kaempferol, apigenina, miricetina, quercetina, ampelopsina, além de antraquinonas, emodina (WANG et al, 2013; PARK et al., 2016a) e triterpenos (KANG et al., 2017).

O extrato aquoso de sementes foi eficaz no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica e da hiperlipidemia, atuando na redução dos níveis de lipídios hepáticos induzidos por ácido oleico, em ratos e em linhagem de hepatocarcinoma humano (HEPG2), via ativação de AMPK e PPAR $\alpha$ /CPT-1, melhorando a atividade antioxidante (KIM et al., 2017).

O suco e o vinagre fermentado de seus pedúnculos foram testados em ratos com lesão hepática induzida por etanol. O seu uso levou à diminuição do estresse oxidativo, causado pelo etanol, revertendo a hepatomegalia (XIANG; ZHU; LING., 2012).

Polissacarídeos extraídos de frutos de *Hovenia dulcis*, usando a técnica de extração assistida por ultrassom de alta pressão, exibiram atividade hipoglicemiante através da inibição das enzimas alfa-glucosidase e alfa amilase e, conseqüentemente, a diminuição dos níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos. O mesmo também foi capaz de exibir uma atividade antioxidante em 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), na eliminação de radicais hidroxila e na atividade de quelação de  $Fe^{2+}$ . (YANG et al., 2019).

O extrato etanólico dos frutos exerceu função anti-inflamatória, através da inibição da fosforilação de  $I\kappa B\alpha$  e inibição da translocação nuclear  $NF-\kappa B$ , em macrófagos RAW 264.7, induzidos por lipopolissacarídeos (PARK et al., 2016b). Na concentração de  $120\mu g/mL$ , este extrato foi capaz de inibir 25% do crescimento de macrófagos RAW 264.7 (PARK et al., 2016b).

Em outro trabalho, o extrato aquoso de ramos inibiu a secreção de  $\beta$ -hexosaminidase, liberação de histamina, produção de prostaglandina E2 e citocinas inflamatórias pela linhagem celular 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).

A exposição de *Giardia lamblia* à fração diclorometano do extrato metanólico de folhas, 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. Em resumo, a fração diclorometano tem fortes efeitos anti-giardial (GADELHA et al., 2005).

O extrato etanólico de ramos, inibiu a angiogênese de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) em ensaios *in vitro* e suprimiu a proliferação induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), migração, invasão e formação de tubo de HUVECs em doses sub-tóxicas. Além disso, este mesmo extrato inibiu significativamente a angiogênese *in vivo* da membrana corioalantóide do crescimento de embriões de galinha sem exibir citotoxicidade (HAN; LIM; HYE; JUNG, 2017) e foi capaz de reduzir não apenas a sinalização do receptor de VEGF 2 (VEGFR2) nas HUVECs, mas também a expressão do fator induzível por hipóxia (HIF) -1 $\alpha$  na linhagem de hepatocarcinoma HepG2 (HAN; LIM; JUNG., 2017).

O potencial antitumoral de extratos de folhas de *H. dulcis* foi observado pela primeira vez em culturas de células BW (timona de camundongo), onde foi observado um percentual de inibição de crescimento de 64,5% pelo extrato etanólico e 73,8% pelo extrato metanólico extraído das folhas de *H. dulcis*, na concentração de  $250\mu g/mL$  (CASTRO et al., 2002).

PARK e CHANG (2007) mostraram inibição do crescimento de células da linhagem de hepatocarcinoma humano (HEPG2) em 76% e do adenocarcinoma de cólon humano (linhagem HT29) em 80%, quando tratadas com a fração clorofórmica do extrato metanólico de folhas, na concentração de 100 µg/mL.

Estudos com a fração dietil éter do extrato etanólico da casca da árvore mostraram uma inibição de 50% do crescimento de células de hepatocarcinoma humano (Hep3B) na concentração de 250 µg/mL e de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) na concentração de 100 µg/mL (HYUN et al., 2010).

O extrato etanólico de folhas de *H. dulcis* foi capaz de inibir o crescimento celular e a atividade mitogênica da linhagem de adenocarcinoma de pulmão A549 na concentração de 250 µg/mL. No estudo, também foi possível constatar que este extrato foi capaz de induzir lesões oxidativas, detectadas na cepa mutante CD138 ( $\Delta$ OGG1) de *Saccharomyces cerevisiae*, na concentração de 100 µg/mL (ARAÚJO, 2017).

No Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, estudos fitoquímicos e do potencial medicinal da espécie têm sido realizados com materiais produzidos *in vitro* (Ribeiro et al. 2010; Ribeiro et al., 2015). Além desses, outro estudo visando à conservação *in vitro* de *H. dulcis* por criopreservação, também foi realizado, considerando a sua importância medicinal e maior ciclo de crescimento, por se tratar de uma espécie arbórea (Saavedra et al., 2021).

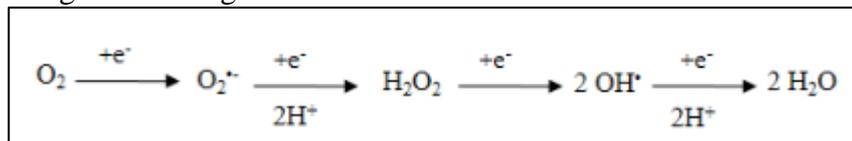
## 1.5 Estresse Oxidativo

Nas últimas décadas tem sido dada grande atenção ao papel biológico das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), moléculas muito reativas que são formadas durante o metabolismo do oxigênio.

Os organismos aeróbicos utilizam o oxigênio para produzir energia a partir de transformação da glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ). Nesse processo são geradas 38 moléculas de adenosina trifosfato (ATP), enquanto que em sistema anaeróbico a produção é de apenas duas moléculas. Essa diferença se deve ao fato de que, em aerobiose, há aproveitamento máximo de energia produzida durante as reações de oxi-redução, que transformam a glicose em água ( $H_2O$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (FRIDOVICH, 1998; EMEIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004).

Nos organismos aeróbicos, o  $O_2$  é reduzido a  $H_2O$  em reação catalisada pela enzima citocromo C oxidase, presente nas mitocôndrias, responsável pela maioria das oxidações intracelulares, levando à redução de cerca de 95% do  $O_2$ , mediante a captura de quatro elétrons e interação com átomo de hidrogênio, originando moléculas de água (Figura 3). Devido à sua configuração eletrônica, exibindo dois elétrons não emparelhados, o  $O_2$  tende a receber um elétron de cada vez (redução monoelétrica), formando as seguintes espécies intermediárias: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )—e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ). Essas espécies são denominadas genericamente como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (FRIDOVICH, 1998; EMEIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004).

Figura 3- Processo de redução monoelétrica da molécula de oxigênio até a água.

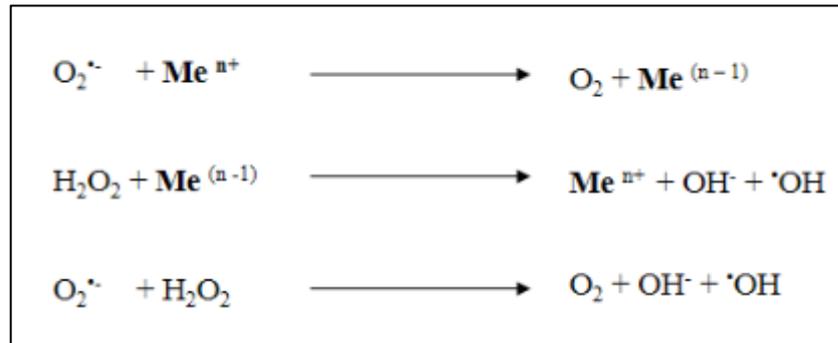


Fonte: Adaptado de LEITAO, 2013.

Apesar de as ERO desempenharem importante papel na resposta imunológica e resposta inflamatória, estas moléculas podem causar danos em células e tecidos durante infecções e várias patologias, tais como doenças cardiovasculares, artrite, enfisema pulmonar, doenças neurodegenerativas (esclerose, síndrome de Menkes, doença de Wilson, Mal de Alzheimer, encefalopatia espongioforme neural, Mal de Parkinson e doença de Huntington), catarata, diabetes, envelhecimento e câncer (EMEIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004).

A participação dos metais de transição da reação de Fenton / Ciclo de Heber-Weiss pode potencializar a formação dessas ERO (Figura 4). Os íons metálicos apresentam uma ação catalítica nas reações que levam a lesões oxidativas no organismo. O  $\cdot OH$  pode formar-se a partir do  $O_2^{\cdot-}$  e do  $H_2O_2$  através das reações de Fenton e do Ciclo Heber-Weiss (VALKI et al., 2007).

Figura 4- Formação de ERO através das reações de Fenton e do ciclo Haber-Weiss.



Fonte: Adaptado de LEITAO, 2013.

As ERO podem ter seus efeitos diminuídos e/ou abolidos na presença de agentes antioxidantes, tais como quelantes de íons metálicos que participam da reação de Fenton (neocuproína, dipiridil, desferral), catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e vitaminas (GUPTA; SAHA; GIRI, 2002; POWELL, SWENBERG, RUSYN, 2005; LEITÃO, 2013).

Sob condições *in vivo*, os antioxidantes não enzimáticos podem atuar de diversas formas: elevando os níveis das enzimas antioxidantes, por exemplo, supra regulando a expressão de genes que codificam para a superóxido dismutase (SOD), catalase ou glutathione peroxidase; sequestrando as ERO, por mecanismos que podem envolver a transferência de um átomo de hidrogênio ou por atividade redutora, isto é, por transferência de elétrons com produção de produtos de baixa reatividade; pela capacidade de quelação de metais, envolvidos nas reações de Fenton; pela inibição de enzimas oxidantes, ou seja, enzimas que geram espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, a xantina oxidase ou as ciclooxigenases (MAGALHÃES et al., 2008).

Assim, para o equilíbrio celular, é necessária a ação de aceptores e enzimas antioxidantes que reduzem a quantidade de ERO no ambiente intracelular assim como mecanismos de reparação de lesões de DNA formadas por estes agentes. Normalmente lesões no DNA causadas por EROs são corrigidas pelo mecanismo de reparo de DNA por excisão de bases (BER). Nas células aeróbicas temos sempre um equilíbrio delicado entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes celulares. Caso este balanço tenda para uma maior produção de ERO do que das defesas antioxidantes, ocorrerá uma situação denominada estresse oxidativo (MENCK; SLUYS, 2017), o qual é responsável por várias das doenças anteriormente mencionadas.

## 1.6 Reparo por Excisão de Base em *Saccharomyces cerevisiae*

As células possuem estratégias para combater especificamente lesões oxidativas no DNA. Uma delas é baseada em mecanismos enzimáticos de reparo de DNA, o reparo por excisão de bases (BER), que é capaz de eliminar danos causados à estrutura do DNA. Na etapa inicial do reparo, as DNA-glicosilases são responsáveis por realizar a hidrólise da ligação glicosídica entre a base e o esqueleto desoxirribose, gerando sítios apurínicos ou apirimidínicos (sítio AP) (KROKAN; BJORA, 2013).

Cinco DNA glicosilases estão presentes em leveduras: *ung1* e *mag1* (enzimas monofuncionais que catalisam a clivagem da ligação glicosídica) e *ntg1*, *ntg2* e *ogg1* (DNA glicosilase/AP liase que catalisa a clivagem da ligação N-glicosídica e corta o esqueleto fosfodiéster em sítios AP).

Em *S. cerevisiae*, o gene *OGG1*, que codifica a proteína DNA glicosilase *ogg1*, de 376 aminoácidos e peso molecular de 43 kDa, participa do BER catalisando a remoção das lesões 8-OxoG (7,8-dihidro-8oxoguanina) e Fapy (2,6-diamino-4-hidroxi-5-(metil)formamidopirimidina) do DNA. Apesar de não apresentar homologia na sequência, a proteína *ogg1* é uma homóloga funcional da proteína *fpg* bacteriana (THOMAS et AL., 1997). Entretanto, *ogg1* de levedura apresenta elevada homologia de sequência com a *ogg1* humana, inclusive compartilhando os mesmos substratos (RADICELLA et al., 1997).

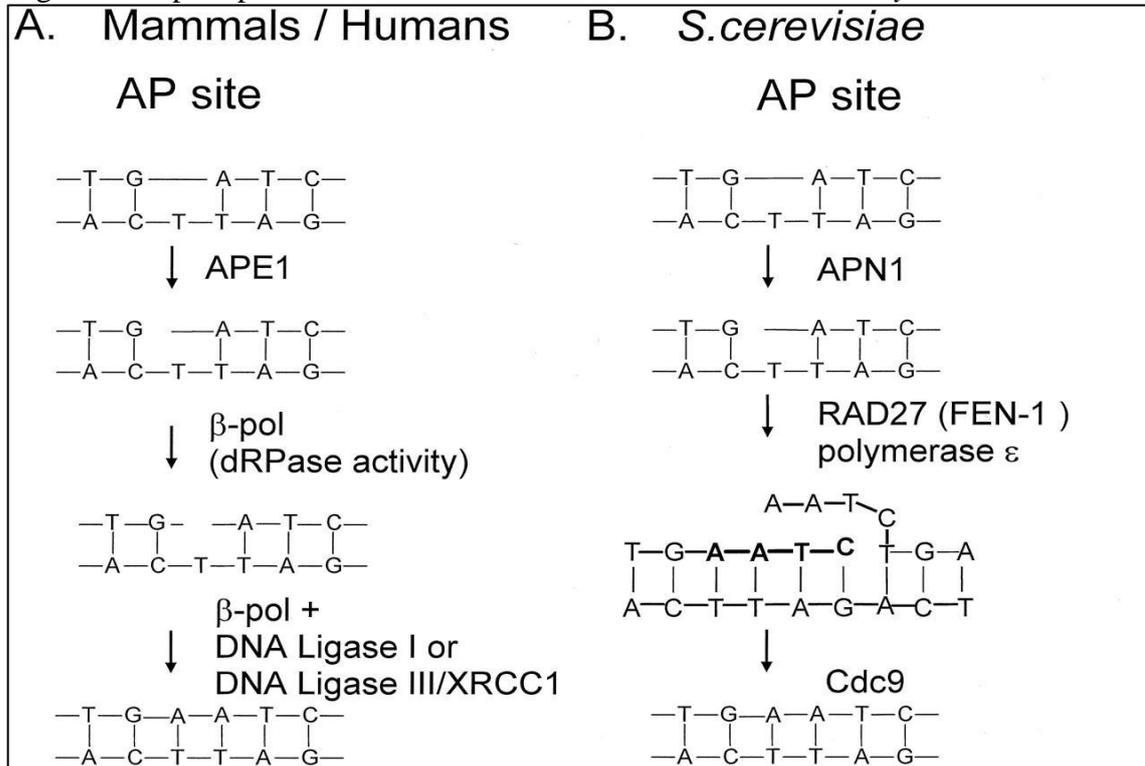
O gene *OGG1* não é essencial para a viabilidade celular, mas a proteína *ogg1* de levedura está profundamente relacionada com a remoção de lesões oxidativas e a *ogg1* mutante apresenta acúmulo espontâneo de transversões GC-TA, que também podem ser induzidas pela ação de agentes oxidantes (BOITEUX; ROBERTSON, 2013).

O sítio AP gerado pela proteína *ogg1*, é substrato para as proteínas *apn1* ou *apn2*, que fazem a clivagem do sítio abásico e geração de terminais 3'-OH e 5'-dRP. *Apn1* e *apn2* cortam o esqueleto no lado 5' do sítio AP gerando 5' desoxirribose que é removido pela endonuclease *rad27*. Finalmente, o intervalo é preenchido pela DNA polimerase<sup>TM</sup> o esqueleto é selado pela DNA ligase 1 (CDC9) (BOITEUX; ROBERTSON, 2013). *ogg1* está presente no núcleo e nas mitocôndrias e desempenha um papel importante na manutenção do DNA mitocondrial, bem como no DNA nuclear.

Em humanos o processo é semelhante só que quem faz o corte do esqueleto no lado 5' AP é a enzima APE1. Gerando um resíduo 5' desoxirribose que é removido pela atividade dRPase da B-pol. Esta polimerase preenche o intervalo; que em seguida, é selado pela DNA pol I (BOITEUX; ROBERTSON, 2013).

Abaixo, temos a comparação do reparo por excisão de bases entre células humanas e da levedura *S. cerevisiae*, aonde podemos ver grandes semelhanças entre as etapas deste reparo (Figura 5).

Figura 5- Reparo por excisão de bases em humanos e em *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: KELLY; WOY; WILSON, 2003

### 1.7 Justificativa

Embora os potenciais citotóxico, mutagênico e antitumoral já tenham sido indicados na literatura para extratos de *H. dulcis*, essas atividades ainda não foram elucidadas para frações do extrato etanólico de folhas dessa espécie. Além disso, espécies vegetais de uso popular demandam estudos sobre ações deletérias ao ambiente celular, considerando os riscos para a saúde humana. Dessa forma, torna-se relevante avaliar a atividade citotóxica em eucariotos, assim como o possível potencial mutagênico de frações do extrato etanólico de folhas de *H. dulcis*, que poderão ser explorados como fonte de fármacos com atividade antitumoral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar os potenciais citotóxico, mutagênico e antitumoral frente às frações do extrato etanólico de folhas de *Hovenia dulcis* Thunb, indicando os componentes farmacologicamente ativos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar análises fitoquímicas do extrato etanólico.
- Determinar o efeito citotóxico, induzido pelas frações do extrato, através de curva de sobrevivência em *S. cerevisiae* FF18733 (selvagem) e CD138 (deficiente em BER);
- Verificar a influência das frações do extrato no crescimento de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138;
- Determinar a potencialidade mutagênica, induzida pelas frações do extrato, em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, através do ensaio de mutagênese pelo sistema de resistência à canavanina;
- Determinar alterações mitocondriais, induzidas pelas frações do extrato, em *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, pela análise do aumento na frequência de colônias petites;
- Analisar a atividade citotóxica das frações do extrato nas linhagens de carcinoma pulmonar (A549) e de rim de macaco-verde (VERO), através das metodologias de WST-1 e recuperação clonogênica;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Botânico

Ramos de um indivíduo arbóreo localizado nas dependências do clube dos médicos no município de Petrópolis, RJ (22°30'01.1"S 43°13'32.8"W), foram coletados no mês de agosto de 2017. Exemplares da planta matriz encontram-se depositados e registrados no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob registro HRJ – 12818.

##### 3.1.1 Preparo do extrato etanólico

Folhas frescas de *H. dulcis* (peso fresco = 1826 g) foram lavadas com água corrente e secas em estufa (45° C) por 24 horas. Após secagem em estufa, o material seco resultante pesou 532 g. O material seco foi macerado e imerso em álcool etílico 95% por dois dias e filtrado em papel Whatman (n° 1). O filtrado foi separado e armazenado, recebendo adição de álcool etílico a 95% por duas semanas. Posteriormente, todo o filtrado foi submetido à evaporação rotatória a 40°C, resultando em um resíduo de 26 g de extrato etanólico bruto.

##### 3.1.2 Partição líquido-líquido

O resíduo do extrato etanólico bruto (5,5 g) foi dissolvido em água destilada. A solução foi colocada em funil de separação, onde também foi adicionado n-hexano 1: 1 (v / v) e, após agitação vigorosa e separação das duas fases, a fração hexano foi isolada. Este procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, o extrato aquoso residual foi fracionado com solventes orgânicos de polaridade crescente - diclorometano (1: 1), acetato de etila (1: 1) e n-butanol (1: 1) - de forma semelhante à descrita para o hexano. Posteriormente, todas as frações foram submetidas à evaporação rotatória a 40°C, resultando em um resíduo de 1,30g (fração hexano), 1,18g (fração diclorometano), 0,29g (fração acetato de etila), 0,87g (fração butanol).

##### 3.1.3 Análises de Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises qualitativas HPLC-DAD foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20AT com um detector de comprimento de onda SPD-M20A de matriz de diodo, usando uma coluna de fase reversa Luna Phenomenex C-18 (3 µm, 150 mm, 4 mm). A fase

móvel consistia em água ajustada a pH 3,0 com ácido fórmico 0,1% (eluente A) e metanol (eluente B). A corrida cromatográfica do extrato etanólico bruto de *H. dulcis* foi executada por 55 minutos a 1 mL / min, com a absorbância sendo monitorada entre 200 - 600 nm. O gradiente utilizado na análise cromatográfica foi o mesmo descrito em Chaves et al., 2011. O fluxo de eluição foi de 1 mL / min. A amostra do extrato de *H. dulcis* (10 mg) foi dissolvida em água ultrapura (1 mL), ultra-sonicada (30 min) e filtrada em filtro Millipore (0,45 µm). O volume de injeção foi de 20 µL.

### 3.2 Manutenção das Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 e CD138

Foram utilizadas para este estudo as cepas de levedura *S. cerevisiae* FF18733 (MATa, *leu* 2-3-112, *trp1*-289, *his* 7-2, *ura3*-52, *lys1*-1) (HEUDE; FABRE, 1993) e CD138 (FF18733 com *ogg1* Δ:TRP1) (THOMAS et al., 1997).

As cepas FF18733 e CD138 foram mantidas em estoque, contendo as culturas na fase estacionária, em glicerol estéril 87% (MERCK) na proporção de 1:1, a -70 °C, sendo ambas renovadas a cada 12 meses.

#### 3.2.1 Cultura celular de *S. cerevisiae*

Inicialmente, 1 mL da cultura do estoque a -70°C foi transferido para *erlenmeyers* contendo 45 mL de meio YPG líquido (1% de extrato de levedura, 1% bacto peptona e 2% de glicose), durante 48 horas, a 28°C e mantidas sob agitação 16xG, até alcançarem a fase estacionária (~10<sup>8</sup> células/ mL).

Para a realização dos experimentos, foram realizadas 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 da cultura foi medida no comprimento de onda 600nm (DO<sub>600nm</sub>), e o número de células viáveis foi determinado (DO<sub>600nm</sub>= 1, corresponde a ~10<sup>7</sup> células/ml). As células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2 a 7,4) centrifugadas durante 10 minutos a 600xG, 20°C, e ressuspensas em PBS (pH 7,2 a 7,4).

### 3.2.2 Efeito das frações do extrato etanólico de *H. dulcis* na sobrevivência das cepas de *S. cerevisiae*

A atividade citotóxica foi avaliada após a incubação das culturas celulares em PBS (pH 7,2 a 7,4) com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de folhas de *H. dulcis* (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µg/mL), e também com controles negativos (DMSO 1% e PBS), e com o controle positivo 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO). Este agente genotóxico e mutagênico foi utilizado na concentração de 1 µg/mL (FRONZA et al., 1992), a 28°C, sob agitação constante por 60 minutos. Após este período, alíquotas foram retiradas, diluídas ( $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) e semeadas em placas contendo meio YPG semi-sólido (1% de extrato de levedura, 1% bacto peptona, 2% de glicose e 2% de Agar). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 28° C, ao abrigo da luz por 48 horas. Posteriormente, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) (SILVA et al., 2016a). Uma vez obtido o número de sobreviventes para o tempo zero e 60 minutos, as frações de sobrevivência ( $FS = N/N_0$ ) foram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis após o tempo de tratamento (N), pelo número de células viáveis no tempo zero ( $N_0$ ).

### 3.2.3 Efeito das frações do extrato etanólico de *H. dulcis* no crescimento das culturas de *S. cerevisiae*

Neste ensaio objetivou-se verificar se as frações do extrato etanólico de *H. dulcis* interferem no crescimento normalmente observado das culturas de *S. Cerevisiae* FF18733 e CD138. Após a obtenção das culturas na fase estacionária de crescimento (ver item 3.2.1), foram feitas novas culturas, na proporção de 1:100 em meio YPG líquido estéril, o qual foi mantido a 28°C, sob agitação, por 48 horas. Foi realizada a leitura da densidade óptica e, em seguida, a suspensão celular foi diluída em 1:10, sendo centrifugada posteriormente, e ressuspensa em meio de cultura para que os experimentos fossem realizados na concentração inicial de  $10^3$  células/ mL. Cada tubo contendo  $10^3$  células/ mL foi incubado com a dose correspondente ao  $IC_{50}$ , respectiva de cada fração testada: hexano (125µg/mL), diclorometano (100µg/mL), acetato de etila (50µg/mL) e butanol (150µg/mL) na cepa FF18733; e, na cepa CD138, hexano (100µg/mL), diclorometano (50µg/mL), acetato de etila (12,5µg/mL) e butanol (50µg/mL); ou com os controles. As amostras foram submetidas à agitação (16xG), por 48 horas, a 28°C. Para a realização da curva de crescimento, alíquotas foram retiradas nos tempos 0 e 48 horas, diluídas e semeadas em placas contendo meio YPG semi-sólido; sendo incubadas

por mais 48 horas a 28° C, para crescimento das colônias, contagem e construção do gráfico de crescimento celular.

#### 3.2.4 Avaliação da potencialidade mutagênica das frações do extrato etanólico de *H. dulcis* nas culturas de *S. cerevisiae*

A cepa de levedura *S. cerevisiae* contém o gene *CAN1*, que torna esta cepa sensível a um aminoácido análogo da arginina. Este aminoácido foi isolado da leguminosa *Canavalia ensiformis*, na forma de L-canavanina, cuja ação principal é um potente efeito inibidor do crescimento de muitos microrganismos, incluindo *S. cerevisiae* (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979).

A célula produzindo a arginina permease 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, deixará de produzir a arginina permease, e não será permitida a entrada da L-canavanina, fazendo com que ocorra crescimento celular após alguns dias de incubação (BROACH; STRATHERN; HICKS, 1979; WHELAN; GOCKE; MANNEY, 1979).

Para a avaliação da capacidade mutagênica das frações do extrato na cultura de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, as células foram tratadas com as frações do extrato (IC<sub>50</sub>), hexano (125µg/mL), diclorometano (100µg/mL), acetato de etila (50µg/mL) e butanol (150µg/mL) na cepa FF18733, e na cepa CD138 hexano (100µg/mL), diclorometano (50µg/mL), acetato de etila (12,5µg/mL) e butanol (50µg/mL), em PBS estéril. Depois das 48 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL (~10<sup>7</sup> células/mL) de cada tubo, centrifugadas e ressuspensas em 250µL de PBS, para facilitar a semeadura em placas de Petri contendo meio YNBD semi-sólido (0,7% YNB, 2% de glicose, 2 % Agar), 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.

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

### 3.2.5 Teste do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio para análise de colônias *petites* nas culturas de *S. cerevisiae*

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-trifeniltetrazolol (TTC). Neste teste, através da diferença de coloração, colônias que perderam a função mitocondrial, chamadas *petites* (apresentam cor branca) foram distinguidas daquelas que apresentaram seu metabolismo respiratório intacto (apresentam cor vermelha) (CHEN; CLARK-WALKER, 2000; OGUR; ST. JOHN; NAGAI, 1957).

As culturas ( $10^7$  células/mL) de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, foram tratadas em PBS com as frações do extrato ( $IC_{50}$ ), hexano (125 $\mu$ g/mL), diclorometano (100 $\mu$ g/ mL), acetato de etila (50 $\mu$ g/mL) e butanol (150 $\mu$ g/mL) para a cepa FF18733, e na cepa CD138, hexano (100 $\mu$ g/mL), diclorometano (50 $\mu$ g/mL), acetato de etila (12,5 $\mu$ g/mL) e butanol (50 $\mu$ g/mL), ou não, e foram semeadas em placas de Petri contendo YPG semi-sólido, incubadas a 28°C. Após 5 dias, as UFC foram contadas e, logo em seguida, foi vertido 6 mL de tampão fosfato com ágar (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 apresentaram cor branca, foram contadas.

### 3.3 **Culturas Celulares de Carcinoma Pulmonar (A549) e de 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 Dra. Alessandra Saliba do Departamento de Microbiologia, imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ (FCM/UERJ). Para os ensaios, 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 em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> acrescido de 5mL de meio F12 no caso das culturas celulares A549 e 5 mL 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 em uma estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, por 24 horas. No dia seguinte foi feita a troca do meio de cultura. Para as passagens de células, as garrafas foram lavadas duas vezes com 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 em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> 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 e centrifugadas a 37°C, 200xG por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio F12 ou MEM. Na sequência, a suspensão foi contada em câmara de Neubauer e  $1 \times 10^6$  células foram distribuídas em novas garrafas de cultura, as quais eram mantidas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C (American Type Culture Collection - ATCC, 2019), com três passagens semanais.

### 3.3.1 Avaliação da citotoxicidade por 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 *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 cm<sup>2</sup>, as células foram submetidas ao tratamento com tripsina e uma alíquota (10 µL) foi retirada e diluída, 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 densidade inicial foi de  $1 \times 10^4$  células por poço, acrescidos de 150 µL de meio completo. A cultura foi então incubada a 37°C em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, para adesão celular, por 48 horas. Após esse período, foi feito o tratamento com as diferentes concentrações das frações acetato de etila e butanol do extrato de *H. dulcis* (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µg/mL), com exceção das células não tratadas, ao qual era adicionado apenas meio de cultura. A Doxorrubicina (10nM) dissolvida em DMSO 1%, foi utilizada como controle positivo, por ser um fármaco amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos (KIM, 2010).

Na sequência, as células foram novamente incubadas em estufa por 24 horas em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente foi acrescentada a solução de WST-1 e as placas foram levadas à estufa por 30 minutos. Logo após, essas 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 (Roche Applied Science, 2017). A fim de comprovar se 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 IC<sub>50</sub> (dose que inibe 50% do crescimento celular) do extrato nas

culturas celulares neoplásicas A549, essa concentração foi testada nas culturas celulares VERO, obedecendo ao mesmo protocolo, com exceção do meio de cultivo, para a VERO foi utilizado o meio MEM. Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

### 3.3.2 Recuperação clonogênica

Para a avaliação do potencial antitumoral das frações do extrato de *H. dulcis*, as células foram submetidas ao tratamento com tripsina, posteriormente foram transferidas para o tubo cônico e centrifugadas a 200xG, 37°C, por 10 minutos. Posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer com o corante de azul de tripan (0,4%), para determinação das células viáveis. Em seguida, as células foram depositadas em placas de 24 poços, onde a concentração inicial foi de  $1 \times 10^5$  células por poço, acrescidas de 500  $\mu$ L de meio de cultura. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para adesão celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, a 37°C e incubadas com a concentração de IC<sub>50</sub> das frações do extrato de folhas de *H. dulcis*, ou o controle positivo Doxorrubicina a 10nM, ou DMSO 1%, e, em seguida, foi feita a determinação da viabilidade celular com azul de tripan, pelo qual as células mortas são permeáveis ao corante devido à perda de seletividade da membrana celular, e as células íntegras, excluem o corante, não adquirindo nenhuma coloração. Logo após a contagem, 300 células viáveis foram incubadas na estufa, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por dez dias, em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com meio de cultura completo. No quinto dia, o meio de cultura foi retirado e acrescentou-se 5 mL de meio. Logo após esse período, o meio foi vertido e as células foram lavadas, duas vezes, com PBS, a 37°C. Em seguida, foram adicionados em cada garrafa 5 mL de solução de fixação (metanol, ácido acético e água destilada na proporção de 1:1:8), por 30 minutos. Posteriormente, a solução de fixação foi descartada, sendo adicionados 5mL de solução corante, [10mL Giemsa e 200mL tampão fosfato [(50,8mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(solução A) + 49,2mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (solução B)], pH 7,4 nas garrafas por 30 minutos. Subsequentemente, a solução corante foi descartada e as garrafas foram mantidas à temperatura ambiente por 24 horas, para a total evaporação da solução corante. Em seguida foi realizada a contagem dos aglomerados celulares com o auxílio de uma lupa (SANTOS, 2011). Foram realizados quatro experimentos independentes em triplicata. Através deste ensaio, avaliou-se a capacidade mitogênica celular, 10 dias após o tratamento. Este é um ensaio *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula crescer e se tornar uma colônia, detectando assim morte celular reprodutiva, um efeito biológico mais amplo (FRANKEN et al., 2006).

### 3.4 Análise Estatística

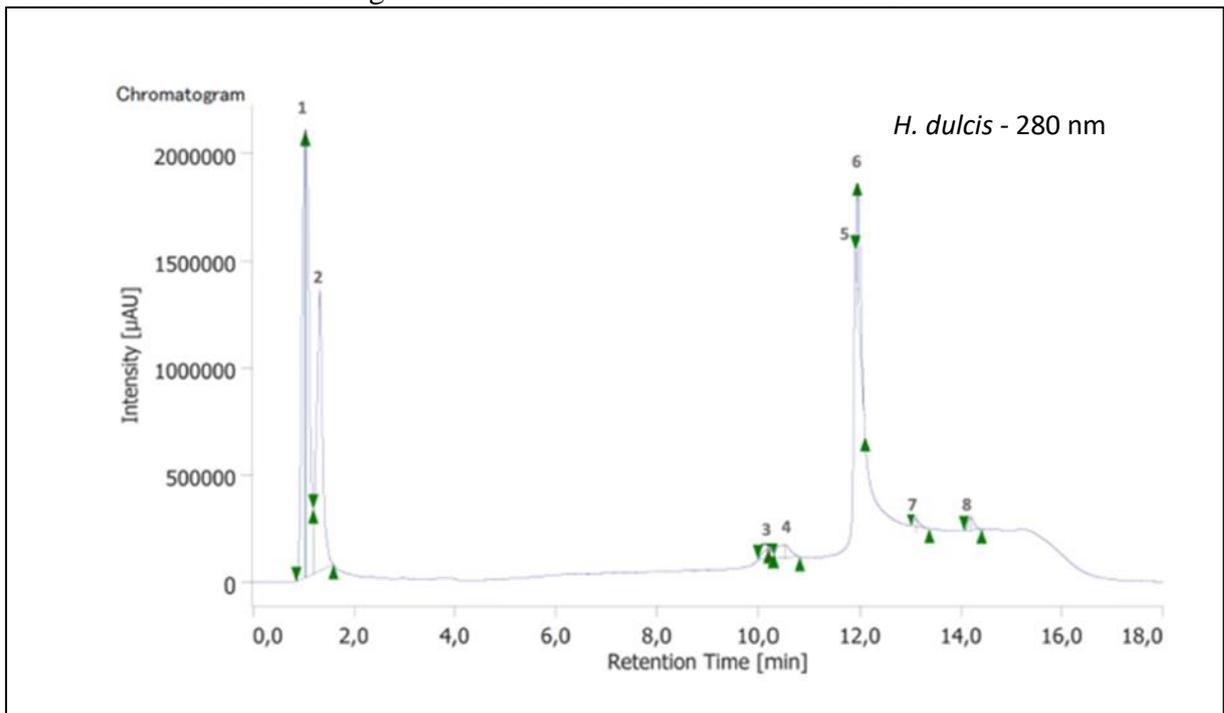
Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A análise estatística, em cada um dos ensaios experimentais, foi realizada pela utilização do programa GraphpadInStat 4.0©, adotando-se um nível de certeza de 95%. Os dados obtidos foram testados quanto à sua normalidade através do teste de kolmogorov-smirnov e, em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA *oneway*), para comparar mais de duas amostras, e o pós teste de comparações múltiplas de Tukey. A concentração da amostra que inibe 50% do efeito observado (IC<sub>50</sub>) foi determinada usando a equação linear ( $y = ax + b$ ) pelo pacote de software Excel® Office 97. Em seguida, o programa criou uma linha de tendência e foram selecionados os itens: exibir a equação no gráfico e exibir o valor R-quadrado no gráfico (coeficiente de correlação). Então, usando um valor de  $y = 0,5$ , calculamos o valor de  $x$  (dose correspondente ao IC<sub>50</sub>).

## 4. RESULTADOS PARCIAIS

### 4.1 Análise CLAE-DAD

A análise cromatográfica por CLAE-DAD permitiu a identificação de oito sinais bem definidos, que parecem estar relacionados a substâncias fenólicas. As substâncias com RT = 1,03 (1,  $\lambda_{\max}$  259 e 290 nm) e 1,32 min (2,  $\lambda_{\max}$  259 e 290 nm) possuem correspondência com o ácido protocatecuico e seus derivados. As substâncias RT = 11,93 (5) e 11,95min (6) devem ser relacionados a outras substâncias fenólicas derivadas dos ácidos cinâmico ou benzóico; e as substâncias-com RT = 10,50 (3-4), 13,09 (7) e 14,19min (8) parecem ser substâncias derivadas de catequina e / ou epicatequina (gráfico 1).

Gráfico 1 – Análise cromatográfica do extrato de *Hovenia dulcis* a 280 nm.



Legenda: 1- ácido protocatecuico, 2 – derivado do ácido protocatecuico, 3, 4, 7 e 8 derivados de catequina e / ou epicatequina. 5 e 6 - Derivados do ácido cinâmico ou benzóico.

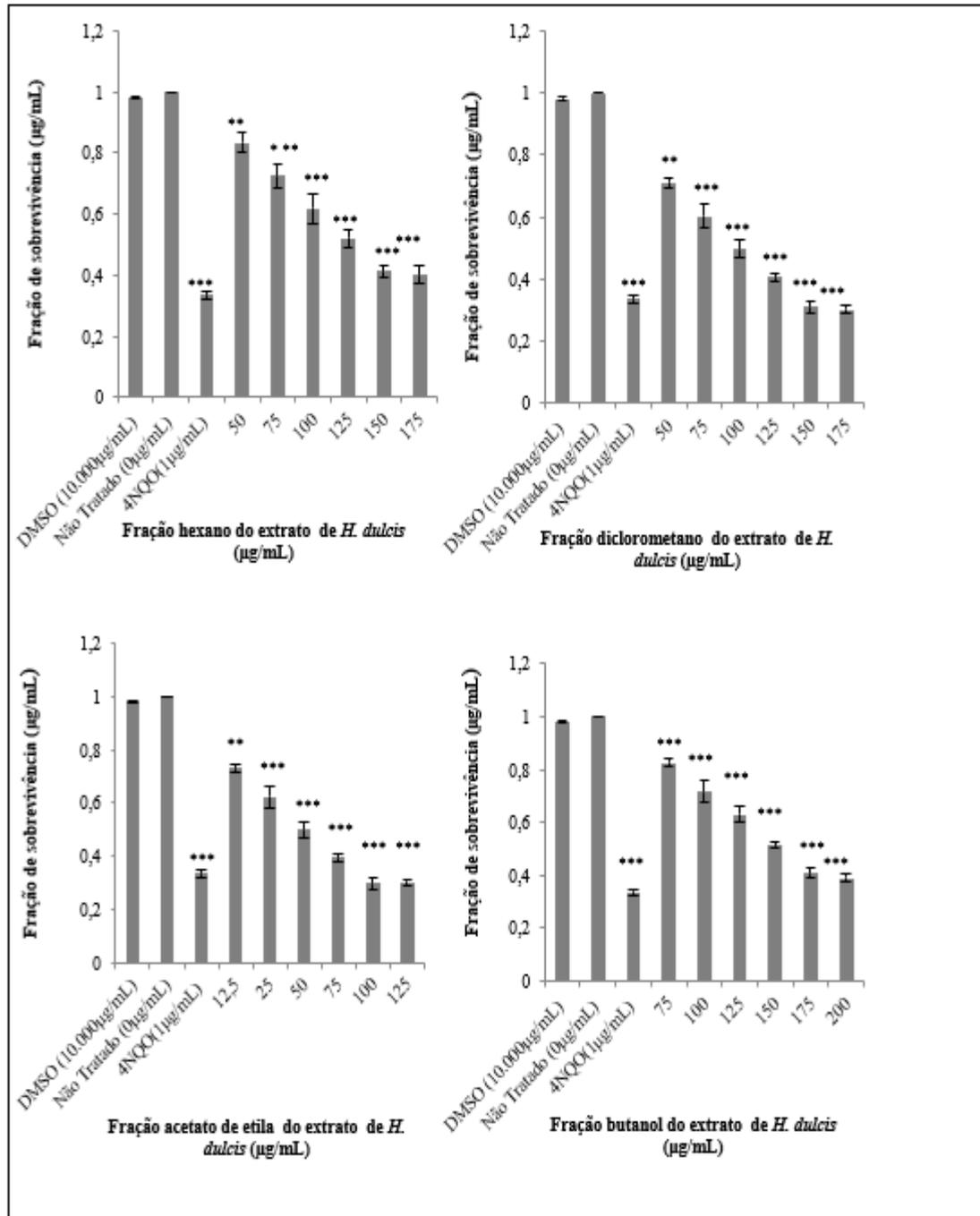
Fonte: Aautora, 2022.

### 4.2 Avaliação de Sobrevivência com a Cepa *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

Foi possível comprovar, através da fração de sobrevivência em culturas de *S. cerevisiae* das cepas FF18733 e CD138, a inativação celular estatisticamente significativa (\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ) (gráfico 2 e 3). Este resultado foi observado após 60 minutos de tratamento com as diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de *H. dulcis*, quando comparadas

às culturas tratadas com DMSO (10.000 µg/mL). A concentração IC<sub>50</sub> foi determinada para cada fração testada. Na cepa FF18733: Hexano (125 µg/mL), diclorometano (100 µg/mL), acetato de etila (50 µg/mL) e butanol (150 µg/mL), e na cepa CD138: Hexano (100 µg/mL), diclorometano (50 µg/mL), acetato de etila (12,5 µg/mL) e butanol (50 µg/mL). A Tabela 1 apresenta os dados estatísticos da IC<sub>50</sub> das frações estudadas, permitindo a comparação entre os resultados. A fração acetato de etila apresentou maior potencial citotóxico, com valores de IC<sub>50</sub> calculados de 58,05±0,057 µg / mL para a cepa FF18733 e 19,405 µg/mL para a cepa mutante CD138.

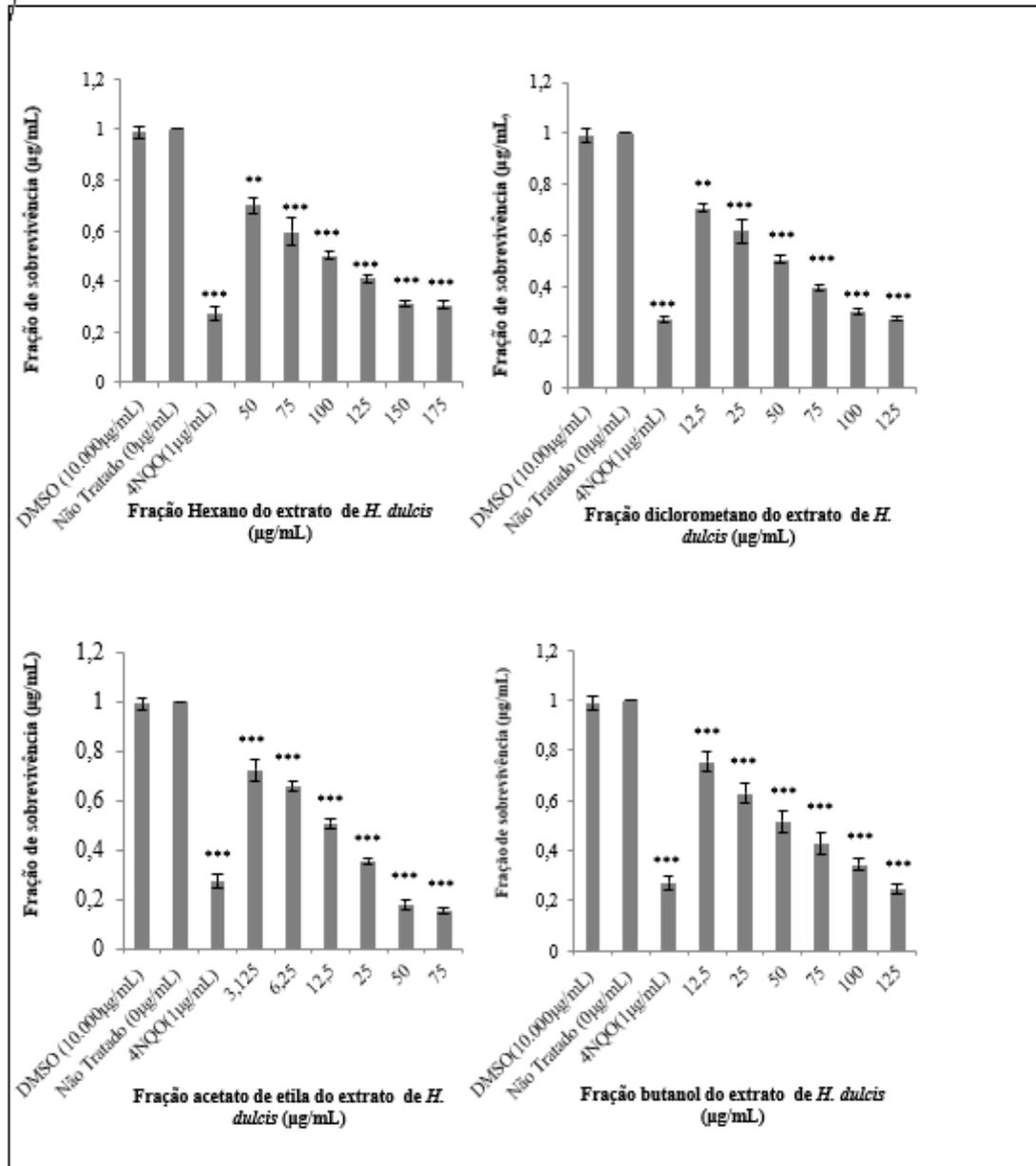
Gráfico 2 – Fração de sobrevivência de culturas de *S. cerevisiae* FF18733 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* FF18733 tratadas com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de *H. dulcis* e com o controle positivo 4NQX (1 µg/mL) durante 60 minutos, a 28° C. \*\*( $p < 0,01$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ) com relação ao controle (10.000 µg/mL). Dados obtidos de 3 experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 3 – Fração de sobrevivência de culturas de *S. cerevisiae* CD138 submetidas ao tratamento com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* CD138 tratadas com diferentes concentrações das frações do extrato etanólico de *H. dulcis* e com o controle positivo 4NQO (1 µg/mL) durante 60 minutos, a 28° C. \*\* (p < 0,01) \*\*\* (p < 0,001) com relação ao controle (10.000 µg/mL). Dados obtidos de 3 experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 1 – Citotoxicidade de frações do extrato etanólico de *Hovenia dulcis* em cepas de *S. cerevisiae*

Cepas	Frações	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	R <sup>2</sup>	Intervalo de confiança 95%
FF18733	Hexano	134,351±0,057	0,973	134,294 - 134,408
	Diclorometano	104,029±0,043	0,968	103,986 - 104,073
	Acetato de etila	58,05±0,057	0,930	57,993 - 58,107
	Butanol	158,94±0,024	0,977	158,934 - 158,958
CD138	Hexano	104,818±0,035	0,968	104,783 - 104,853
	Diclorometano	56,128±0,035	0,966	56,093 - 56,163
	Acetato de etila	19,405±0,039	0,868	19,366 - 19,444
	Butanol	61,905±0,080	0,974	61,824 - 61,985

Legenda: IC<sub>50</sub> - Concentração que inibe 50%.  
R<sup>2</sup> - coeficiente de correlação.

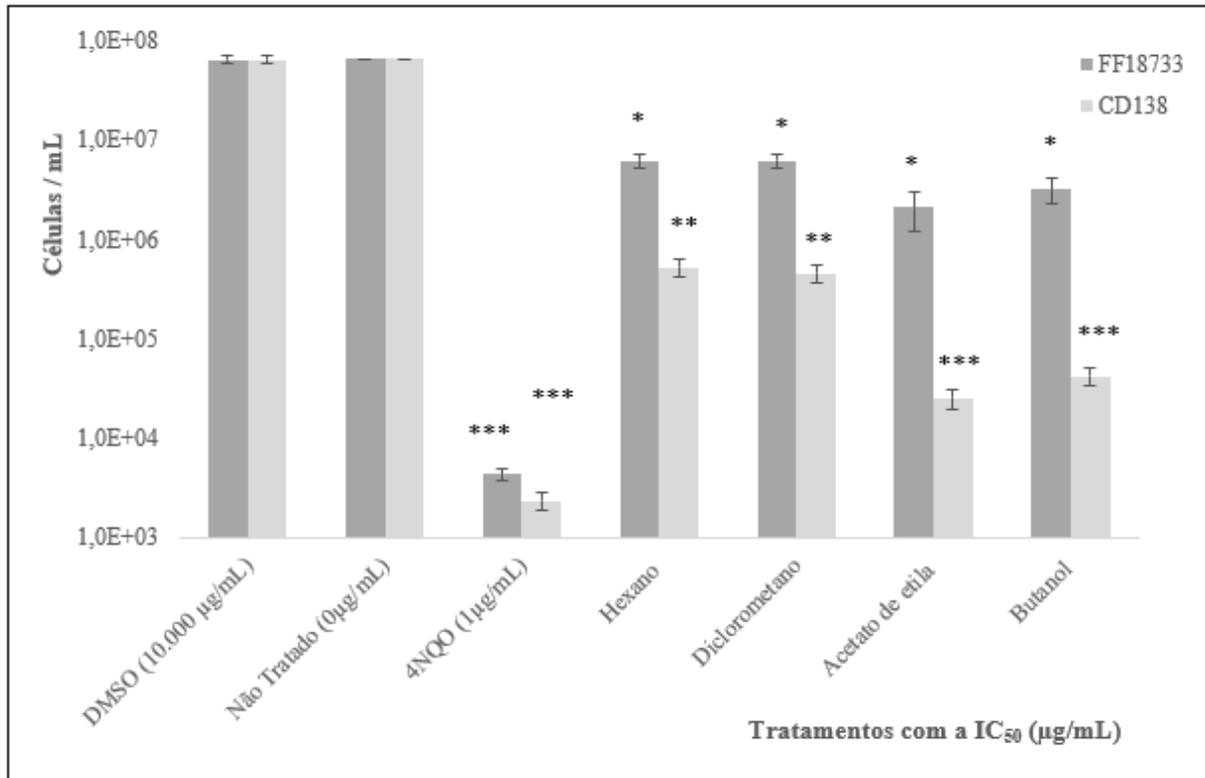
Fonte: A autora, 2022.

#### 4.3 Avaliação do Crescimento em Culturas de *S. cerevisiae* das Cepas FF18733 e CD138

As concentrações determinadas das frações do extrato etanólico de *H. dulcis* que inibem 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138 (gráfico 2 e 3) foram utilizadas para avaliar o efeito no crescimento das culturas, quando comparadas aos controles DMSO (10.000 µg/mL) e 4NQO (1µg/mL).

No gráfico 4, encontram-se os dados obtidos nos experimentos de crescimento em culturas de *S. Cerevisiae* incubadas com as frações do extrato. Com base nesses resultados, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa (\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0, 001) na taxa de crescimento das culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138, tratadas com as frações do extrato (IC<sub>50</sub>), quando comparada ao DMSO (10.000 µg/mL).

Gráfico 4 – Avaliação do crescimento em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138 incubadas com frações do extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* (~10<sup>3</sup>cells/mL) incubadas em meio YPG líquido sob agitação, com frações do extrato etanólico de *H. dulcis* (IC<sub>50</sub>) por 48 horas. \*(p<0,05) \*\*(p<0,01) \*\*\* (p< 0,001) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL). Dados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

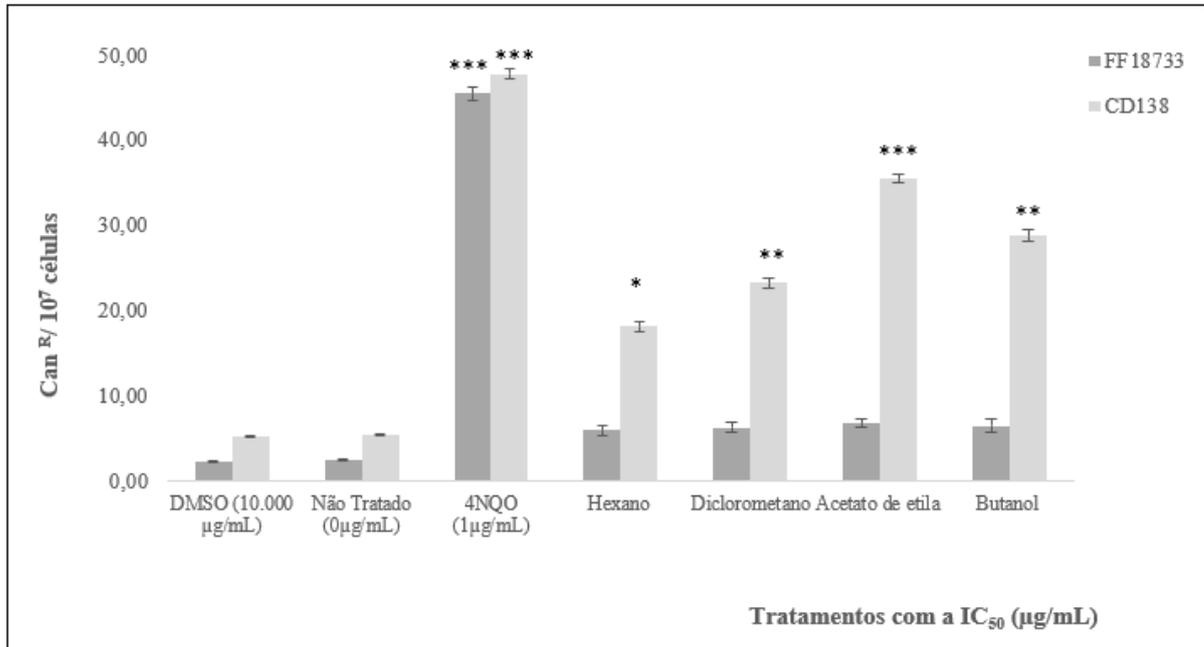
#### 4.4 Avaliação da Indução de Mutagênese em Culturas de *S. cerevisiae* das Cepas FF18733 e CD138 pelo Extrato de *H. dulcis*

Nos ensaios de viabilidade celular, foram determinadas as concentrações das frações do extrato etanólico de *H. dulcis*, que inibem 50% do crescimento (IC<sub>50</sub>) de culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138 (gráfico 2 e 3). Essas concentrações foram utilizadas para os ensaios de avaliação do potencial mutagênico.

No gráfico 5, encontram-se os dados obtidos nos experimentos de mutagênese, após a incubação das culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138 com as frações em estudo. Com base nesses resultados, foi possível comprovar na cepa FF18733, que não houve um aumento estatisticamente significativo (p>0,05) do número de mutantes induzidos, quando tratados com as frações do extrato. Resultados diferentes ocorreram na mutante CD138, onde as frações testadas foram capazes de aumentar o número de mutantes CAN<sup>R</sup> \*(p<0,05) \*\*(p<0,01) \*\*\*

( $p < 0,001$ ). Os resultados obtidos foram comparados com o DMSO (10.000  $\mu\text{g/mL}$ ), que não induz mutagênese.

Gráfico 5 – Fração de mutagênese após exposição às frações do extrato etanólico de *H. dulcis* pelas culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138



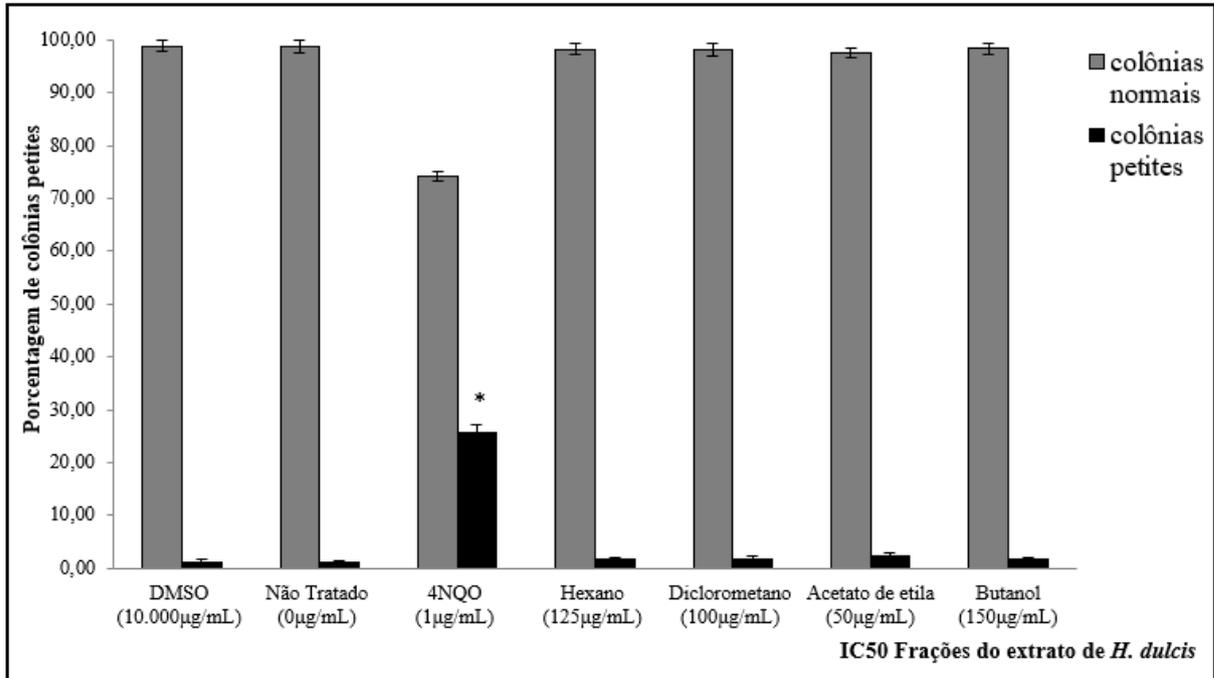
Legenda: Culturas de *S. cerevisiae* (~10<sup>3</sup> cells/mL) incubadas em meio YPG líquido sob agitação, com frações do extrato etanólico de *H. dulcis* (IC<sub>50</sub>) por 48 horas. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $p < 0,01$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ) com relação ao controle DMSO (10.000  $\mu\text{g/mL}$ ). Dados de três experimentos independentes

Fonte: A autora, 2022.

#### 4.5 Avaliação da Frequência de Colônias *petites* em Culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138

A alteração da função mitocondrial foi analisada, pela frequência de colônias *petites*, em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 e CD138. A incubação com as frações do extrato etanólico de *H. dulcis* no IC<sub>50</sub>, não induziu o aumento estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) de colônias *petites* na cepa FF18733. Na mutante CD138, as frações acetato de etila e Butanol foram capazes de induzir o aumento ( $p < 0,05$ ) do número de colônias *petites*, como pode ser observado nos gráficos 6 e 7. Neste estudo, os resultados obtidos foram comparados com o controle DMSO (10.000  $\mu\text{g/mL}$ ).

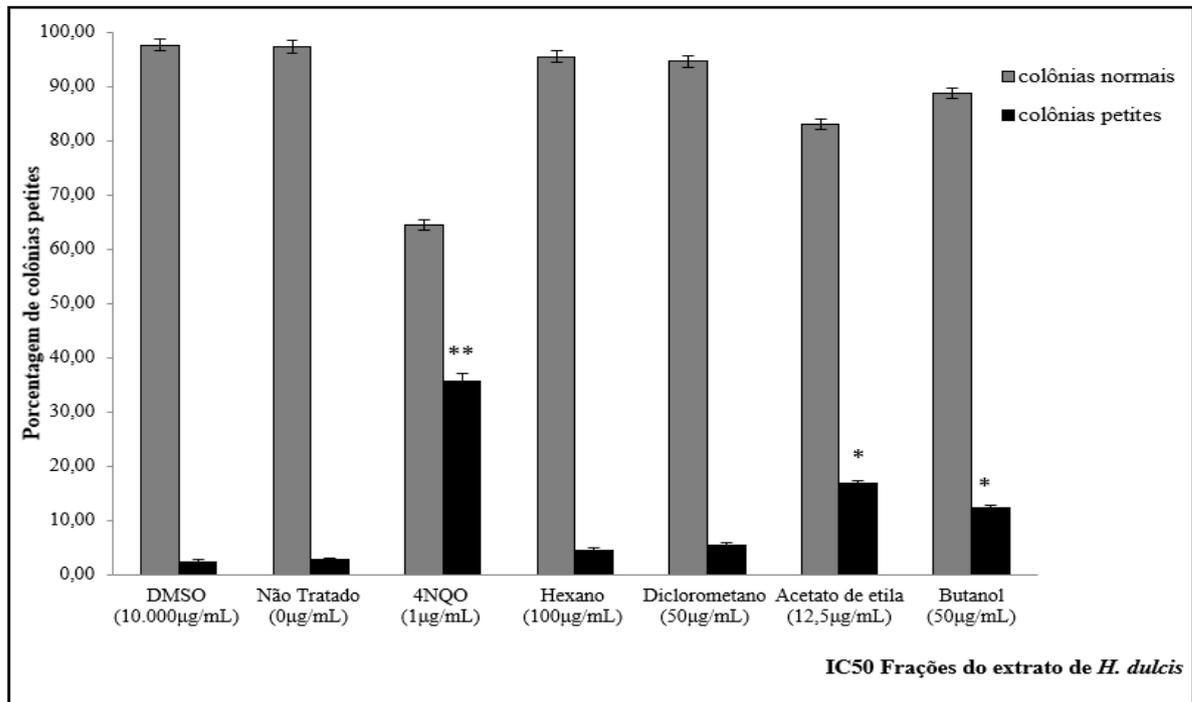
Gráfico 6 – Avaliação da frequência de colônias *petites* em culturas de *S. cerevisiae* FF18733 incubadas com as frações do extrato etanólico de *H. dulcis*



Legenda: Avaliação realizada pelo ensaio de coloração TTC em culturas de *S. cerevisiae* FF18733, após 60 minutos de incubação com as frações do extrato etanólico de *H. dulcis* na IC<sub>50</sub>. Os resultados expressam o percentual de colônias *petites* induzidas pelo extrato etanólico de *H. dulcis*. \*(p < 0,05) com relação ao controle (10.000 µg/mL). Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 7 – Avaliação da frequência de colônias *petites* em culturas de *S. cerevisiae* CD138 incubadas com as frações do 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  $IC_{50}$  das frações do extrato etanólico de *H. dulcis*. Os resultados expressam o percentual de colônias *petites* induzidas pelo extrato etanólico de *H. dulcis*. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $p < 0,01$ ) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL). Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

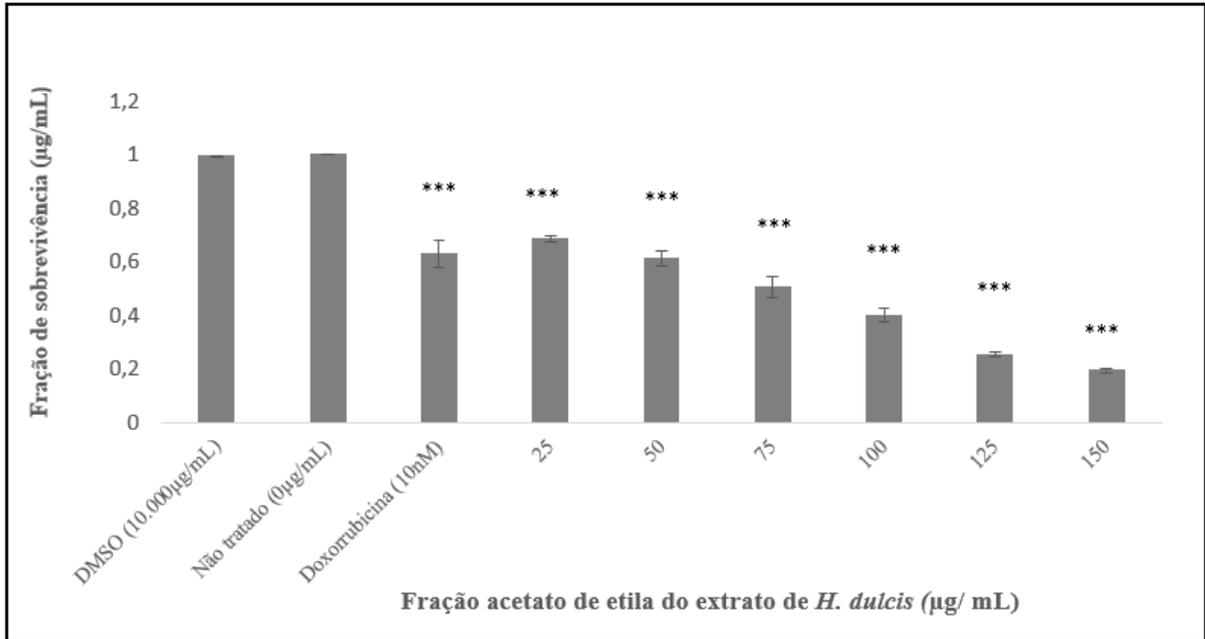
Fonte: A autora, 2022.

## 4.6 Avaliação da Citotoxicidade em Células A549 e VERO

### 4.6.1 Viabilidade celular pelo ensaio de WST-1 em culturas de células A549 tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*

Foi possível observar a diminuição da viabilidade das células tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de folhas de *H. dulcis*, em relação às células tratadas com DMSO (10.000 µg/mL). (gráficos 8 e 9). Esta diferença foi comprovada estatisticamente (\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). A  $IC_{50}$  foi encontrada nas concentrações de 75 e 150 µg/mL nas frações acetato de etila e butanol respectivamente. A Tabela 2 apresenta os dados estatísticos da  $IC_{50}$  das frações acetato de etila e butanol, permitindo a comparação da citotoxicidade entre elas na linhagem tumoral A549. A fração acetato de etila apresentou maior potencial citotóxico, com valores de  $IC_{50}$  calculado de  $87,4 \pm 0,050$  µg/mL.

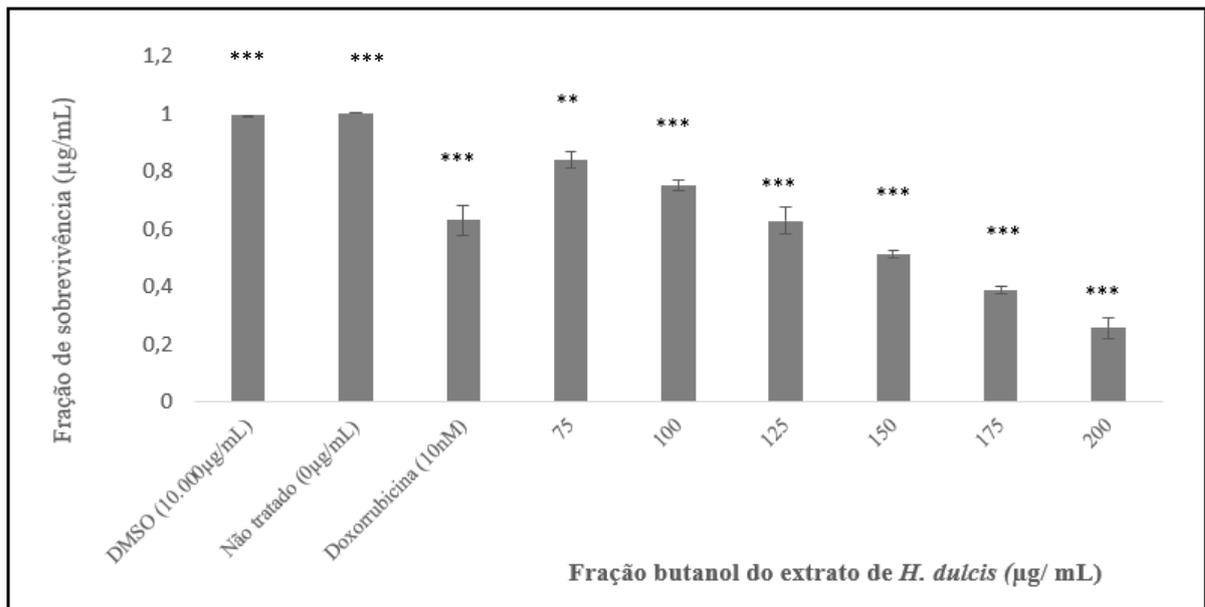
Gráfico 8 – Viabilidade em culturas de células A549 tratadas com a fração acetato e etila do extrato etanólico *H. dulcis*



Legenda: Cultura de células A549 tratadas com a fração acetato de etila do extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. \*\* (p < 0,01) \*\*\* (p < 0,001) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL). Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 9 – Viabilidade em culturas de células A549 tratadas com a fração butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*.



Legenda: Cultura de células A549 tratadas com a fração butanol do extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. \*\* (p < 0,01) \*\*\* (p < 0,001) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL). Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 2 – Citotoxicidade das frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *Hovenia dulcis* em linhagem A549

Linhagem	Frações	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	R <sup>2</sup>	Intervalo de confiança 95%
A549	Acetato de etila	87,4±0,050	0,970	87,301 – 87,451
	Butanol	159±0,0845	0,901	158,834 – 159,085

Legenda: IC<sub>50</sub>. Concentração que inibe 50%.

R<sup>2</sup> - coeficiente de correlação.

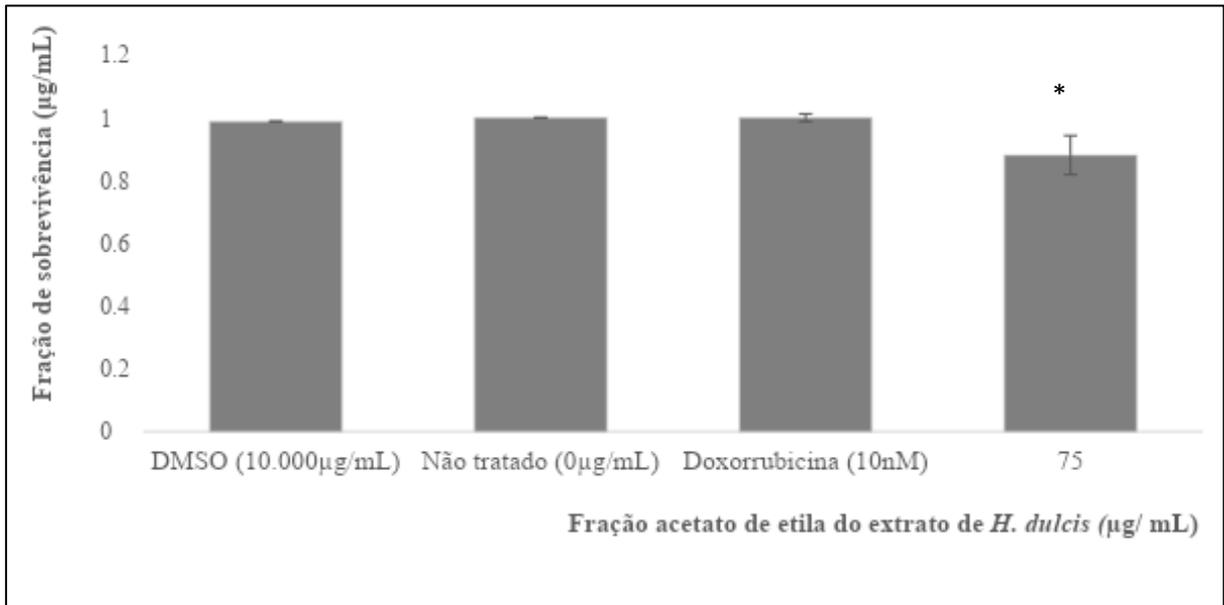
Fonte: A autora, 2022.

#### 4.6.2 Viabilidade celular pelo ensaio com WST-1 em culturas de células VERO tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*

Foi determinada a concentração da fração acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis* que inibe 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) em culturas de células A549 (Figura 11a e 11b). As concentrações mais próximas da IC<sub>50</sub> das respectivas frações, 75 e 150 µg/mL, foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade em culturas de células VERO.

Nos gráficos 10 e 11 encontram-se os dados obtidos nos experimentos de avaliação de citotoxicidade das frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis* em culturas de células VERO. Com base nesses resultados, foi possível observar que houve uma diminuição de 12 % (p<0,05) e 8% (p<0,05) da viabilidade das células tratadas com as frações acetato de etila e butanol, respectivamente, em relação às células tratadas com DMSO (10.000 µg/mL).

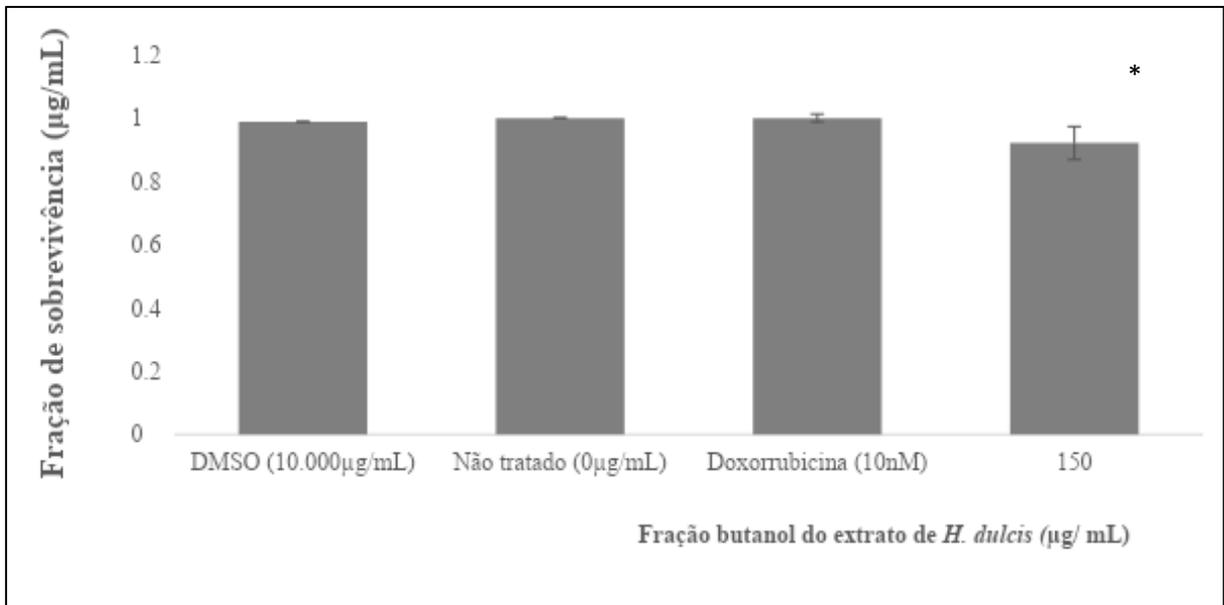
Gráfico 10 – Viabilidade em culturas de células VERO tratadas com a fração acetato de etila do extrato etanólico de *H. dulcis*.



Legenda: Cultura de células VERO tratadas com a fração acetato de etila do extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. \* (p< 0,05) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL).

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 11 – Viabilidade em culturas de células VERO tratadas com a fração butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*.



Legenda: Cultura de células VERO tratadas com a fração butanol do extrato de *H. dulcis* a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. \* (p< 0,05) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL).

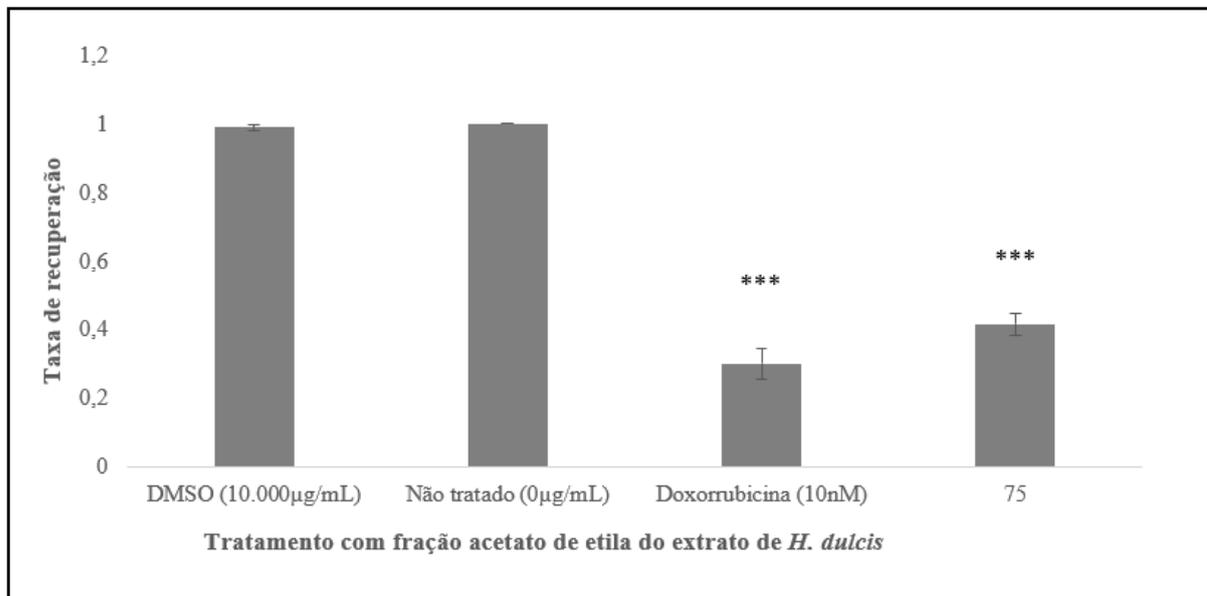
Fonte: A autora, 2022.

## 4.7 Recuperação clonogênica em linhagens celulares

### 4.7.1 Recuperação clonogênica em culturas de células A549 tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*

Na concentração de 75 e 150 µg/mL foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ), quando comparada às células tratadas com DMSO (10.000 µg/mL), mostrando a diminuição da capacidade mitogênica das células após o tratamento (gráficos 12 e 13)

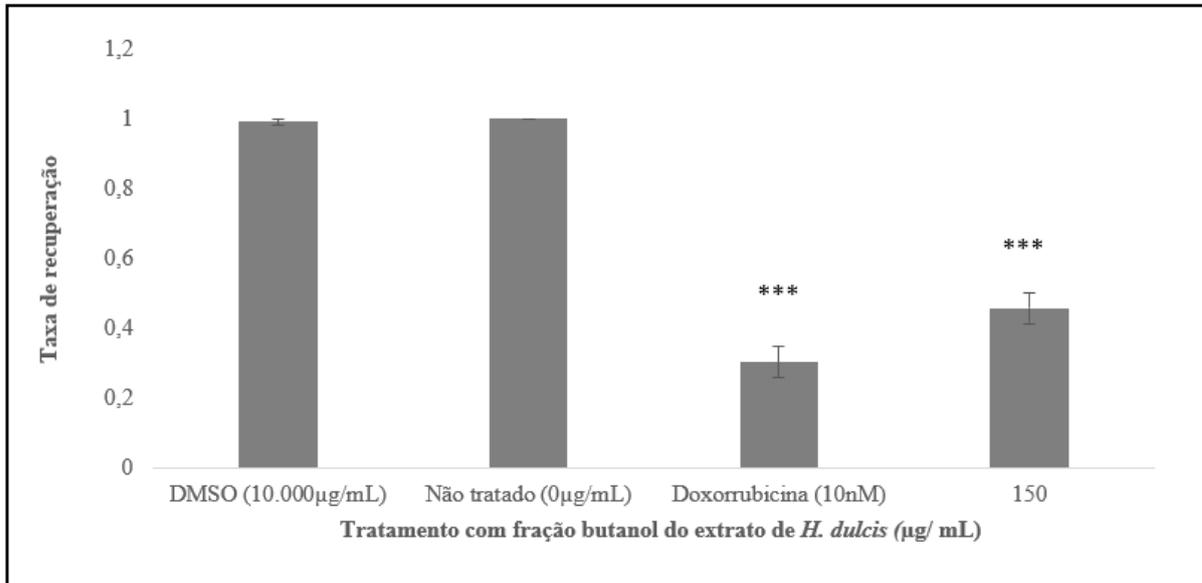
Gráfico 12 – Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células A549 tratadas com a fração acetato de etila do extrato de *H. dulcis*.



Legenda: Avaliação realizada 10 dias após o tratamento com a fração acetato de etila do extrato de *H. dulcis*. \*\*\* ( $p < 0,001$ ) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL). Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 13 – Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células A549 tratadas com a fração butanol do extrato de *H. dulcis*.



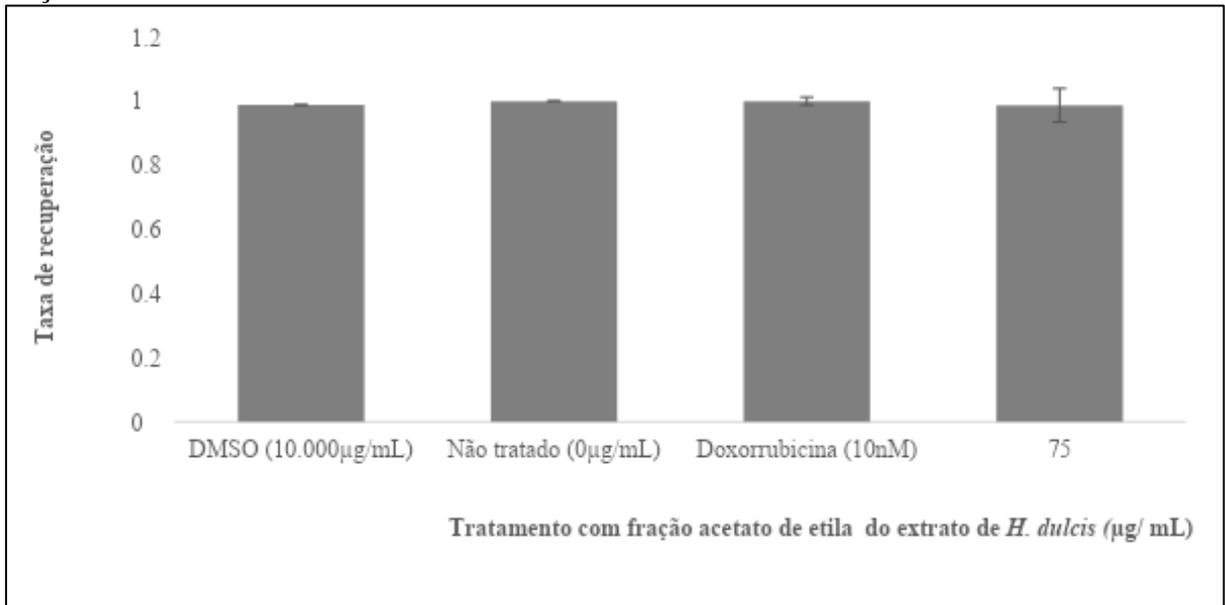
Legenda: Avaliação realizada 10 dias após o tratamento com a fração butanol do extrato de *H. dulcis*. \*\*\* ( $p < 0,001$ ) com relação ao controle DMSO (10.000 µg/mL). Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

#### 4.7.2 Recuperação clonogênica em culturas de células VERO tratadas com as frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*

Com base nos resultados de recuperação clonogênica em culturas de células VERO, foi possível comprovar que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) na capacidade mitogênica das células induzidas pelas frações acetato de etila e butanol do extrato etanólico de *H. dulcis*, nas concentrações 75 e 150 µg/mL respectivamente, quando comparada às células tratadas com (10.000 µg/mL) (gráficos 14 e 15).

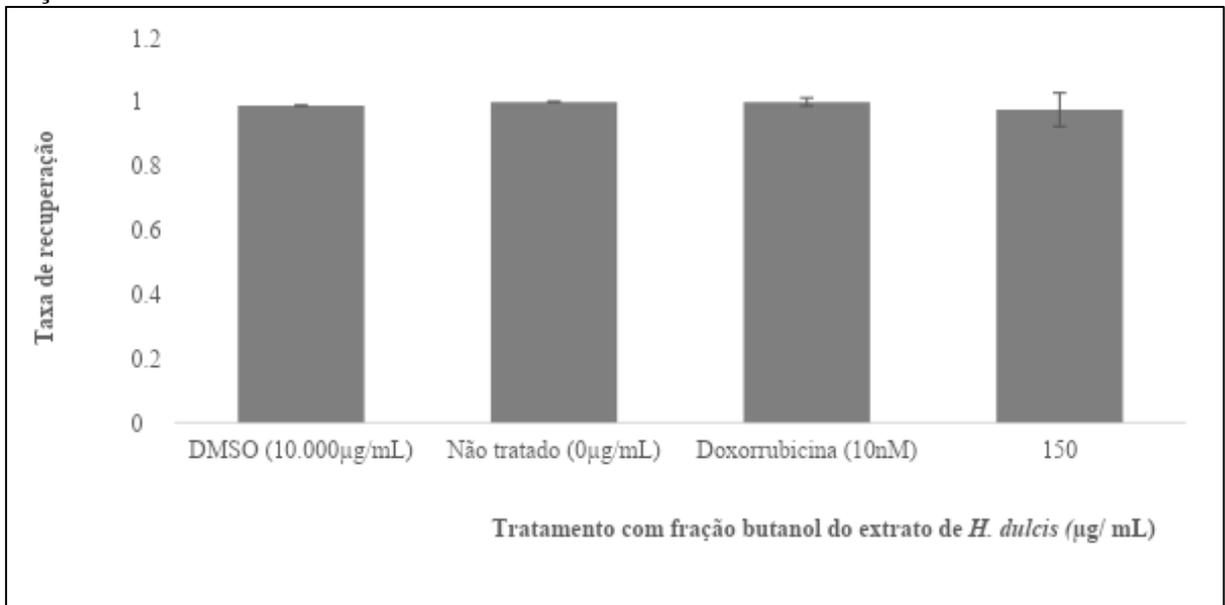
Gráfico 14 – Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células VERO tratadas com a fração acetato de etila do extrato de *H. dulcis*.



Legenda: Avaliação realizada 10 dias após o tratamento com a fração acetato de etila do extrato de *H. dulcis*. Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 15 – Avaliação da capacidade mitogênica em culturas de células VERO tratadas com a fração butanol do extrato de *H. dulcis*.



Legenda: Avaliação realizada 10 dias após o tratamento com a fração butanol do extrato de *H. dulcis*. Dados representam os resultados de três experimentos independentes.

Fonte: A autora, 2022.

## 5 DISCUSSÃO

Vários órgãos de *H. dulcis*, como raízes, ramos, folhas e frutos têm apresentado atividades biológicas, como por exemplo as atividades antifadiga, antidiabética, anti-giardia, neuroprotetora e hepatoprotetora (YANG; WU; LI, 2013; NA et al., 2013; YANG et al., 2019; LI et al., 2005; DONG et al., 2018). Contudo, estudos sobre a possível ação lesiva dos extratos em nível celular é de extrema relevância, especialmente para o uso na medicina popular. No presente trabalho foi utilizado como modelo biológico para testar atividade citotóxica e mutagênica de *H. dulcis*, a levedura *S. cerevisiae*, um eucarioto inferior, que possui algumas características interessantes, uma delas 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 podem ocasionar a mutagênese e a morte celular (SINGH ET al., 2001; SILVA et al., 2016). A inativação do gene *OGG1*, que codifica a proteína DNA glicosilase *ogg1*, confere um fenótipo de mutante espontâneo, levando ao acúmulo de transversões GC-TA, induzidas por agentes oxidantes. Assim, torna-se relevante avaliar a atividade biológica de frações do extrato da planta em estudo nesta levedura, na presença e na ausência do gene *OGG1* (THOMAS et al., 1997; TSUZUKI; NAKATSU; NAKABEPPU, 2007).

A ação citotóxica das frações do extrato etanólico de *H. dulcis*, foi analisada através da sobrevivência das culturas de *S. cerevisiae*, FF18733 (selvagem) e a mutante CD138 (deficiente no gene *OGG1*). Foi observada uma menor viabilidade celular na cepa mutante CD138, quando comparada à cepa selvagem, em todas as frações testadas do extrato. Os resultados no ensaio de sobrevivência sugerem que os componentes das frações em um curto período de tempo (60 minutos), são capazes de induzir lesões oxidativas. Porém, era necessário confirmar esses resultados na avaliação da taxa de crescimento das cepas em meio de cultura, após 48 horas de exposição às mesmas frações do extrato etanólico de *H. dulcis*.

Foi observada uma diminuição significativa do crescimento celular nas culturas de *S. cerevisiae* em todas as frações testadas em ambas as cepas, e uma maior sensibilidade às concentrações de  $IC_{50}$  na cepa mutante, após 48 horas de tratamento. Esses resultados sugerem uma diminuição da taxa de crescimento da cepa CD138, e que os componentes das frações são capazes de gerar lesões oxidativas. Tais lesões, por sua vez, são geradas por um aumento na quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). O acúmulo de lesões oxidativas no DNA, devido ao seu caráter mutagênico, tem um papel importante no processo de transformação maligna (HOFF et al., 2013). Portanto, era importante averiguar se estas frações teriam a capacidade de induzir mutações. Para tanto foram realizados os ensaios de mutagênese.

Na avaliação de mutagênese, foi observado um aumento na frequência de mutações na cepa CD138 quando comparada aos controles. Na levedura, o gene *OGG1* codifica uma DNA glicosilase que catalisa a remoção de 8-OxoG do DNA danificado. Assim, cepas de *S. cerevisiae* deficientes em *ogg1* exibem um resultado de fenótipo mutante G-C para T-A espontâneo em morte celular (THOMAS et al. 1997, TSUZUKI et al. 2007, MENCK et al. 2017). Esses resultados indicam que um ou mais componentes do extrato produziram ou induziram lesões no gene *Can1*. Lesões que foram reparadas na cepa selvagem, mas não foram reparadas na cepa mutante, justifica um nível mais alto de mutagênese nesta cepa (CD138). Estes resultados são semelhantes aos encontrados em estudo com extrato bruto desta espécie, que causaram mutagênese em cepas FF18733 e CD138 (ARAÚJO, 2017).

Danos no genoma mitocondrial, causados por agentes genotóxicos e/ou oxidantes, podem ser avaliados por ensaio de mutagênese mitocondrial, através da avaliação da frequência de colônias pequenas. Observou-se um aumento na frequência de colônias pequenas, apenas nas cepas CD138, quando se utilizou as frações acetato de etila e n-butanol (\*p <0,05). Estes resultados corroboram os efeitos observados por Silva e colaboradores (2014), na cepa CD138 tratada com *Cassia augustifolia* (popularmente conhecida como Sene). Na verdade, o DNA mitocondrial acumula mutações numa ordem de magnitude maior do que a do DNA nuclear, consistente com a vulnerabilidade da mitocôndria a danos no DNA induzidos por EROS (KANIAK-GOLIK; SKONECZNA, 2015). A inativação de *ogg1* leva ao aumento da frequência de pequenos mutantes mitocondriais devido a deleções no mtDNA (*rho* gen) (SINGH et al., 2001; LIU; BUTOW, 2006). Alterações ou perda da atividade mitocondrial são um dos fatores que desencadeiam a via intrínseca de morte celular programada por apoptose. (MENCK et al., 2017). Nossos resultados sugerem que houve um aumento no dano ao mtDNA e, conseqüentemente, uma mudança na atividade das mitocôndrias. Assim, a descoberta de que uma das frações produz alteração mitocondrial torna essa fração um material de estudo interessante para avaliação como agente quimioterápico.

Em relação ao potencial antitumoral da fração acetato de etila e butanol de *H. dulcis*, as concentrações de  $IC_{50}$  obtidas pelo ensaio de sobrevivência na linhagem A549 foram de 87,4 e 159  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, sendo também testadas na linhagem selvagem VERO, nas concentrações de 75 e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Foram observadas que ambas as frações foram citotóxicas para a linhagem A549 e VERO, ressaltando que a citotoxicidade foi bem maior na linhagem tumoral A549. Além disso, através do experimento de recuperação clonogênica, foi possível observar que células da linhagem A549 foram mais sensíveis ao tratamento com a fração, quando comparadas às células da linhagem normal VERO, que se

recuperou completamente.

O resultado da inibição da mitogênese, observado no ensaio de recuperação clonogênica, reforça que, mesmo as células que sobreviveram ao tratamento, diminuem a capacidade de se dividir. O que confirma o potencial antitumoral da fração acetato de etila e butanol do extrato de *H. dulcis* nessas concentrações, mostrando um efeito biológico mais amplo, para a avaliação da citotoxicidade, quando comparado a outros ensaios que avaliam efeitos breves (FRANKEN et al., 2006). Dados da literatura respaldam os resultados encontrados neste trabalho, como a inibição do crescimento de macrófagos RAW 264.7 em 25%, quando tratadas com extrato etanólico de frutos de *H. dulcis*, na concentração de 120µg/mL (PARK et al., 2016); e estudos com a fração dietil éter do extrato etanólico da casca do caule de *H. dulcis* que mostraram uma inibição de 50% do crescimento de células de hepatoma humano (Hep3B) na concentração de 250µg/mL e de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) na concentração de 100µg/mL (HYUN et al., 2010). Em outro estudo, a fração clorofórmica do extrato metanólico de folhas de *H. dulcis* inibiu o crescimento de células da linhagem de hepatoma humano (HEPG2) em 76% e de adenocarcinoma de cólon humano (linhagem HT29) em 80%, quando tratadas na concentração de 100µg/mL (PARK; CHANG; 2007).

A etapa seguinte foi identificar a (s) substância (s) relacionada (a) à atividade antitumoral, observada com a linhagem A549. Assim foram realizadas as análises fitoquímicas pela técnica de CLAE-DAD, que indicaram a presença de substâncias como ácido protocatecuico e seus derivados, catequina, epicatequina e derivados, e também dos derivados do ácido cinâmico ou benzoico. Dentre essas, destacamos o ácido protocatecuico, associado à atividade antitumoral, devido ao seu potencial quimioterápico comprovado que, dependendo da concentração utilizada, pode atuar seletivamente contra as células tumorais humanas, devido à redução do potencial de membrana mitocondrial, diminuição da atividade de  $Na^+ - K^+ ATPase$ , aumento das caspases -3 e 8 ativadas, e fragmentação do DNA em células de câncer de pulmão, fígado, colo, útero, mama e próstata (YIN et al., 2009; SEMAMING et al., 2015). O ácido protocatecuico já foi isolado de raízes de *H. dulcis* e induziram atividade antiproliferativa em células hepáticas HSC-T6 (KANG et al., 2017). Estudos posteriores de espectrometria de massa com padrões são necessários para confirmar a nossa hipótese.

Novos estudos devem ser realizados para identificar as substâncias responsáveis por essas atividades tóxicas e mutagênicas, e demonstrar o envolvimento do extrato na indução de apoptose pela via mitocondrial intrínseca.

## CONCLUSÃO

- A fração acetato de etila e butanol de *H. dulcis* produzem lesões oxidativas, provavelmente mediadas pela geração de espécies reativas de oxigênio, que são capazes de induzir comprometimento ou disfunção nuclear e/ ou mitocondrial;
- O comprometimento ou a disfunção mitocondrial induzida por *H. dulcis* parece contribuir com a inibição da sobrevivência e proliferação celular;
- Os princípios ativos da fração acetato de etila devem ser estudados para o desenvolvimento de quimioterápicos;
- Deve ter cautela quanto ao uso dessa planta medicinal pela população em geral, com base no potencial mutagênico evidenciado neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- ALONSO R. J. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis, p. 350-354, 1998.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Disponível em <http://www.atcc.org>. Prog.htm>Acesso em: 2 de agosto de 2018.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 3, p. 10-15. 2001.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied*, v.115, p. 346-357, 2013.
- ANEJA, K. R.; SHARMA, C.; JOSHI R. Antimicrobial activity of *Terminalia arjuna* Wight & Arn.: an ethnomedicinal plant against pathogens causing ear infection. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 78, n. 1, p. 68-74, February 2012.
- ARAÚJO, L. B. N. *Estudos dos potenciais citotóxicos, antineoplásicos e mutagênicos do extrato etanólico de H. dulcis Thunberg* (2017). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal, PGBV- UERJ) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- BADKE, M. R.; BUDÓ M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Enfermagem Anna Nery*, v.15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- 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.
- BOITEUX, S.; ROBERTSON, S.J. DNA Repair mechanisms and the bypasses of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v.193, p. 1025-1064, 2013.
- BORLINGHAUS, F.; ALBRECHT, F.; GRUHLKE, M. C. H.; NWACHUKWU, I. D.; SLUSARENKO, A. J.; Allicium: Chemistry and biological properties. *Molecules*, v.19, p.12591-12618, 2014.

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

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. R. The role of phenolic compounds in the fight against cancer- A review. *Anti-cancer Agents in Medical Chemistry*, v.13, p.1236-1258, 2013.

CARVALHO, P. E. R. *Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (Hovenia dulcis Thunberg)*. Circular Técnica EMBRAPA, Colombo: EMBRAPA Florestas, p. 24-65, 1994.

CASCIOLA-ROSEN, L.; PETRI, M.; SCHLISSEL, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 4, p. 1624-1629, February 1996.

CAVALLAZZI M, DA COSTA, L. AB. *Plantas medicinais na Atenção Primária à Saude-Minicurso da IV Jornada Catarinense de Plantas medicinais*, Itajai, SC. Setembro 2003.

CHANDLER, C.; DEADY, L. W.; REISS, J. A. Synthesis of some 2, 9-Disubstituted-1,10-phenanthrolines. *Journal of Hererocyclic Chemistry*, v.18, p. 599-601, 1981.

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

DALLAQUA, B; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 13, n. 3, p.367-373, Janeiro 2011.

DEWICK, P.M. *The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids*. In: medical natural products: a biosynthetic approach. 3 ed, chichester. John wiley e sons, 2009. Cap 5, p.187-306.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, v. 58, p. 39-46, 2004.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p. 163-179.

FINOCOHIARO, F.; FERRARI, B.; GIANINETTI, A. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of cereal science*, v. 51, p. 28-34, 2010.

Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C.; Nat. Protoc, v. 1, p.5, 2006.

FRIDOVICH, I. Oxigen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

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.

GARCÍA, A. Á., CARRIL, E.P-U. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

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.

GUO, S.; TANG, Y. P.; DUAN, J. A.; SU, S. L.; DING, A. W. Two new terpenoids from fruits of *Ziziphus jujuba*. *Chinese Chemical Letters*, v. 20, n. 2, p. 197-200, February 2009.

GUPTA, S.; SAHA, B.; GIRI, A. K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutation Research*, v. 512, p.37-65, 2002.

HAN, J. M.; LIM, H. N.; JUNG, H. J. *Hovenia dulcis* Thunb. and its active compound ampelopsin inhibit angiogenesis through suppression of VEGFR2 signaling and HIF-1 $\alpha$  expression. *Oncology Reports*, v.38, n. 6, p. 3430-3438, December 2017.

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. *a/alpha*-control of DNA repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and physiological aspects. *Genetics.*, v. 133, n. 3, p. 489-498, March 1993.

HOFF, P. M. G. Tratado de oncologia. *Editora Atheneu*, 2013.

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

IRONDI, E. A.; OBOH, G.; AKINDAHUNSI, A. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phenolics composition and antidiabetic property of *Brachystegia eurycoma* seed flour in high-fat diet, low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v.5, p.159-165, 2015.

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.

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.

KANG, K. B.; JUN, J. B.; KIM J. W.; KIM, H. W.; SUNG, S.H. Ceanothane- and lupane-type triterpene esters from the roots of *Hovenia dulcis* and their antiproliferative activity on HSC-T6 cells. *Phytochemistry*, v. 142, p. 60-67, October 2017.

KELLY, M. R.; WOY, W. Y.; WILSON, D. M. Disparity between DNA Base Excision Repair in Yeast and Mammals. *Cancer Research*, v. 63, p. 549-554, Fevereiro 2003.

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, H.; KIM, Y. J.; JEONG, H. Y.; CHOI, E. I.; CHAE, S.W.; KWON, O. A standardized extract of the fruit of *Hovenia dulcis* alleviated alcohol-induced hangover in healthy subjects with heterozygous ALDH2: A randomized, controlled, crossover trial. *Journal Ethnopharmacology*, V. 14, N. 209, P. 167-174, September 2017.

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.

KROKAN, H. E.; BJORAS, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 5, n. 4, p.1-22, April 2013.

KUMAR, R.; CHHATWAL, S.; ARORA, S.; SHARMA, S.; SINGH, N.; KHURANA, A. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, anti inflammatory and adenosine deaminase-lowering effects of garlic in patients with type 2 diabetes mellitus with obesity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: Targets and therapy*, v.6, p. 49-56, 2013.

LEITAO, A. C. Roberto Alcantara Gomes. In: Darcy Fontoura de Almeida; Wanderley de Souza. (Org.). *Construtores do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho*. 1 ed. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 161-168, 2013.

LI, G.; MIN, B. S.; ZHENG, C.; JOONGKU LEE, J.; OH, S.R.; AHN, K. S.; LEE, H.K. Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, n. 7, p. 804-809, July 2005.

LI, G.; WU, L.; WEI, J.; SU, S.; HUANG, H.; GAO, X.; HU, Q. F. Two new flavonoids from the fruits of *Ziziphus jujuba*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 49, n. 4, p. 617-620, 2013.

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.

LIM, T. K. *Hovenia dulcis*. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. p.568-577, 2013.

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.

LIU, Y.; WANG, P.; CHEN, F.; YUAN, Y.; ZHU, Y.; YAN, H.; HU, X. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food chemistry*, v.186, n. 1, p. 46-53, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, December 2001.

LOPES, G. A. D.; FELICIANO, L. M.; DINIZ, R. E. S.; ALVES, M. J. Q. F. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). *Revista ciência em extensão*, v. 6, n. 2, pag. 143-155, 2010.

MADHUSUDAN, S.; SMART, F.; SHRIMPTON, P.; PARSONS, J. L.; GARDINER, L.; HOULBROOK, S.; TALBOT, D. C.; HAMMONDS, T.; FREEMONT, P. A.;

STERNBERG, M. J.; DIANOV, G. L.; HICKSON, I. D. Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. 15, p. 4711-4724, August 2005.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, v. 613, p. 1-19, 2008.

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.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, L.C.F.R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L) as affected by pre- and post- harvest conditions: A review. *Food chemistry*, v. 2011, p. 41-50, 2016.

MENCK, C. F. M.; SLUYS, M. A. V. Genética molecular básica: dos genes ao genoma. Editora Guanabara Koogan, 2017.

MISSAU, F. C. *Estudo fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de alcaloides ciclopeptídicos isolados de Scutia buxifolia Reiss*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

NA, C. S.; YOON, S. Y.; KIM, J. B.; NA, D. S.; DONG, M. S.; LEE, M. Y.; HONG, C. Y. Anti-fatigue activity of *Hovenia dulcis* on a swimming mouse model through the inhibition of stress hormone expression and antioxidation. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 41, n.4, p. 945-55, 2013.

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, W. A. *Os recursos vegetais e o saber local nos quintais da comunidade de Santo Antônio do Caramujo, Cáceres, Mato Grosso, Brasil* (2013). 193f. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Florestais e Ambientais) – Departamento de Ciências Florestais e Ambientais, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

PANEE, J. Potential Medicinal Application and Toxicity Evaluation of Extracts from Bamboo Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 9, n. 23, p. 681-692, June 2015.

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-kappaB pathway in Raw 264.7 cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 4, p. 357-365, April 2016b.

PERES, L. E. P. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. p. 1-10.

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.

PORTO, D. D. Papel dos alcalóides branquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em *Psychotria brachyceras* mull Arg. 2005. 138f. (doutorado em ciências). Centro de biotecnologia, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

POWELL, C. L.; SWENBERG, J. A.; RUSYN, I. Expression of base excision DNA repair gene as a biomarker of oxidative DNA damage. *Cancer Letters*, v. 229, n. 1, p. 1-11, 2005.

RADICELLA, J.P.; DHERIN, C.; DESMAZE, C.; FOX, M. S. BEOITEUX, S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 15, p. 8010-8015, 1997.

RIBEIRO, I. G.; GAYER, C. R. M.; CASTRO, TATIANA CARVALHO de; COELHO, M. G. P.; ALBARELLO, N. Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) under in vivo and in vitro culture conditions. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 9, p. 8-15, 2015.

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 2018.

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.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. SAPONINAS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, 1104p.

SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Caderno de Farmácia*, v.1, p.65-72, 1985.

SCHUCH, A. P.; MORENO, N. C.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M.; GARCIA, C. C. M. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 107, p. 110-124, June 2017.

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.

SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO, J.; BETA, T. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.) *Journal of cereal science*, v.59, p. 211-218, 2014.

SILVA, C. R.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; LEITÃO, A.; PADULA, M. Nuclear and mitochondrial genome instability induced by senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Genetics and Molecular Research*, v.13, n.4, p. 9861-9866, Novembro, 2014.

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 2016a.

SILVA, P.M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, v. 196, p.309-323, 2016b.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SINGH K.K., B. SIGALA, H.A. SIKDER, C. Schwimmer, Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* OGG1 DNA repair gene leads to an increased frequency of mitochondrial mutants, *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 1381-1388, 2001.

SOUZA, S. P.; PEREIRA L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, v. 14, n. 4, pag. 643-648, 2012.

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.

SOUZA, W. N. *Dendrocronologia de Hovenia dulcis Thunberg, proveniente do Parque Nacional do Iguaçu – PR*. 2014. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e florestais), Instituto de florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SRIVASTAVA R. K.; LOHANI M.; PANT A. B.; RAHMAN Q. Cyto-genotoxicity of amphiboleasbestos 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.

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

TAOFIQ, O.; CALHELHA, R.C.; HELENOS, S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; SANTOS-BULLGA, C. The contribution of phenolic acids to the anti inflammatory activity of mushrooms : screening in phenolics extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food research international*, v.76, p.821-827, 2015.

THRANE, U. Development in the Taxonomy of *Fusarium* Species Based on Secondary Metabolites. In *Fusarium: Paul E. Nelson memorial symposium*, edited by B. A. Summerell. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2001, pp. 29-49.

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.

TSUZUKI, T.; NAKATSU, Y.; NAKABEPPU, Y. Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Science* v. 98, n.4, p. 465-470, April 2007.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 60, n. 8, p. 1-17, Novembro 2008.

VALKO, D.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M. E.; TELSER, J. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44 -84, 2007.

VAN, E. M.; RAMAEKERS F. C.; SCHUTTE B.; REUTELINGSPERGER C. P. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, v. 24, n. 2, p. 131-139, June 1996.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. *Chromatographic Science Series*, v. 99, 2008.

WANG, M.; JIANG, C, MA, L.; ZHANG, Z.; CAO, L.; LIU, J.; ZENG, X. Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food Chemistry*, v. 138, n.1, p. 41-47, May 2013.

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

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.

YANG, J.; WU, S.; LI C. High Efficiency Secondary Somatic Embryogenesis in *Hovenia dulcis* Thunb. through Solid and Liquid Cultures. *The Scientific World Journal*, p. 1-6, may, 2013.

YANG, B.; WU, Q.; LUO, Y.; YANG, Q.; WEI, X.; KAN, J. High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis*: Extraction, structure, antioxidant activity and hypoglycemic. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 15, n. 137, p. 676-687, September 2019.

YU, Z.; WANG, X. S.; HU, Z. H. Dammarane-type saponins from *Ziziphus jujube*. *Journal of Asian natural products research*, v. 16, n. 2, p. 200-205, 2014.

ZAHOOR, M.; YOUSAF, Z.; AQSA, T.; HAROON, M.; SALEH, N.; AFTAB, A.; JAVED, S.; QADEER, M.; RAMAZAN, H. An ethnopharmacological evaluation of Navapind and Shahpur Virkanin district Sheikupura, Pakistan for their herbal medicines, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 13, p. 1-27, May, 2017.