



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Graziela da Silva Mello

**Cultura de tecidos, avaliação do potencial genotóxico, antigenotóxico, antineoplásico e
análise fitoquímica de *Schwartzia brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)**

Rio de Janeiro

2016

Graziela da Silva Mello

Cultura de tecidos, avaliação do potencial genotóxico, antígenotóxico, antineoplásico e análise fitoquímica de *Schwartzia brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção de grau de doutor em Biologia Vegetal.

Orientação: Prof^ª. Dra. Norma Albarello

Coorientação: Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Rio de Janeiro

2016

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

M527 Mello, Graziela da Silva.
Tese Cultura de tecidos, avaliação do potencial genotóxico, antineoplásico, antitumoral e análise fitoquímica de *Schwartzia brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae) / Graziela da Silva Mello. - 2016.
230 f. ; il.
Orientação: Norma Albarello.
Coorientação: José Carlos Pelielo de Mattos.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Plantas medicinais – Propagação in vitro - Teses. 2. Plantas – Teses. I. Albarello, Norma. II. Mattos, José Carlos Pelielo de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.887

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

Assinatura

Data

Graziela da Silva Mello

Cultura de tecidos, avaliação do potencial genotóxico, antígenotóxico, antineoplásico e análise fitoquímica de *Schwartzia brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção de grau de doutor em Biologia Vegetal.

Avaliada em

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

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

Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Aline Castellar Duarte
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Isaias e Dircilene.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Norma Albarello, Coordenadora do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela orientação, ensinamentos, incentivo e paciência ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. José Carlos Pelielo de Mattos, do Laboratório de Radio e Fotobiologia, do Centro Biomédico, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela co-orientação, ensinamentos, atenção, disponibilidade e calma de sempre.

À professora Dra. Lidia Maria da Fonte de Amorim, do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, pelo ensinamento e auxílio nos experimentos e na parte escrita do potencial antineoplásico.

Ao professor Dr. Flávio José da Silva Dantas pelo auxílio na parte estatística nos experimentos genotóxicos e antígenotóxicos.

Aos companheiros do LABPLAN, em especial Maria Francisca, Luciano e Pedro Vitor, pelo auxílio e apoio técnico. Vocês foram muito importantes nessa jornada.

Aos companheiros do ONCOMOL, em especial Jessica e Elaine, que me ensinaram grande parte das metodologias de avaliação antineoplásica utilizadas nesse trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Radio e Fotobiologia, em especial Verônica, pelo auxílio nos experimentos.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso e deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro concedido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Isaias e Dircilene, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todas as decisões. Obrigada pelo carinho e amor.

Aos meus irmãos, Grazione e Gabriela, e familiares pelos momentos de carinho e solidariedade.

Ao meu amor, Ronaldo Belarmino, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Obrigada pelo carinho e amor.

Aos meus amigos, pelos momentos que compartilhamos durante todos os anos.

Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MELLO, Graziela da Silva. *Cultura de tecidos, avaliação do potencial genotóxico, antigenotóxico, antineoplásico e análise fitoquímica de Schwartzia brasiliensis Choisy (Marcgraviaceae)* 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Schwartzia brasiliensis é uma espécie nativa, com distribuição neotropical, encontrada geralmente em ambientes de restinga. Alguns estudos indicam seu potencial medicinal para as atividades analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, tripanocida e protetora ao DNA. Atualmente, o câncer é reconhecido como a doença responsável pelo maior número de óbitos no mundo, sendo seu tratamento geralmente invasivo e nem sempre eficaz, o que estimula a busca de novos fármacos, inclusive de origem vegetal. Considerando a necessidade de exploração dos recursos vegetais de forma sustentável, as técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser utilizadas como alternativa para a produção contínua de substâncias de interesse medicinal. Dessa forma, o presente trabalho objetivou o estabelecimento de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *S. brasiliensis* visando à produção de metabólitos de interesse medicinal, avaliação do potencial genotóxico, antigenotóxico, antineoplásico e a determinação do perfil fitoquímico de extratos e frações de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*. Foram realizados estudos sobre a produção de calos e suspensões celulares e a influência de diferentes fitorreguladores, luminosidade, tipos de explantes e elicitores sobre estes sistemas. Adicionalmente, foram avaliados o potencial genotóxico, antigenotóxico, antineoplásico e o perfil fitoquímico do material obtido *in vivo* e *in vitro*. A adição dos fitorreguladores KIN e PIC propiciou a produção de calos friáveis, na presença ou ausência de luz, a partir de explantes foliares e caulinares, enquanto o uso do fitorregulador BAP associado ao ANA influenciou a produção de calos compactos a partir de explantes foliares, sob luminosidade. O uso do elicitor metil jasmonato induziu o maior acúmulo de biomassa em calos de *S. brasiliensis*. Culturas de células em suspensão foram estabelecidas a partir de calos friáveis obtidos a partir de explantes caulinares, sem luminosidade. Os extratos metanólico e aquoso de folhas e caules, assim como o extrato metanólico de suspensões celulares obtidas *in vitro* foram capazes de reduzir a quebra do DNA causado pelo SnCl₂, e não causaram dano ao DNA. A avaliação do potencial antineoplásico de extratos e frações em células da linhagem K562 revelou, através do método de viabilidade celular por MTT, que a fração acetato de etila é a mais citotóxica (IC₅₀ = 32,94±6,49 µg/mL), após resultado foi comprovado através da microscopia óptica. Avaliou-se, por citometria de fluxo, o tipo de morte, a fragmentação do DNA e alteração no ciclo celular induzidos pelas frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis* cultivada *in vivo*. Todas as frações induziram a morte celular, principalmente por necrose. Somente a fração aquosa causou maior fragmentação do DNA, quando comparada ao controle negativo. Paralelamente, as frações acetato de etila e hexano induziram um aumento do número de células na fase S do ciclo celular. As análises por CLAE-UV-DAD indicam que o potencial antigenotóxico e antineoplásico de *S. brasiliensis* cultivada *in vivo* e *in vivo* pode estar relacionado à presença de flavonoides. Estes resultados constituem os primeiros estudos realizados para a espécie.

Palavras-chave: planta medicinal, cultura de tecidos vegetais, genotoxicidade, potencial antitumoral, flavonoides

ABSTRACT

MELLO, Graziela da Silva. *Tissue culture, evaluation of the genotoxic, antigenotoxic, antineoplastic potential and phytochemical analysis of Schwartzia brasiliensis Choisy (Marcgraviaceae)*. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Schwartzia brasiliensis is a native species, with neotropical distribution, usually found in salt marsh environments. Some studies indicate its medicinal potential with analgesic, anti-inflammatory, antibacterial and trypanocidal activity and DNA protective. Currently, cancer is recognized as the disease responsible for more deaths worldwide, and its treatment usually invasive and not always effective, which stimulates the search for new drugs, including those from plant origin. Considering the need for exploitation of plant resources in a sustainable manner, plant tissue culture techniques can be used as an alternative to continuous production of medicinal interest substances. Thus, this study aimed to establish different *in vitro* systems of *S. brasiliensis*, aiming at the production metabolites of medicinal interest, as well as evaluation of the genotoxic, antigenotoxic, antineoplastic potential and determining the phytochemical profile of extracts and fractions of materials obtained *in vivo* and *in vitro*. Studies have been conducted on the production of callus and cell suspensions evaluate and the influence of different growth regulators, luminosity, types of explants and elicitors on these systems. In addition, was evaluated the genotoxic, antigenotoxic, antineoplastic potential and the phytochemical profile of the material obtained *in vivo* and *in vitro*. The addition of the growth regulators KIN and PIC favored the production of friable callus in the presence or absence of light from leaf and stem explants, while the use of BAP associated with NAA influenced the production of compact callus from leaf explants, under light. The use of methyl jasmonate as elicitor induced higher accumulation of biomass in callus of *S. brasiliensis*. Cell suspension cultures were established from friable callus obtained from stem explants, in the absence of light. The assessment of the genotoxic and antigenotoxic potentials were conducted through plasmid DNA agarose gel electrophoresis and showed that aqueous and methanolic extracts of leaves and stems, besides the methanol extracts of cell suspensions obtained *in vitro* were able to reduce breakage caused by SnCl₂, and did not cause DNA damage. The evaluation of antineoplastic potential of extracts and fractions in K562 cell line revealed through the cell viability test by MTT assay, the ethyl acetate fraction is more cytotoxic (IC₅₀ = 32,94±6,49 µg mL), results demonstrated by optical microscopy. It was evaluated by flow cytometry technique, the type of death, DNA fragmentation and cell cycle induced by the fractions from methanolic extract of leaves of *S. brasiliensis* cultivated *in vivo*. All fractions induced cell death, mainly by necrosis. Only the aqueous fraction caused further fragmentation of the DNA compared to the negative control. In parallel, ethyl acetate and hexane fractions induced an increase in the number of cells in the S phase of the cell cycle. Analyses by HPLC-UV-DAD indicate that antigenotoxic and antineoplastic potentials of *S. brasiliensis* grown *in vivo* and *in vitro*, could be due to flavonoids. These results are the first studies for the species.

Keywords: medicinal plant, plant tissue culture, genotoxicity, anti-tumor potential, flavonoids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Habitus</i> arbustivo de <i>Schwartzia brasiliensis</i>	21
Figura 2 – Detalhe da inflorescência de <i>Schwartzia brasiliensis</i> exibindo nectários.....	22
Figura 3 – Detalhe do fruto de <i>Schwartzia brasiliensis</i> exibindo formato globoso.....	22
Figura 4 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.....	28
Figura 5 – Calogênese obtida a partir de explantes foliares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC e KIN, após 90 dias de cultivo.....	49
Figura 6 – Calogênese obtida a partir de explantes caulinares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC e KIN, após 90 dias de cultivo.....	50
Figura 7 – Calogênese obtida a partir de explantes foliares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, após 90 dias de cultivo.....	52
Figura 8 – Produção de calos e brotos obtidos a partir de explantes caulinares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, após 90 dias de cultivo.....	52
Figura 9 – Produção de calos a partir de explantes radiculares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, após 90 dias de cultivo, mantidos na ausência de luminosidade.....	53
Figura 10 – Resposta morfogênica de explantes foliares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 90 dias de cultivo.....	55

Figura 11 – Resposta morfogênica de explantes caulinares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 90 dias de cultivo.....	56
Figura 12 – Resposta morfogênica de diferentes explantes de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com 7,5 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, na ausência de luz, após 90 dias de cultivo.....	56
Figura 13 – Cultura de calos obtidos a partir de explantes caulinares de <i>Schwartzia brasiliensis</i> mantidas em meio B5 suplementado com 5,0 mg.L ⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L ⁻¹ de KIN, sob ausência de luminosidade.....	57
Figura 14 – Resposta morfogênica de diferentes explantes de <i>Schwartzia brasiliensis</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de SNP, após 60 dias de cultivo sob luminosidade.....	58
Figura 15 – Cultura de calos mantidos em meio B5 suplementado com 5,0 mg.L ⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L ⁻¹ de KIN e diferentes concentrações de elicitores, após 60 dias de cultivo, sob ausência de luminosidade.....	60
Figura 16 – Teste de viabilidade celular dos inóculo das culturas de células em suspensão de <i>Schwartzia brasiliensis</i> mantidas em meio B5 suplementado com 5,0 mg.L ⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L ⁻¹ de KIN, após 21 dias.....	61
Figura 17 – Curva de crescimento das culturas de células em suspensão de <i>Schwartzia brasiliensis</i> cultivadas em meio B5 + 5,0 mg.L ⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L ⁻¹ de KIN, após 31 dias em cultura, sob ausência de luminosidade.....	62
Figura 18 – Culturas de células em suspensão de <i>Schwartzia brasiliensis</i> cultivadas em meio B5 suplementado com 5,0 mg.L ⁻¹ PIC + 0,5 mg.L ⁻¹ KIN, sob ausência de luminosidade.....	62
Figura 19 – Análises qualitativa e quantitativa do potencial genotóxico e antígenotóxico de extratos e frações de <i>Schwartzia brasiliensis</i> no plasmídeo pUC 9.1. As bandas	

correspondentes às alíquotas da solução de plasmídeo (200 ng) com extratos tratados (25, 125 e 250 µg/ mL).....64

Figura 20 – Análises qualitativa e quantitativa do potencial genotóxico e antígenotóxico de extratos metanólicos de materiais produzidos *in vitro* de *Schwartzia brasiliensis* no plasmídeo pUC 9.1. As bandas correspondentes às alíquotas da solução de plasmídeo (200 ng) com extratos tratados (25, 125 e 250 µg/ mL).....65

Figura 21 – Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT com células K562 tratadas com diferentes concentrações de extratos metanólicos obtidos a partir de caules, folhas e raízes de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo*.....67

Figura 22 – Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT com células K562 tratadas com diferentes concentrações de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo*.....68

Figura 23 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....70

Figura 24 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de raízes de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....71

Figura 25 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de caules de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....72

Figura 26 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações da fração acetato de etila obtida a partir extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....73

Figura 27 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações da fração aquosa obtida a partir extrato metanólico de folhas de <i>Schwartzia brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....	74
Figura 28 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações da fração diclorometano obtida a partir extrato metanólico de folhas de <i>Schwartzia brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....	75
Figura 29 – Células tumorais K562 tratadas com diferentes concentrações da fração hexano obtida a partir extrato metanólico de folhas de <i>Schwartzia brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).....	76
Figura 30 – Citogramas representativos da análise de citometria de fluxo com marcação para anexina V e PI, em células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC ₅₀ de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de <i>Schwartzia brasiliensis</i>	78
Figura 31 – Citogramas representativos da análise de citometria de fluxo com marcação para anexina V e PI, em células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores da metade do IC ₅₀ de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de <i>Schwartzia brasiliensis</i>	79
Figura 32 – Histogramas representando a análise da fragmentação de DNA das células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC ₅₀ de frações obtidas a partir do extrato metanólico de <i>Schwartzia brasiliensis</i> por 24 h.....	80
Figura 33 – Histogramas representando a análise da fragmentação de DNA das células K562 tratadas com doses correspondentes à metade dos valores de IC ₅₀ de frações obtidas a partir do extrato metanólico de <i>Schwartzia brasiliensis</i> por 24 h.....	82
Figura 34 – Análise por CLAE-UV-DAD dos compostos majoritários de extratos e frações de materiais obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Schwartzia brasiliensis</i> e seus espectros característicos na região do ultravioleta.....	84

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Efeitos do óxido nítrico no crescimento e desenvolvimento das plantas.....	33
Tabela 1 – Alguns Fármacos de origem vegetal usados no tratamento do câncer.....	29
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura utilizados na indução de calogênese de <i>S. brasiliensis</i> a partir de explantes caulinares, foliares e radiculares.....	38
Tabela 3 – Produção de biomassa calogênica em <i>S. brasiliensis</i> obtida a partir de explantes foliares e caulinares inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de KIN + PIC após 90 dias em cultura.....	49
Tabela 4 – Produção de biomassa calogênica em <i>S. brasiliensis</i> obtida a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP + ANA após 90 dias em cultura.....	54
Tabela 5 – Acúmulo de biomassa em calos de <i>S. brasiliensis</i> expostos a diferentes concentrações de elicitores, após 60 dias em cultura sob ausência de luminosidade.....	59
Tabela 6 – Avaliação da quantidade de inóculo para o estabelecimento das culturas de células em suspensão de <i>S. brasiliensis</i> , após 21 dias.....	63
Tabela 7 – Valores de IC ₅₀ de extratos metanólicos de <i>S. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> e de materiais produzidos <i>in vitro</i> , determinados pelo teste de citotoxicidade através do MTT realizado em células K562.....	66
Tabela 8 – Valores de IC ₅₀ de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de <i>S. brasiliensis</i> cultivada <i>in vivo</i> , determinados pelo teste de citotoxicidade através do MTT realizado em células K562.....	67

Tabela 9 – Avaliação da morte de células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*.....77

Tabela 10 – Avaliação da morte de células K562 tratadas com doses correspondentes à metade dos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*.....79

Tabela 11 – Avaliação da fragmentação do DNA e distribuição das fases do ciclo celular em células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*.....81

Tabela 12 – Avaliação da fragmentação do DNA e distribuição das fases do ciclo celular em células K562 tratadas com doses correspondentes à metade dos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*.....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Ácido 1-naftaleno acético
ANOVA	Análise de variância
B5	Meio de cultura GAMBORG (1968)
BAP	6-benzilaminopurina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCC	Culturas de Agregados Compactos
CCS	Culturas de células em suspensão
CLAE-UV/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
IARC	Agência Nacional para a Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KCl	Cloreto de potássio
KIN	Cinetina (6-furfurilaminopurina)
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MJ	Metil jasmonato
MTT	3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PF	Peso fresco
PI	Iodeto de propídeo
PIC	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico

POH	Álcool perfílico
PS	Peso seco
RPMI 1640	Meio de cultura de células
SFB	Soro fetal bovino
SNAP	S-nitrosoglutationa
SnCl ₂	Cloreto estanoso
SNP	Nitroprusiato de sódio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TTC	2,3,5-trifenil tetrazólio
UV	Ultravioleta
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1.1 Família Marcgraviaceae Bercht. & J. Presl	20
1.2 <i>Schwartzia brasiliensis</i> (Choisy) Bedell ex Giraldo-Cañas	20
1.3 Metabólitos secundários ou especiais	23
1.4 O uso das plantas medicinais e toxicologia	24
1.5 Genotoxicidade associada a neoplasias	26
1.6 Substâncias de origem vegetal com atividade antineoplásica	29
1.7 Técnicas de cultura de tecidos vegetais aplicadas a plantas medicinais	30
1.7.1 <u>Calogênese, cultura de células em suspensão e elicitores</u>	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Material botânico	36
3.1.1 <u>Material vegetal mantido sob condições <i>in vivo</i></u>	36
3.1.2 <u>Material vegetal cultivado <i>in vitro</i></u>	36
3.2 Cultura de tecidos vegetais	37
3.2.1 <u>Indução de calogênese</u>	37
3.2.2 <u>Elicitação</u>	38
3.2.3 <u>Estabelecimento das culturas de células em suspensão</u>	39
3.2.4 <u>Análise estatística do material vegetal produzido <i>in vitro</i></u>	41
3.3 Preparo dos extratos vegetais	41
3.4 Avaliação do potencial genotóxico e antígenotóxico através do ensaio de eletroforese em gel de agarose com DNA plasmidial	42
3.5 Avaliação do potencial antineoplásico	43
3.5.1 <u>Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de redução do MTT</u>	43
3.5.2 <u>Avaliação da morfologia celular por microscopia óptica</u>	45
3.5.3 <u>Avaliação da morte celular por apoptose ou necrose</u>	45
3.5.4 <u>Avaliação da fragmentação do DNA e ciclo celular</u>	46
3.6 Análise do perfil fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo e Diodos (CLAE-UV-DAD)	46
4 RESULTADOS	48
5 DISCUSSÃO	90
CONCLUSÕES	100

PERSPECTIVAS	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
APÊNDICE	117

INTRODUÇÃO

1.1 Família Marcgraviaceae Bercht. & J. Presl

Composta por oito gêneros e 130 espécies, a família Marcgraviaceae é exclusivamente neotropical, sendo encontrada desde o sul do México até o norte da Bolívia e o sul do Brasil (GIRALDO-CAÑAS, 1999, PICCA & GIRALDO-CAÑAS, 1999; DRESSLER, 2004; GIRALDO-CAÑAS, 2004). No Brasil, ocorrem seis gêneros e 35 espécies, com registros em todos os estados (SOUZA, 2012).

O gênero *Schwartzia* Vell. está distribuído desde a Costa Rica e algumas ilhas do Caribe, até a Venezuela, Bolívia e Brasil, onde cresce em diferentes zonas de vegetação. Particularmente em nosso país, as espécies são geralmente encontradas em ambientes de restinga.

Por muito tempo, as espécies de *Schwartzia* foram inseridas no gênero *Norantea* Aublet (TRIANA & PLANCHON, 1862; SZYSZYLOWICZ, 1893; MACBRIDE, 1956; PUNT, 1971; KUMMROW, 1977; FERREIRA, 1982, 1995). Giraldo-Cañas (2004) descreveu pela primeira vez a mudança do gênero considerando algumas diferenças entre eles, com destaque para o tamanho do pedicelo que é longo em *Schwartzia* (1,4 a 9 cm de comprimento), enquanto é curto em *Norantea* (0,3-1,0 cm de comprimento). Além disso, em *Schwartzia* os nectários são sésseis e geralmente estão localizados na porção mediana a proximal do pedicelo, enquanto que em *Norantea* apresentam uma haste de 5-20 mm comprimento.

O Brasil é o segundo país em diversidade nesse grupo de plantas, apresentando 35 espécies (FERREIRA, 1995), depois da Colômbia, que apresenta 56-60 espécies (GIRALDO-CAÑAS, 2002). A espécie estudada no presente trabalho é a *Schwartzia brasiliensis*, conhecida popularmente como “agarrapé”, “rabo-de-arara”, “chinelo-de-anjo” e “pente-de-macaco” (FERREIRA, 1995; ZAMITH & SCARANO, 2004).

1.2 *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedell ex Giraldo-Cañas

Schwartzia brasiliensis é uma espécie nativa, de distribuição neotropical, encontrada do nordeste ao sul do Brasil, geralmente em restingas, ambientes que vêm sofrendo com a ação antrópica, onde tem sido registrado alto índice de degradação

(BARROS, 2009). Porém, também é encontrada em matas litorâneas ou pluviais, bem como em regiões paludosas (FERREIRA, 1995).

A espécie é arbustiva ou pode formar arvoretas que variam de três a oito metros de altura (Figura 1). Seu florescimento ocorre durante o verão e suas flores são hermafroditas, protândricas e auto-incompatíveis, estando organizadas em atraentes inflorescências terminais, com fase masculina e feminina. Apresenta nectários que atraem diversas espécies de aves (Figura 2), onde tem sido registrada a presença de pássaros (ROCCA et al., 2006 e 2008). Seu fruto de formato globoso e deiscência basal (Figura 3) contém sementes de forma semilunar, nem sempre viáveis ou em alta produção (FERREIRA, 1995).

A espécie desperta interesse no setor paisagístico, o que já concorreu para seu extrativismo não planejado; além disso, aspectos relacionados ao ambiente onde ela é encontrada, acarretaram a inserção de *S. brasiliensis* na lista de espécies ameaçadas de extinção no município do Rio de Janeiro (SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE, 2000).

Alguns estudos fitoquímicos realizados com a espécie revelaram a presença de triterpenos pentacíclicos que exibiram as atividades analgésica, anti-inflamatória, antitumoral e tripanocida (ROCHA, 2002). A atividade protetora do DNA também foi detectada a partir de extratos etanólicos do caule (AGRIPINO et al., 2004). Os testes realizados com *Trypanossoma cruzi* (ROCHA, 2002) indicaram 100% de inibição para o protozoário. Os potenciais antimalárico e antibacteriano também foram registrados pela primeira vez na espécie, a partir de extratos radiculares e foliares (MELLO, 2012; MELLO et al., 2014). Esses resultados estimulam estudos sobre outras atividades medicinais para as quais não existem relatos com a espécie em questão.



Figura 1 - *Habitus* arbustivo de *Schwartzia brasiliensis*. Local: Sub-bairro Região da Península - Barra da Tijuca - Rio de Janeiro. Barra: 1,0 cm.

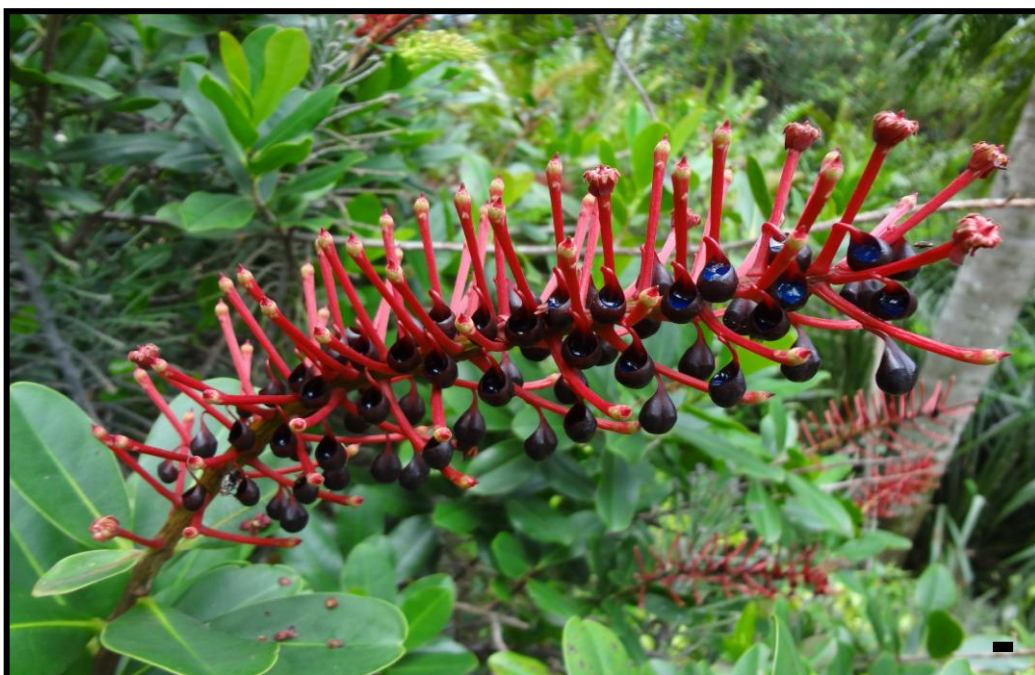


Figura 2 - Detalhe da inflorescência de *Schwartzia brasiliensis* exibindo nectários (seta). Local: Sub-bairro Região da Península - Barra da Tijuca - Rio de Janeiro. Barra: 1,0 cm.



Figura 3 - Detalhe do fruto de *Schwartzia brasiliensis* exibindo formato globoso. Local: Sub-bairro Região da Península - Barra da Tijuca - Rio de Janeiro. Barra: 1,0 cm.

1.3 Metabólitos secundários ou especiais

Os vegetais produzem uma grande diversidade de substâncias orgânicas que, de maneira geral, não têm função direta em seu crescimento e desenvolvimento, como ocorre com os metabólitos primários. Entretanto, estas substâncias conferem aos vegetais funções ecológicas importantes como proteção contra herbívoros, atrativos para animais polinizadores e ainda atuam na competição planta-planta (mecanismos de alelopatias) e nas simbioses planta-microrganismo. Também exercem papel protetor contra estresses abióticos, como déficit hídrico e alta irradiação (RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011; TAIZ & ZEIGER, 2013). Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários ou especiais (GOTTLIEB & BORIN, 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013).

A produção dos metabólitos especiais é considerada restrita a estágios específicos do desenvolvimento ou a determinadas condições ecológicas e ambientais em que se encontra o vegetal. Os metabólitos especiais têm sua origem a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato, sendo que alguns metabólitos originam-se por meio da combinação dos dois. Divididos em três grandes grupos quimicamente distintos, a saber, terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos, os metabólitos especiais são ainda distribuídos em diversas classes químicas como, por exemplo, alcaloides, ligninas, cumarinas, flavonoides, taninos, triterpenos e outros (SANTOS, 2004; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos especiais e derivam-se da união de unidades pentacarbonadas (conhecidas como unidades C₅) que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano e são sintetizados a partir de duas rotas diferentes a partir de metabólitos primários. Muitos terpenos apresentam importantes funções de defesa nos vegetais, como as saponinas, que possuem a capacidade de formar complexos esteroides, interferindo na sua absorção pelo sistema digestório ou desorganizar membranas celulares após entrar na corrente sanguínea (TAIZ & ZEIGER, 2013; SINGH & SHARMA, 2015).

Os compostos nitrogenados compreendem substâncias que apresentam nitrogênio integrando o anel heterocíclico da sua estrutura. Nesse grupo, destacam-se os alcaloides, com mais de 15.000 metabólitos especiais, sendo encontrados em

aproximadamente 20% de espécies vasculares. Além disso, estas substâncias são importantes na área farmacológica, destacando-se as propriedades antineoplásica e antioxidante (COSTA-LOTUFO et al., 2010; BOUCLE et al., 2015; PAN et al., 2015; QUZZAZ et al., 2016).

Em relação aos compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, que são substâncias aromáticas que contêm 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, apresentando uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, formando assim um sistema C6-C3-C6. Nos vegetais, representam um grupo de substâncias onde sua presença está relacionada principalmente a funções de defesa contra patógenos, proteção contra a radiação UV e atração de polinizadores (FERREYRA et al., 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013). Segundo Pereira & Cardoso (2012), já foram identificados mais de 8.000 tipos de flavonoides, sendo muitos deles conhecidos na área farmacológica. Na literatura, são diversos os trabalhos que revelam os benefícios na saúde humana com suas propriedades medicinais já comprovadas, incluindo a área da oncologia (AGRAWAL et al., 2011; FORBES et al., 2014; BOUCLE et al., 2015).

1.4 O uso das plantas medicinais e toxicologia

O uso de produtos naturais é uma das práticas mais antigas realizadas pelo homem. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e até mesmo bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e considera-se que a maioria dos fármacos usados é de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química a partir de produtos naturais (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Em relação às plantas com potencial medicinal, existem vastas fontes de informações, inclusive das culturas antigas, que indicam seu potencial. Por isso, estudos científicos vêm sendo desenvolvidos, com a finalidade de investigar a eficácia das plantas e substâncias por elas produzidas, que são amplamente utilizadas no preparo de fitoterápicos.

O termo fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é utilizado para o medicamento obtido quando se emprega exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004).

Em relação ao setor econômico, os fitoterápicos representam uma parcela significativa no mercado de medicamentos. Cerca de US\$ 21,7 bilhões são movimentados mundialmente por ano, e apesar de no Brasil não existirem dados oficiais, acredita-se que o mercado gire em torno de US\$ 160 milhões por ano, e que o ritmo de crescimento das vendas internamente é de mais de 15% anuais, contra apenas 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

Em fevereiro de 2009, foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), na qual estão presentes 71 espécies vegetais usadas popularmente e com estudos científicos que confirmam sua indicação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O uso medicinal dessas plantas envolve várias etapas que vão desde o cultivo até a administração, e embora sejam popularmente consideradas terapêuticas, deve-se considerar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, causando efeitos adversos, tal como a alteração no DNA, expressa principalmente como mutações (MARQUES et al., 2003; SARASIN, 2003, VARANDA, 2006).

Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registraram a ocorrência de 8.501 casos de intoxicação por plantas no Brasil no período de 2004 a 2008. Destas intoxicações, 12,4% estavam relacionadas a circunstâncias intencionais em que a vítima buscava propriedades farmacológicas da planta. No Rio de Janeiro foram observadas 415 intoxicações no mesmo período, sendo 12,8% relacionadas às mesmas circunstâncias intencionais (SINITOX, 2008). Por isso, para garantir a segurança e eficácia dos fitoterápicos são desenvolvidos estudos multidisciplinares nas áreas da botânica, química, biologia molecular, genética, farmacologia, toxicologia e outras.

Diante disso, modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, são importantes para a obtenção de informações sobre a toxicidade de uma droga em estudo. Entretanto, por motivos principalmente éticos e financeiros, a utilização de ensaios *in vitro* com células animais é mais recomendada para a realização inicial dos testes, com o intuito de pré-avaliar o potencial tóxico de determinada substância (VICENTE & DA COSTA, 2014).

Dentre as vantagens oferecidas pelos testes utilizando a cultura de células pode-se destacar o fornecimento de resultados rápidos, alta sensibilidade, controle químico e fisiológico, menor custo quanto comparado aos testes *in vivo*, além de representarem

uma alternativa para evitar o uso de animais em laboratório evitando questões éticas e morais desses ensaios (FRESHNEY, 1994; ROGERO et al., 2003).

O cultivo de células animais iniciou-se a partir do século XX e foi desenvolvido inicialmente como um método para estudar o comportamento de células fora do organismo, em um ambiente controlado. Atualmente, com os avanços das pesquisas, muitos testes *in vitro* foram padronizados utilizando-se os mais diversos tipos de linhagens celulares (AMARAL & MACHADO-SANTELLI, 2011).

A avaliação do potencial citotóxico de uma planta pode ser realizada através de diferentes testes que avaliam se o material com potencial medicinal também pode causar possíveis efeitos sobre a morfologia, viabilidade e proliferação celular.

Diversas são as metodologias que podem ser utilizadas para os ensaios de citotoxicidade, sendo os métodos colorimétricos os mais comuns. Entre esses, estão o ensaio de viabilidade celular por exclusão com azul de tripan, o ensaio de incorporação do corante vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina) e a técnica de avaliação da atividade mitocondrial através da redução do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio) (WEYERMANN et al., 2005). Esta última metodologia tem como princípio a absorção do sal MTT pelas células, reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan, sendo possível detectar células metabolicamente ativas, onde sua concentração também é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro. Dentre as vantagens dessa técnica, destacam-se a reprodutibilidade, a rapidez e a possibilidade de avaliar muitas concentrações da droga testada ao mesmo tempo, podendo direcionar as pesquisas posteriores (MOSMANN, 1983). Considerando esses aspectos, os testes de citotoxicidade têm sido aplicados norteando as pesquisas com substâncias que apresentam diversos potenciais medicinais.

1.5 Genotoxicidade associada a neoplasias

O material genético dos seres vivos é definido por uma ordem específica de nucleotídeos na molécula de DNA, que são vulneráveis às agressões impostas por agentes naturais e artificiais, de diferentes origens, levando a lesões e alterações na sua estrutura ou composição química (DÜSMAN et al., 2012; SWIFT & GOLSTEYN, 2014).

Diariamente, milhões de pessoas em todo o mundo estão expostas a agentes que induzem alterações cromossômicas e o surgimento de mutações. Medicamentos, plásticos, vidros, detergentes, cosméticos, agrotóxicos, além de poluições e radiação solar são exemplos desses agentes (GRISOLIA, 2005; COGGON et al., 2015); JEBELLI et al., 2015, MOAN et al., 2015). Porém, dentre os principais agentes relacionados à exposição humana, pode-se citar a dieta, não só pela própria composição dos alimentos, mas também pelo que é usado no seu tempero e preparo. Além disso, diversos hábitos como fumar e ingerir bebidas alcoólicas são fatores que ajudam ao surgimento de danos genéticos (ANZUINI et al., 2011; DÜSMAN et al., 2012, LU et al., 2013; MOAN et al., 2015).

Como foi dito, a exposição a um determinado fator pode levar a um efeito nocivo ao organismo, como a indução de alterações cromossômicas, que por sua vez podem levar a outros efeitos, como a indução de neoplasias.

Câncer ou neoplasia (*neo* = novo, *plasia* = formação) é o nome que se dá a um grupo de doenças que têm em comum a proliferação celular excessiva e descontrolada que persiste mesmo após estímulo inicial que a causou ter cessado. Ou seja, o câncer acontece quando uma célula normal perde o controle e passa a proliferar de forma desenfreada (MALZYNER & CAPONERO, 2013).

As características morfológicas mais marcantes das células cancerosas são: i) anormalidades no núcleo: volumoso, múltiplos, nucléolos visíveis, hiperploídia; ii) anormalidades no tamanho das células: heterogêneas; iii) anormalidades citoplasmáticas: aumento da relação citoplasma-núcleo; iv) anormalidades da membrana citoplasmática: perda da inibição por contato, modificação da adesividade, modificação dos antígenos de superfície, entre outras (APTSIAURI et al., 2007).

A descrição mais antiga do surgimento e tratamento do câncer data de 2.500 a.C. no Egito, sendo atribuída ao sacerdote egípcio Imhotep, que descreve “uma massa protuberante no seio” que foi cauterizada com o auxílio de uma broca de fogo. No século 19, com a melhoria das condições de higiene e assepsia e com o advento da anestesia, tornou-se possível a remoção cirúrgica dos tumores, que passou a ser recomendado como tratamento primário da doença (MALZYNER & CAPONERO, 2013). Hoje, já foram descritos mais de 100 tipos de câncer malignos (INCA, 2013).

Atualmente, o câncer é a doença que mais mata no mundo, e o número tende a aumentar acentuadamente, devido, em parte, ao envelhecimento da população mundial (VISVADER, 2011). Segundo dados da Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), a mortalidade por câncer

subiu de 7,6 milhões de pessoas em 2008, para 8,2 milhões em 2012, refletindo principalmente a expansão da doença nos países em desenvolvimento, e há a projeção de 27 milhões de novos casos para o ano de 2030 em todo o mundo, e 17 milhões de mortes pela doença (OMS, 2013).

No Brasil, os tipos mais comuns de neoplasias malignas são os tumores de próstata em homens, e de mama em mulheres. O Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou para 2014, 576 mil novos casos da doença (Figura 4) (INCA, 2013).

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%	Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%	Glândula Tíreoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%	Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%	Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%	Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	Leucemias	4.320	1,6%

Figura 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: www.inca.com.br

A identificação de um sinal ainda nas fases iniciais da formação e progressão de câncer pode reduzir a gravidade da doença, porém o diagnóstico precoce normalmente não ocorre, tornando a eficiência do tratamento baixa.

Estudos mostram que a detecção precoce do câncer pode oferecer uma variedade de novas oportunidades eficientes e de baixo custo para o tratamento (DONG et al., 2014). Atualmente, os tratamentos indicados são realizados por meio de cirurgia, transplante de medula óssea, radioterapia e quimioterapia, sendo, em muitos casos, necessário combinar mais de uma modalidade, variando apenas a ordem quanto à importância de cada uma e sua indicação (INCA, 2013).

A mais indicada geralmente é a quimioterapia onde utilizam-se medicamentos, denominados genericamente de “quimioterápicos”, que são aplicados, em sua maioria, na corrente sanguínea, podendo também ser administrados por outras vias (INCA, 2013). Porém, este tipo de tratamento geralmente ocasiona diversos efeitos colaterais e afeta células saudáveis. Dessa forma, como alternativa, tem sido buscado agentes antineoplásicos que sejam mais eficientes e que possam reduzir esses efeitos.

1.6 Substâncias de origem vegetal com atividade antineoplásica

A busca por agentes antineoplásicos a partir de fontes vegetais ficou fortemente registrada na década de 1950 com a descoberta dos alcaloides vimblastina e vincristina, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), popularmente denominada vinca, com efeitos comprovados (SANTOS & ELISABETSKY, 1999). Atualmente, cerca de 60% do total dos produtos utilizados no combate à doença é derivada direta ou indiretamente de fontes naturais, incluindo plantas e microrganismos (BUTLER, 2008; CHANG et al., 2012) e muitos já são utilizados comercialmente (Tabela 1).

Tabela 1 – Alguns fármacos de origem vegetal usados no tratamento do câncer.

Fármaco	Fonte	Alvo Molecular	Indicação terapêutica
Vimblastina (1), vincristina (2), vindesina (3) e vinorelbina (4)	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Paclitaxel (5) e docetaxel (6)	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina (7) Etoposídeo (8) e teniposídeo (9)	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda;
Camptotecina (10) Topotecano (11) e irinotecano (12)	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon

Legenda: 1: Velban®; 2: Oncovin®; 3: Eldisine®; 4: Navelbine®; 5: Taxol®, 6: Taxotere®; 7: podofilotoxina; 8: Etopophos®; 9: Vumon®; 10: camptotecina; 11: Hycamtin®, 12: Camptosar®

Fonte: adaptado de COSTA-LOTUFO et al., 2010.

A espécie *Taxus brevifolia* (Taxaceae) produz um alcaloide diterpênico, conhecido como taxol, o qual foi demonstrado ter atuação contra o câncer de ovário (GUCHELAAR et al., 1994). Da casca de *Tabebuia impetiginosa* (Bignoniaceae), espécie nativa do Brasil, foram extraídos β -lapachona e lapachol, sendo o lapachol vendido no Brasil pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), e utilizado para o tratamento de várias neoplasias (MELO et al., 2011).

Nesse contexto, diversos estudos vêm sendo realizados com extratos vegetais e têm revelado a existência de substâncias capazes de prevenir danos causados ao organismo que podem levar ao aparecimento do câncer. Por exemplo, modelos utilizando bactérias e células de mamíferos já foram testados quanto à genotoxicidade, utilizando extratos de plantas nativas do Brasil como *Pyrostegia venusta* (Bignoneaceae), *Cecropia glaziovii* (Cecropiaceae), *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) e *Schwartzia brasiliensis* (Marcgraviaceae) (STANGE et al., 2008; MAGALHÃES, 2010; SOARES et al., 2014; MELLO et al., 2015), os quais tiveram seu potencial antigenotóxico comprovado, assim como baixo efeito genotóxico.

Assim, metodologias recentes, cada vez mais modernas de isolamento e identificação de substâncias naturais, têm propiciado o aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para inúmeras indicações terapêuticas. Considerando que os vegetais e seus produtos ainda representam uma das principais fontes de substâncias com potencial anticâncer (SHAH et al., 2013), torna-se de grande relevância a busca por agentes naturais com ação antineoplásica. Contudo, a extinção de espécies vegetais tem assumido valores crescentes e se tornado um problema mundial (MEDEIROS, 2003). Além disso, o conteúdo de metabólitos pode variar conforme a localização geográfica da espécie, assim como condições sazonais e climáticas (RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011). Dessa forma, torna-se importante a produção vegetal em larga escala, de forma controlada, visando à conservação da biodiversidade e a busca por substâncias de interesse medicinal (KARUPPUSAMY, 2009).

1.7 Técnicas de cultura de tecidos vegetais aplicadas a plantas medicinais

As técnicas de cultura de tecidos vegetais permitem a obtenção de plantas e substâncias *in vitro*, em meio nutritivo artificial sob condições assépticas e incluem diferentes metodologias. Dentre suas aplicações, pode-se citar a propagação *in vitro* ou micropropagação, que usa a cultura de tecidos organizados, como a cultura de órgãos, meristemas, ápices caulinares, segmentos nodais, embriões e raízes isoladas; e a cultura de tecidos desorganizados, como a calogênese e a cultura de células em suspensão, que constituem sistemas amplamente empregados para a síntese de metabólitos (GUERRA & NODARI, 2006, GEORGE, 2008).

Fatores como a composição dos meios de cultivo, quantidade de luz (intensidade e fotoperíodo), temperatura, tamanho do explante, condições fisiológicas e fitossanitárias da planta matriz e concentração dos fitorreguladores utilizados (BAQUE et al., 2010; JARDIM et al., 2010), contribuem para a morfogênese *in vitro* (GAO et al., 2010) e devem ser estudados antes de iniciar os experimentos.

Em relação ao uso de fitorreguladores, usualmente são adicionados ao meio de cultura a fim de induzir modificações frente às respostas de crescimento e desenvolvimento do explante. As classes mais usadas são citocininas e as auxinas, consideradas as mais importantes substâncias reguladoras do crescimento para a cultura de tecidos vegetais (GEORGE, 2008). As auxinas são comumente utilizadas para diferenciação celular, possuindo também aplicação na formação de raízes e calos. Paralelamente, as citocininas são responsáveis por induzir a divisão celular. Em combinação, na maior parte das vezes, promovem a formação e crescimento de calos, células em suspensão e órgãos (GEORGE, 2008).

1.7.1. Calogênese, cultura de células em suspensão e elicitores

Uma das técnicas mais empregadas nos trabalhos de cultura de tecidos vegetais é a calogênese, que consiste na obtenção de massas celulares desorganizadas denominadas calos. A técnica baseia-se no cultivo de segmentos vegetais que podem ser oriundos de diferentes órgãos, inoculados em um meio de cultura previamente definido, contendo fitorreguladores, que irão induzir a diferenciação celular. Essas células são estimuladas a entrar em um processo de divisão, originando o calo (GEORGE, 2008).

Os calos são, geralmente, classificados como friáveis, quando são formados por células sobrepostas que se desagregam com facilidade; ou compactos, que apresentam consistência mais dura e resistente, e algumas vezes um aspecto aveludado (GEORGE, 2008).

Os calos friáveis são geralmente utilizados para dar início às culturas de células em suspensão (CCS), onde os inóculos são colocados em meio de cultura líquido e mantidos sob agitação por período de tempo desejado. As CCS são consideradas o principal sistema de produção de metabólitos secundários *in vitro*, que podem ser produzidos e excretados para o meio de cultura. Neste caso, facilita sua extração,

tornando-se uma metodologia vantajosa quando comparada a outras que visam à síntese de substâncias *in vitro* (IKEUCHI et al., 2013).

Diversos estudos usando tanto a calogênese quanto a cultura de células em suspensão já alcançaram resultados positivos para a produção de metabólitos *in vitro*, como a produção de antocianinas com a espécie *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009, SIMÕES-GURGEL et al., 2011), fenilpropanoides em *Buddleja cordata* (ESTRADA-ZÚÑIGA et al., 2009), camptotecina em *Camptotheca acuminata* (LU et al., 2011), resveratrol em *Vitis vinifera* (JEANDET et al., 2014) e betalainas em *Pereskia aculeata* (LAGE et al. 2015).

Visando aumentar a produção de metabólitos de interesse *in vitro*, é comum o uso de elicitores, substâncias que, quando introduzidas em pequenas concentrações na cultura, iniciam ou melhoram a biossíntese de metabólitos (NAMDEO, 2007). A influência dos estimuladores depende de diversos fatores, como concentração, estágio de crescimento em que se encontra a cultura, tempo de estimulação e a especificidade do elicitador (BOURGAUD et al., 2001; PATEL & KRISHNAMURTHY, 2013).

Os elicitores são classificados de acordo com sua natureza e podem ser de origem biótica, como por exemplo, metil jasmonato (MJ), quitosana, extratos de proteínas, bactérias etc. ou abiótica, como temperatura, UV, luz, pH etc.

Em relação ao elicitores de origem biótica, o MJ foi descrito pela primeira vez em plantas como um composto de cheiro doce de jasmim, o que deu origem ao seu nome (CREELMAN & MULLET, 1995). É considerado um importante regulador do desenvolvimento dos vegetais, bem como dos mecanismos de resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos (AVANCI et al., 2010; BALUSAMY et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Na cultura de tecidos vegetais, a adição de MJ vem sendo amplamente utilizada na elicitação de diferentes espécies. O aumento da quantidade de raízes adventícias de *Eleutherococcus koreanum* utilizando biorreatores (LEE et al., 2015), o acúmulo de antocianinas em cultura de raízes de *Kalanchoe blossfeldiana* (GÓRAJ-KONIARSKA et al., 2015) e a produção de taxol em cultura de células imobilizadas de *Taxus globosa* (OSUNA et al., 2015) são exemplos do uso e eficácia de MJ como elicitador.

Atualmente, algumas substâncias vêm sendo utilizadas como estimuladores da resposta *in vitro*, porém ainda não foram definidas como elicitores, tendo seu papel investigado. Dentre essas substâncias, pode-se citar o óxido nítrico.

O estudo da função do óxido nítrico (NO) no metabolismo vegetal iniciou-se no fim da década de 70 (KLEPPER, 1975; KEPLER, 1979), quando foi comprovado que a sua produção em plantas de soja tratadas com herbicidas era diretamente proporcional à quantidade utilizada do agente químico. Contudo, a partir do final dos anos 90, houve um incremento nas pesquisas com plantas, indicando a ação da substância em diversos eventos da fisiologia vegetal (Quadro 1).

Quadro 1 – Efeitos do óxido nítrico no crescimento e desenvolvimento das plantas.

		Processo fisiológico	Efeito
Crescimento e Desenvolvimento		Expansão foliar	Indução
		Crescimento radicular	Indução
		Senescência	Retardo
		Germinação de semente	Estimulação
		Desestiolamento	Estimulação
		Alongamento do hipocótilo	Inibição
		Amadurecimento de frutos	Inibição
		Abertura/Fechamento estomático	Estimulação/Inibição

Fonte: Adaptado de PALAVAN-UNSAI & ARISAN (2009).

A adição de NO na cultura de tecidos vegetais geralmente ocorre através da utilização de doadores de óxidos nitrogenados, que irão produzir óxidos nítricos, mimetizando uma resposta relacionada ao NO endógeno ou mesmo substituindo-o, quando ausente. Os mais comuns são o nitroprusiato de sódio (SNP) e o *s*-nitrosoglutationa (SNAP) (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006).

Assim como os fitorreguladores, o uso dos doadores de NO é dependente da concentração, de modo que altas concentrações podem causar inibição de um determinado processo ou até levar à citotoxicidade celular (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006).

Pesquisas recentes têm indicado o aumento da competência de regeneração *in vitro* com o uso de NO e também seu papel na elicitação de substâncias do metabolismo vegetal. O aumento na resposta calogênica, rizogênica e na produção de brotos foi verificado em *Linum usitatissimum* (KALRA & BABBAR, 2010; LI et al., 2011), assim como a proteção contra estresses abióticos (KOPYRA & GWÓZDZ et al., 2004) e a maior da produção de metabólitos secundários (taninos, flavonoides, saponinas e compostos fenólicos) em culturas de células de *Ginkgo biloba* (EL-BELTAGI et al.,

2015). Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre produção vegetal envolvendo esta molécula e seus efeitos na resposta *in vitro*.

Em relação aos estudos *in vitro* com *S. brasiliensis*, espécie estudada no presente trabalho, já foram estabelecidos protocolos para a produção de brotos e conservação *in vitro*, por meio de crescimento lento e criopreservação (SÁ et al., 2007; SÁ, 2010), além do estabelecimento de culturas de raízes (MELLO, 2012). Porém, estudos envolvendo calogênese e suspensões celulares, bem como o uso de elicitores ainda não foram realizados para a espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Definir um protocolo eficiente para o estabelecimento de culturas de calos e de células em suspensão de *Schwartzia brasiliensis* visando à avaliação do potencial genotóxico, antigenotóxico, antineoplásico e análise fitoquímica de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Específicos

- Analisar o efeito de diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores, tipos de explantes e luminosidade no estabelecimento de cultura de calos friáveis;
- Avaliar a influência de elicitores no aumento de biomassa e na produção de metabólitos secundários de interesse em calos friáveis;
- Estabelecer um protocolo para a cultura de células em suspensão avaliando-se o tamanho do inóculo e viabilidade celular;
- Avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico do material obtido *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o potencial antineoplásico do material obtido *in vivo* e *in vitro*;
- Analisar, por cromatografia líquida de alta eficiência, a produção de metabólitos secundários em materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

3.1.1 Material vegetal mantido sob condições *in vivo*

Como fonte de material biológico mantido sob condições *in vivo* para o preparo de extratos vegetais, foram utilizados folhas, caules e raízes de *S. brasiliensis* coletados de uma população na parte da manhã em uma restinga preservada, situada no Sub-bairro Península (22°59'29.7"S - 43°20'48.4"W), localizado na Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, no período compreendido entre dezembro de 2011 e março de 2012. O material vegetal foi coletado com licença do SISBIO/IBAMA número 3299651. Um exemplar representativo de *S. brasiliensis* encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro HRJ 11749.

3.1.2 Material vegetal cultivado *in vitro*

Sementes coletadas na restinga preservada situada do Condomínio Península, localizado na Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, no período entre dezembro de 2011 e março de 2012, foram lavadas três vezes (5 min) com solução de detergente comercial (10%), sob agitação, seguida da desinfestação em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2% acrescido de Tween 20 a 0,001% (60 min). Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a três lavagens com água estéril e, após a remoção do excesso de água com papel de filtro, inoculadas em meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968), contendo sacarose a 2%. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C por 15 min) e o meio foi gelificado com agar (Merck®) a 0,8%. Foi inoculada uma semente por tubo de ensaio (20 x 250 mm) contendo 10 mL de meio de cultura e vedado com tampa de alumínio. O material foi mantido em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de $45\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes, sob fotoperíodo de 16 horas. Após 90 dias da semeadura, as plantas foram utilizadas para iniciar os experimentos *in vitro*.

3.2 Cultura de tecidos vegetais

Os experimentos de cultura de tecidos vegetais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.2.1 Indução de calogênese

Para início das culturas foram utilizados segmentos caulinares com um nó (0,5 cm), foliares (0,5 cm²) e radiculares (1 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, que foram inoculados em meio de cultura B5 acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose suplementado com diferentes auxinas ácido 1-naftaleno acético (ANA), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (PIC); ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e citocininas (6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (6-furfurilaminopurina) (KIN)) nas concentrações de 0,5; 2,5; 5,0 e 7,5 mg.L⁻¹, utilizadas isoladas ou em combinação (Tabela 2). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C por 15 min) e gelificado com ágar (Merck®) 0,8%. Foram utilizados frascos de vidro (5 x 5,5 cm), contendo 30 mL de meio de cultura, vedados com tampas plásticas transparentes. Em cada frasco, explantes caulinares e radiculares foram inoculados em posição horizontal, enquanto explantes foliares foram inoculados com a parte abaxial em contato com o meio. Foram inoculados três explantes por frasco, totalizando cinco frascos por tratamento. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 26±2°C, na presença de luz (45 μmol m⁻²s⁻¹), sob fotoperíodo de 16h, ou na ausência de luminosidade. Foram realizadas subculturas mensais para meios de igual composição por um período de três meses. Ao final desse período, os calos foram avaliados quanto à produção de biomassa, coloração e consistência. A biomassa calogênica foi obtida a partir de aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS) dos calos, após secagem em estufa a 45°C, com tempo variando de acordo com a biomassa.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura utilizados para indução de calogênese de *Schwartzia brasiliensis* a partir de explantes caulinares, foliares e radiculares.

Meios de cultura	PIC (mg.L ⁻¹)	KIN (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)	ANA (mg.L ⁻¹)	2,4-d (mg.L ⁻¹)
B50	-	-	-	-	-
1	2,5	0,5	-	-	-
2	5,0	0,5	-	-	-
3	7,5	0,5	-	-	-
4	2,5	-	-	-	-
5	5,0	-	-	-	-
6	7,5	-	-	-	-
7	-	-	2,5	0,5	-
8	-	-	5,0	0,5	-
9	-	-	7,5	0,5	-
10	-	-	-	-	2,5
11	-	-	-	-	5,0
12	-	-	-	-	7,5

Legenda: PIC= ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico; KIN= cinetina (6-furfurilaminopurina); BAP= 6-benzilaminopurina; ANA= ácido 1-naftaleno acético; 2,4-D= ácido 2,4 diclorofenoxiacético.

Com base nos resultados alcançados no estabelecimento das culturas de calos, foi realizada a manutenção das culturas que apresentaram maior produção de biomassa, com formação de calos friáveis. O subcultivo foi realizado a cada 30 dias onde os calos eram transferidos para meio de igual composição, no qual as culturas foram ampliadas, e mantidas nas mesmas condições de crescimento.

3.2.2 Elicitação

3.2.2.1 Avaliação do efeito do óxido nítrico na morfogênese in vitro

Para início da avaliação do efeito do NO sobre a resposta morfogênica, foram iniciadas culturas a partir de segmentos caulinares com um nó (0,5 cm), foliares (0,5 cm²) e radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, que foram inoculados em meio de cultura B5 acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com o doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), nas concentrações de 1, 3, 5 e 10µM. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C por 15 min) e gelificado com agar (Merck®) 0,8%. Foram utilizados frascos de vidro (5 x 5,5 cm), contendo 30 mL de meio de cultura, vedados com tampas plásticas transparentes. Em cada frasco, explantes caulinares e radiculares foram inoculados em posição horizontal, enquanto explantes foliares foram inoculados com a parte abaxial em contato com o meio. Foram inoculados três explantes por frasco, totalizando cinco

frascos por tratamento. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 h, com luminosidade de $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes. Foram realizadas subculturas mensais para meios de igual composição por um período de três meses. Ao final desse período foi avaliada a resposta morfológica dos explantes.

3.2.2.2 Avaliação do efeito do óxido nítrico e do metil jasmonato na calogênese

Calos com 60 dias de cultivo, mantidos em estoque com acúmulo de massa calogênica, foram expostos a diferentes concentrações (1, 3 e $5\ \mu\text{M}$) dos elicitores MJ e SNP. As culturas foram mantidas por 60 dias nas mesmas condições de crescimento.

Ao final desse período, o acúmulo de biomassa foi obtido a partir de aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS) dos calos, após secagem em estufa a 45°C . Foram inoculados dois calos por frasco contendo 30 mL de meio, totalizando 6 frascos para cada tratamento.

3.2.3. Estabelecimento das culturas de células em suspensão

Calos friáveis elicitados, com 60 dias de cultivo, desenvolvidos no meio de cultura que propiciou a maior produção de biomassa, foram selecionados para iniciar as culturas de células em suspensão (CCS). Com o objetivo de estabelecer a quantidade de massa calogênica mais adequada para o início das CCS, foram avaliados inóculos de 1,5; 2,0 e 3,0 g. Em câmara de fluxo laminar, os calos foram amassados em placas de Petri com o auxílio de uma espátula. Pequenas porções de massa calogênica foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis, os quais foram pesados em balança de precisão até se obter o inóculo desejado. Em seguida, os inóculos foram colocados em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura líquido B5 com a mesma suplementação hormonal do meio da elicitação. Os frascos erlenmeyer foram vedados com tampas duplas de papel alumínio.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada tratamento foram realizadas dez repetições, sendo cada erlenmeyer uma repetição. Cada experimento foi repetido duas vezes. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob intensidade luminosa de 45

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, sob agitação em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm. Após três semanas, o crescimento das culturas foi avaliado pela aferição do PF e do PS. Para determinação do PF, em câmara de fluxo laminar, as CCS foram filtradas a vácuo, em filtrador Nalgene®, com filtro de nylon (45 μm). As células foram colocadas em frascos de vidro e pesadas em balança de precisão (AND mod. HR-200). Para a determinação do PS, as células foram colocadas em placas de Petri e secas em estufa a 45°C, até peso constante.

Avaliou-se, ainda, a viabilidade celular, a qual foi determinada utilizando-se o teste topográfico de tetrazólio, pelo qual células viáveis, em contato com solução de TTC (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio), adquirem coloração vermelha observada a olho nu. Após filtração, cerca de 0,5 g de célula de cada cultura foi colocado em eppendorf de 2 mL e foi adicionado 1 mL de solução de TTC 1% (p/v). Após 5 h, a 30°C, sob ausência de luz, avaliou-se a coloração das células, a fim de distinguirem-se as culturas viáveis das não viáveis (LOYOLA-VARGAS & VÁZQUEZ-FLOTA, 2006).

Após a definição dos melhores parâmetros para o estabelecimento das CCS, objetivou-se definir a curva de crescimento, visando estabelecer o período adequado para o subcultivo das culturas. O crescimento das CCS foi acompanhado durante 31 dias, sendo que a cada três ou quatro dias, três erlenmeyers foram retirados aleatoriamente para avaliação do aumento do PF e do PS, após filtração a vácuo, em filtrador Nalgene®, com filtro de nylon (45 μm). Avaliou-se, ainda, a viabilidade celular, conforme descrito anteriormente. As culturas permaneceram nas condições ambientais indicadas acima.

Com o objetivo de avaliar a capacidade de manutenção das CCS por sucessivas subculturas, acompanhou-se o acúmulo de biomassa por cinco subculturas. Realizou-se o subcultivo das CCS conforme definido pela curva de crescimento. As culturas foram mantidas nas melhores condições de cultivo. A cada subcultura, as CCS foram filtradas a vácuo, sendo que a mesma quantidade de inóculo inicial foi transferida para meio fresco de igual composição. Ao final de cada subcultura, avaliou-se o aumento do PF das CCS. Foram realizadas 10 repetições por subcultura. As culturas permaneceram nas mesmas condições de cultivo descritas anteriormente.

3.2.4 Análise estatística do material vegetal produzido *in vitro*

Os resultados obtidos nas etapas de calogênese, elicitação e culturas de células em suspensão foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de peso fresco e peso seco foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando significativas as diferenças com $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

3.3 Preparo dos extratos vegetais

Os experimentos de análises fitoquímicas foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Folhas, caules e raízes frescos obtidos de plantas mantidas sob condições *in vivo*, assim como calos e suspensões celulares frescos produzidos *in vitro*, foram pesados e secos em estufa a 40°C, até peso constante, sendo aferidas as massas de matéria fresca e seca.

Após a secagem, o material foi triturado até a obtenção de pó, o qual foi submetido à extração com álcool metílico P.A. (Merck) durante 15 dias, no escuro, a 26 ± 2 °C, sob agitação em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm. Os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro Whatman (n° 1) e o solvente evaporado em rotaevaporador, sob pressão reduzida a 40°C, sendo obtidos os extratos brutos metanólicos de caules, folhas e raízes.

Posteriormente, três gramas de cada extrato metanólico do material mantido sob condições *in vivo* foram utilizados para obter frações através do processo de extração utilizando solventes de polaridades distintas: hexano P.A (Merck), diclorometano P.A. (Vetec), acetato de etila P.A. (Vetec), e água destilada. Após cada etapa, o solvente foi evaporado, conforme as condições descritas acima. Para a obtenção das frações aquosas, os extratos foram liofilizados. Os extratos brutos, bem como suas respectivas frações, foram armazenados a 4° C no escuro até a sua utilização.

3. 4 Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico através do ensaio de eletroforese em gel de agarose com DNA plasmidial

Os experimentos do potencial genotóxico e antigenotóxico foram realizados no Laboratório de Radio e Fotobiologia (LRF-6), e no Laboratório de Análises Moleculares de Plantas (LAMP), ambos do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os potenciais genotóxico e antigenotóxico dos extratos de *S. brasilienses* foram avaliados de acordo com o ensaio descrito por Caldeira-de-Araujo e colaboradores (1996), considerando a alteração do padrão de migração eletroforética de DNA plasmidial. O ensaio é baseado nas diferentes conformações espaciais que as moléculas de DNA plasmidial podem assumir. A forma superhelicoidizada (ou forma I) é mantida apenas se não houver quebras na molécula e migra com velocidade maior no gel de agarose. Quebras simples na hélice de DNA modificam a sua topologia (forma II ou de círculo aberto), fazendo com que a migração das moléculas no gel seja mais lenta. Finalmente, quebras duplas promovem a linearização do DNA (forma III ou linear) e acarretam um padrão de migração intermediário entre as formas I e II. Paralelamente, para avaliar o potencial antigenotóxico dos extratos, o ensaio também foi realizado com adição de cloreto estânico (SnCl_2), um agente sabidamente genotóxico, que promove quebras na molécula de DNA plasmidial, alterando sua conformação espacial e, conseqüentemente, sua velocidade de migração eletroforética em gel de agarose (CALDEIRA-DE-ARAÚJO et al., 1996; DE MATTOS et al., 2000).

O plasmídeo empregado nesta avaliação foi o pUC 9.1, que contém um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina e estava estocado na cepa de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ. Essa bactéria, por sua vez, possui gene para resistência ao antibiótico canamicina. Para extração e purificação do DNA plasmidial, uma alíquota (100 μ L) do estoque em glicerol da cepa DH5 α F'IQ, contendo o plasmídeo pUC 9.1, foi acrescentada ao meio nutritivo (10 mL de meio LB (LURIA & BERTANI, 1957) contendo os antibióticos canamicina - 40 μ g/mL - e ampicilina - 50 μ g/mL) e mantida sob agitação a 37°C, até atingir a fase estacionária de crescimento. Ao final de 18 horas de crescimento da cultura bacteriana, as etapas de obtenção do DNA plasmidial foram feitas de acordo com o protocolo do kit de extração Invisorb® Spin Plasmid Mini Two, da Invitek.

Diferentes concentrações dos extratos brutos e suas frações (25, 125 e 250 µg/mL) foram incubadas com 200 ng de DNA plasmidial na presença ou não de SnCl₂ (200 µg/mL), em temperatura ambiente, durante 40 minutos. Foram realizados dois controles sem a adição de extratos: um na presença e outro na ausência do SnCl₂. Todas as diluições foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q system).

Em seguida, 10 µL de cada amostra foram misturados com 2 µL de tampão de carregamento (*loading buffer* - 0.25%; xilenoceanol; 0.25% azul de bromofenol; 30% glicerol em água), sendo em seguida aplicada a um gel (0,8% de agarose) em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e submetido a eletroforese a 70 volts, por cerca de 50 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), as bandas de DNA visualizadas por fluorescência em um sistema de transiluminação ultravioleta (UVP transilluminator) e as imagens digitalizadas por meio de um sistema Canon XYZ de captura de imagem representando apenas uma análise qualitativa. Para a análise quantitativa do DNA plasmidial foi utilizado o programa Image J. Os experimentos foram repetidos três vezes e as imagens apresentadas no item resultados são representativas dos melhores géis obtidos ao longo do desenvolvimento do trabalho.

3. 5 Avaliação do potencial antineoplásico

Os experimentos do potencial antineoplásico foram realizados no Laboratório de Oncologia Molecular (ONCOMOL), do Departamento de Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

3.5.1 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de redução do MTT

Foram utilizadas linhagens de células K562 (leucemia mieloide crônica - ATCC: CCL-243) mantidas em meio RPMI 1640. O meio foi suplementados com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina – 100U/mL), e as células mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Os extratos brutos metanólicos obtidos de *S. brasiliensis* cultivada *in vivo* (caule, folha e raiz) e *in vitro* (culturas de calos, calos elicitados e CCS), foram diluídos a 100 mg/mL em DMSO (MERCK), com o auxílio de sonicador, por 30 minutos, sendo então

aliquotados e estocados a - 20°C até o momento de sua utilização, quando foram diluídos em meio RPMI sem soro. Os extratos brutos metanólicos foram testados em seis concentrações, variando de 600 µg/mL a 18,75 µg/mL (600, 300, 150, 75, 37,5 e 18,75 µg/mL). Para as frações obtidas foram testadas oito concentrações, entre 100 µg/mL e 0,7812 µg/mL (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 e 0,7812 µg/mL).

Para os ensaios de citotoxicidade, amostras de células K562 foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^4 células por poço) e incubadas por 24 horas na presença dos extratos escolhidos. Cada concentração foi testada em quadruplicata. Além disso, foi realizado o controle de células, o qual consistiu apenas de células com meio, o controle com DMSO, que foi o veículo de diluição dos extratos, de 0,6% a 0,1% e que corresponde a 100% de sobrevivência celular, e o controle positivo com álcool perfílico (POH) a 1500 µM.

Após 20 horas de incubação, foram adicionados 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL em cada poço da placa. O MTT foi previamente preparado em solução tampão fosfato salina (PBS pH - 7,2) e, em seguida, as placas foram incubadas no escuro a 37°C, por um período de quatro horas.

Ao término deste período, as placas foram centrifugadas por três minutos a 354xg, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO puro para a solubilização dos cristais de formazan. A placa ficou sob agitação por 20 minutos no escuro e a quantificação foi feita através da leitura da densidade óptica (DO) por espectrofotômetro (TP Reader NM - ThermoPlate) em comprimento de onda de 545nm.

A média das leituras foi calculada para cada concentração testada, sendo utilizada a comparação com a média da DO obtida para o controle de células em presença do veículo DMSO, a fim de obter a porcentagem de células viáveis.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{(DO \text{ das células tratadas} - DO \text{ do branco})}{(DO \text{ do controle de DMSO} - DO \text{ do branco de DMSO})} \times 100$$

O cálculo do IC₅₀ foi realizado por regressão linear utilizando o programa Graph Pad Prism – versão 5.0.

3.5.2 Avaliação da morfologia celular por microscopia óptica

Na avaliação da morfologia, células K562 que foram inoculadas em placas de 96 poços na quantidade de 5×10^4 células/poço, na presença dos extratos, foram observadas em Microscópio Bel Photonics - Inv100 e fotografadas com câmera Nikon DS-Fi1c no aumento de 400 x.

3.5.3 Avaliação da morte celular por apoptose ou necrose

A mensuração da indução da morte celular por apoptose ou necrose foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo. A externalização da fosfatidilserina e a perda da integridade da membrana plasmática, sinais de apoptose e necrose, respectivamente, foram avaliadas com o kit (Annexin V Alexa Fluor® 488 conjugate, Life Technologies, Cat. nº A13201) de dupla marcação consistindo de anexina V e iodeto de propídeo (PI).

Foram preparadas amostras com 5×10^5 células por poço em placas de 24 poços, contendo 1 mL de volume final. As amostras (em duplicatas) foram incubadas por 24 horas com os extratos, nas concentrações correspondentes aos valores de IC_{50} e $\frac{1}{2} IC_{50}$. Além disso, foi realizado o controle negativo de células, o qual consistiu em células com DMSO (0,1%), que foi o veículo de diluição dos extratos, e o controle positivo de células com POH utilizado a 1500 μ M.

Após o período de incubação, as células foram recolhidas em tubo eppendorf e centrifugadas a 400xg, durante 5 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante, e as células foram lavadas com 500 μ L de solução tampão fosfato gelado (PBS; 0,13 M NaCl, 2,68 mM KCl, 10,56 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 ; pH 7,2) e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Ao término, foram ressuspensas em 50 μ L de tampão de ligação de anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM e $CaCl_2$ 2,5 mM – pH 7,4) e incubadas com 2,5 μ L de Anexina-V e 1,0 μ L de PI a 50 μ g/mL por 15 minutos, em temperatura ambiente e protegidas da luz.

Decorrido o tempo, adicionou-se 200 μ L de tampão de ligação de anexina, as amostras foram mantidas no gelo durante a análise por citometria de fluxo. Foram adquiridos 20.000 eventos e as fluorescências analisadas nos canais FL1-A e FL3-A em

escalas logarítmicas. A análise dos dados foi realizada usando a porcentagem de células presente em cada quadrante, utilizando-se o programa Graph Pad Prism – versão 5.0.

3.5.4 Avaliação da fragmentação do DNA e ciclo celular

A avaliação do conteúdo e fragmentação do DNA foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo segundo metodologia proposta por Telford e colaboradores (1992). As placas de 24 poços foram preparadas utilizando-se 5×10^5 células por poço, em volume final de 1 mL. As amostras foram preparadas em duplicatas e incubadas por 24 horas com os extratos, nas concentrações correspondentes aos valores de IC_{50} e $\frac{1}{2} IC_{50}$. De modo igual ao descrito no item anterior, também foi realizado o controle negativo, células com DMSO (0,1%), e o controle positivo, com 1500 μ M de POH.

Após o período de incubação, as células foram recolhidas em tubo eppendorf e centrifugadas a 400 xg, durante 5 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante, e as células foram lavadas com 1 mL de tampão fosfato (PBS pH - 7,2) gelado e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Ao término, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em etanol 70% gelado e incubadas a 4°C por 30 minutos. Após esse período foram centrifugadas conforme as condições citadas anteriormente, o etanol foi descartado, as células lavadas com 1 mL de PBS gelado e centrifugadas novamente. Logo após, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 500 μ L de reagente de Telford (0,1 % Triton X-100 - SIGMA T8532; 2,5 μ g/mL de PI - SIGMA P4170 e 0,05 mg/mL de RNase A DNase-free - Sigma R4875 ≥ 50 U/mL em PBS 1X) e 2,5 μ L de RNase. As células foram incubadas a 4°C durante 30 minutos.

Na análise dos dados foram adquiridos 20.000 eventos e a fluorescência analisada nos canais FL2-A x Número de eventos em escalas lineares ou logarítmica.

3.6 Análise do perfil fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-UV-DAD)

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia (CROMATOLAB), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia

Roberto Alcantara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os extratos e frações foram submetidos a uma análise em cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodo (Ultimate 3000 Dionex), em coluna thermo-scientific RP18 (250 mm x 4,6mm com partícula de 5 Å).

Para a separação das amostras foi utilizada uma coluna Thermo-Scientific RP18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 5 Å), o fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min sem programação de temperatura. A fase móvel foi um gradiente do tipo rampa que iniciou com 100% de água ultrapura (MilliQ®) acidificada com ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) a pH 3,0 e 0% de acetonitrila (Tedia®) por 120 minutos, em seguida, inverteu-se para água ultra pura acidificada 0% e acetonitrila 100%. Ao fim de 126 minutos, foi restabelecida a condição inicial.

3 RESULTADOS

3.1 Cultura de tecidos vegetais

3.1.1 Calogênese

Nos experimentos visando à produção de calos avaliou-se a resposta de explantes frente à presença ou ausência de luminosidade, assim como a diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores.

A variação na concentração da auxina PIC em associação com KIN influenciou positivamente a calogênese em explantes foliares mantidos em meio B5, observando-se o intumescimento dos explantes ao longo dos primeiros 30 dias, em todos os meios e condições de cultura. Após o primeiro subcultivo, verificou-se o início da calogênese, onde os calos produzidos eram de consistência friável e coloração amarelada. Ao final de 90 dias em cultura, foram observadas algumas áreas de oxidação em todos os explantes, principalmente nas menores concentrações (2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN), tanto na presença quanto ausência de luminosidade (Figura 5). O maior valor de biomassa (270,0±20,0 mg) foi obtido nas culturas mantidas na presença de luz em meio B5 suplementado com 7,5 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN (Tabela 3).

Em relação aos explantes caulinares, houve resposta calogênica em todos os meios contendo os fitorreguladores PIC e KIN, independentemente da luminosidade. A partir do primeiro mês em cultivo, foi evidenciada a formação de calos que apresentavam consistência friável e coloração bege. Porém, após 90 dias em cultura, os calos apresentavam áreas de oxidação, principalmente nas culturas mantidas em meio com 2,5 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN sob luminosidade (Figura 6). O maior valor de produção de biomassa (180,0±60,0 mg) foi alcançado nas culturas mantidas na luz em meio contendo 2,5 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN, porém não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para o tratamento com 5,0 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN (Tabela 3).

Culturas de explantes radiculares inoculados em meios B5 suplementados com PIC e KIN, tanto na ausência quanto na presença de luz, não apresentaram resposta calogênica mostrando-se oxidados ao final da cultura (dados não mostrados).

Tabela 3 - Produção de biomassa calogênica em *Schwartzia brasiliensis* obtida a partir de explantes foliares e caulinares inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de KIN + PIC após 90 dias em cultura.

Fitorreguladores/ Condição física		Produção de biomassa (mg)			
PIC	KIN	Folha		Caule	
		PF	PS	PF	PS
Claro					
2,5	0,5	2160,0±770,0a	100,0±70,0b	2120,0±340,0a	180,0±60,0a
5,0	0,5	2840,0±490,0a	150,0±70,0b	2080,0±250,0a	170,0±10,0a
7,5	0,5	2160,0±670,0a	270,0±20,0a	1830,0±140,0a	90,0±20,0bc
Escuro					
2,5	0,5	880,0±100,0c	90,0±10,0b	1000,0±80,0b	80,0±10,0bc
5,0	0,5	930,0±60,0c	100,0±30,0b	1010,0±180,0b	100,0±10,0b
7,5	0,5	1210,0±100,0b	150,0±40,0b	760,0±140,0c	60,0±10,0bc

Legenda: PF = peso fresco; PS = peso seco. Os dados representam média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

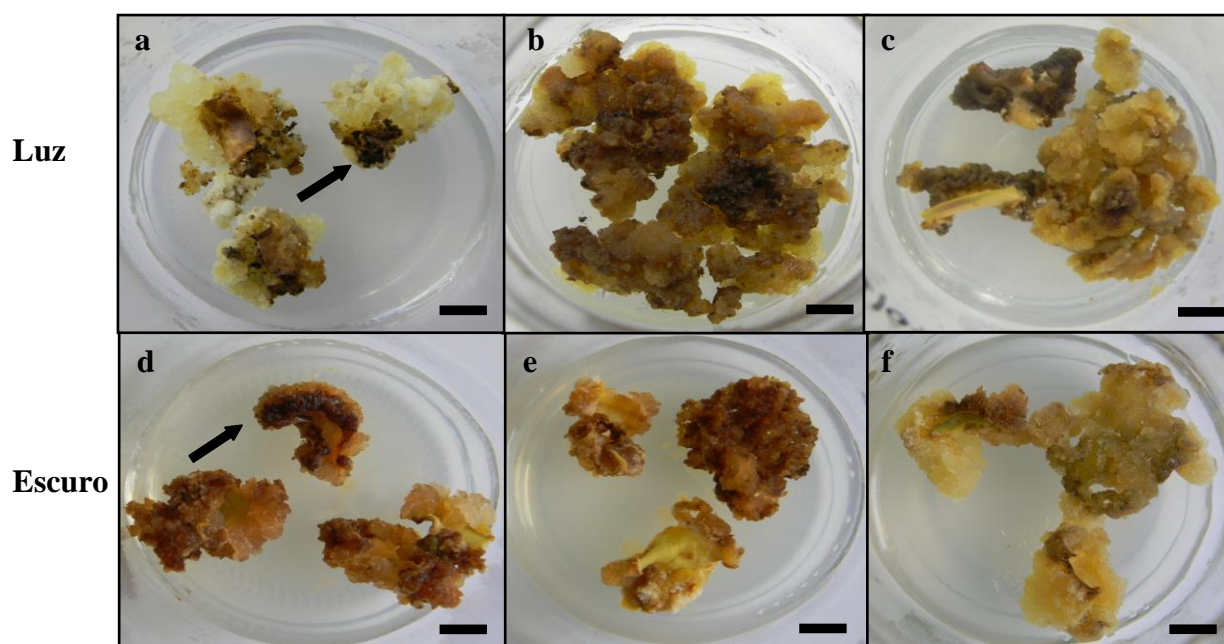


Figura 5 - Calogênese obtida a partir de explantes foliares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC e KIN, após 90 dias de cultivo.

Legenda: a) Áreas de oxidação na região do explante (seta) em 2,5 mg.L⁻¹ de PIC+ 0,5 mg.L⁻¹ de KIN sob luminosidade; b) 5,0 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN sob luminosidade; c) 7,5 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN sob luminosidade; d) Áreas de oxidação na região do explante (seta) em 2,5 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN na ausência de luminosidade; e) 5,0 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN na ausência de luminosidade; f) 7,5 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN na ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

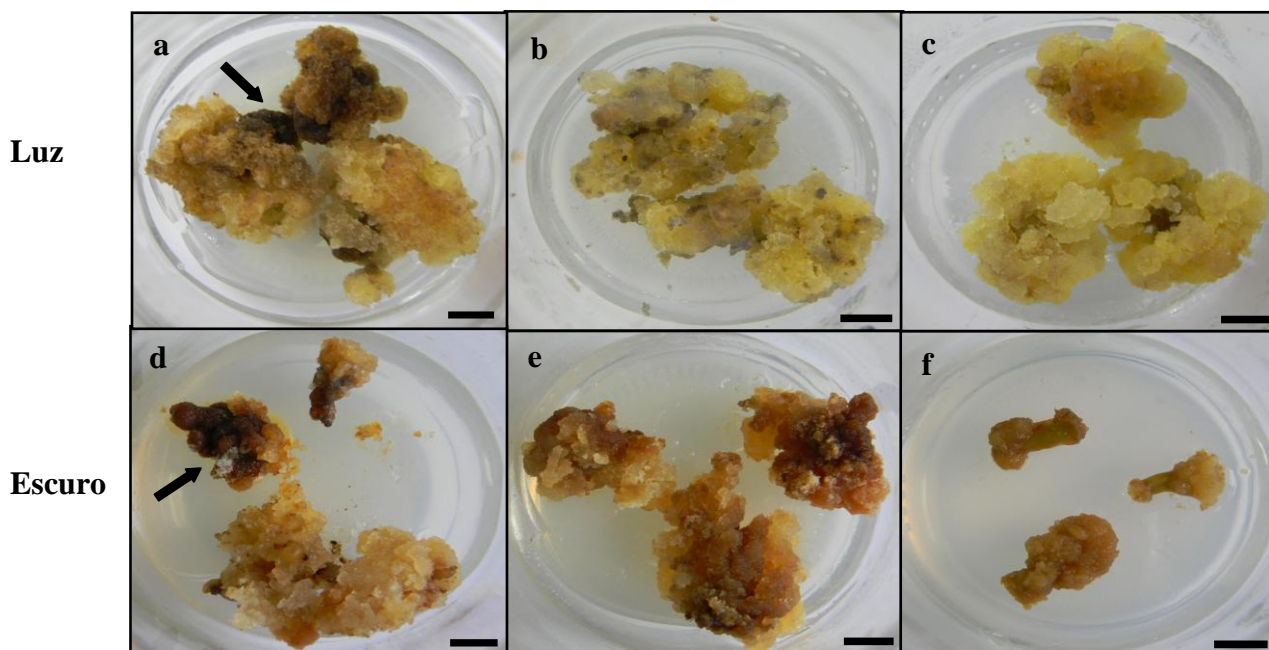


Figura 6 - Calogênese obtida a partir de explantes caulinares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC e KIN, após 90 dias de cultivo.

Legenda: a) Áreas de oxidação na região do explante (seta) em $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC+ $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN sob luminosidade; b) $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN sob luminosidade; c) $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN sob luminosidade; d) Áreas de oxidação na região do explante (seta) em $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC+ $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN na ausência de luminosidade; e) $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN na ausência de luminosidade; f) $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN na ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

Nas culturas a partir de explantes foliares mantidos em meio suplementado com os fitorreguladores BAP e ANA, em diferentes concentrações, o início da resposta morfogênica foi caracterizado pelo intumescimento dos explantes em todas as concentrações, tanto na presença quanto na ausência de luminosidade.

Nas culturas mantidas sob luminosidade foi observada, no primeiro mês de cultivo, a formação de calos na área de excisão do explante, na região abaxial. A calogênese manteve-se durante toda a cultura, e após 90 dias, os calos formados apresentavam coloração verde e consistência compacta (Figura 7). O maior valor de biomassa ($300,0 \pm 30,0 \text{ mg}$) foi obtido na concentração de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (Tabela 4), porém não houve diferença estatística para os demais tratamentos ($p < 0,05$).

Nas culturas mantidas na ausência de luminosidade, os explantes apresentaram baixa resposta calogênica, sendo observada a formação de pequenos calos somente na

região de excisão (Figura 7) e alguns explantes não responsivos, por isso não foi avaliada a produção de biomassa.

Em relação aos explantes caulinares mantidos em meio B5 suplementado com BAP e ANA sob luminosidade, foi observada a produção de brotos, assim como calos nos primeiros 30 dias em cultura. Após 90 dias, os calos formados apresentavam coloração verde e consistência compacta. Os brotos eram oriundos da região da gema do explante, enquanto o calo ocupava toda a área do explante (Figura 8). Os maiores valores de biomassa ($210,0 \pm 30,0$ mg) foram obtidos em meio suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, porém não houve diferença estatística para os demais tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Nas culturas mantidas na ausência de luminosidade, foi observado o intumescimento dos explantes nos primeiros 30 dias. Após esse período, iniciou-se a calogênese que se manteve após os subcultivos, sendo verificada, ao final de 90 dias, a formação de calos de consistência friável com coloração bege, e algumas áreas oxidadas. Na maior concentração ($7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA) observou-se a menor produção de biomassa ($100,0 \pm 20,0$ mg). Nas culturas onde foi inoculado o explante radicular em meio B5 suplementado com BAP e ANA, sob luminosidade, não foi obtida resposta calogênica. Entretanto, quando inoculados em meio na ausência de luminosidade, as menores concentrações ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA) favoreceram a produção de pequenos calos, com consistência friável e coloração bege (Figura 9). Em relação à produção de biomassa, não houve diferença significativa entre as concentrações ($p < 0,05$) (Tabela 4).

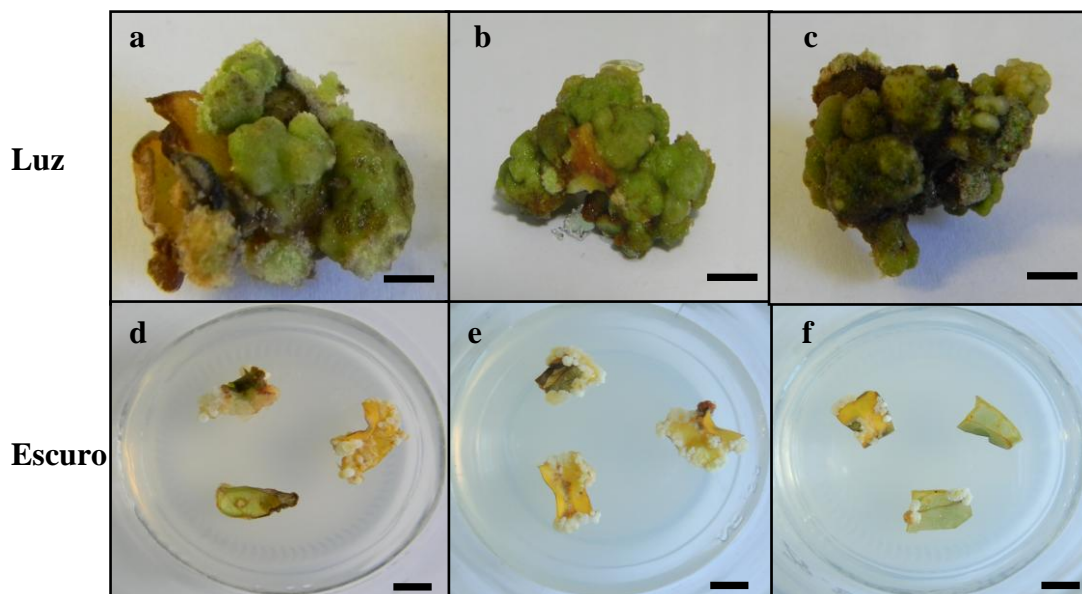


Figura 7 - Calogênese obtida a partir de explantes foliares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, após 90 dias de cultivo.

Legenda: a) $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sob luminosidade; b) $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sob luminosidade; c) $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sob luminosidade; d) Formação de pequenos calos na região de excisão em $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na ausência de luminosidade; e) $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na ausência de luminosidade; f) $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

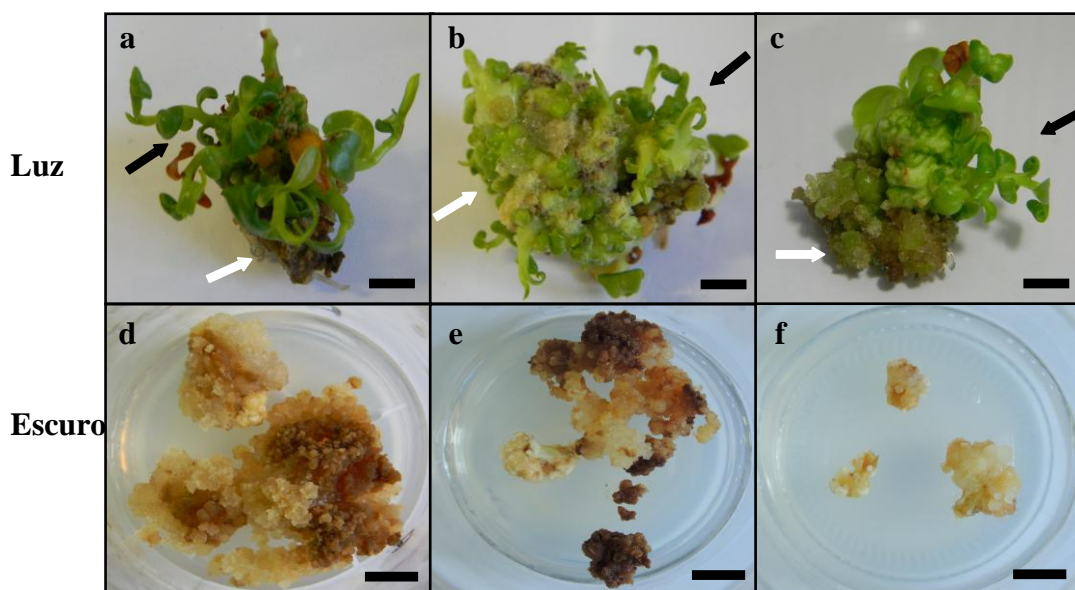
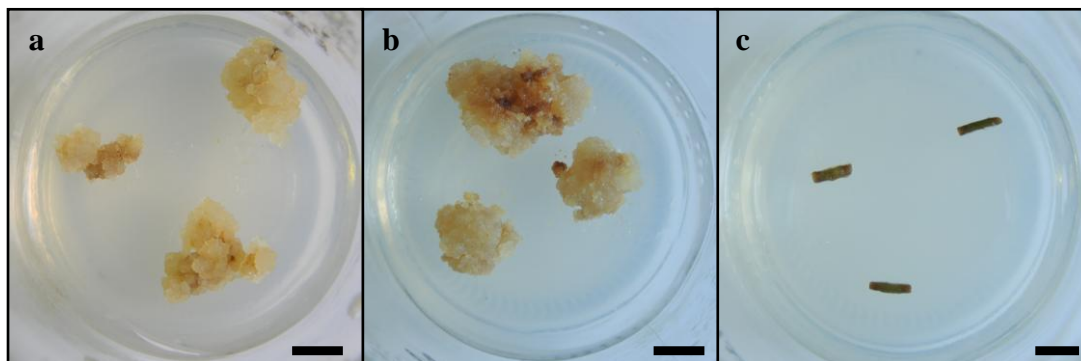


Figura 8 - Produção de calos (setas brancas) e brotos (setas pretas) obtidos a partir de explantes caulinares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, após 90 dias de cultivo.

Legenda: a) $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sob luminosidade; b) $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sob luminosidade; c) $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sob luminosidade; d) $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na ausência de luminosidade; e) Calos oxidados (seta) inoculados em $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na ausência de luminosidade; f) $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

Figura 9 – Produção de calos a partir de explantes radiculares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, após 90 dias de cultivo, mantidos na ausência de luminosidade.



Legenda: a) 2,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA; b) 5,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA; c) 7,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. Barra = 1 cm.

Tabela 4 - Produção de biomassa calogênica em *S. brasiliensis* obtida a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP + ANA após 90 dias em cultura.

Fitorreguladores/ Condição física		Produção de biomassa (mg)					
BAP	ANA	Folha		Caule		Raiz	
Claro		PF	PS	PF	PS	PF	PS
2,5	0,5	3100,0±480,0a	280,0±50,0a	1030,0±100,0a	200,0±30,0a	-	-
5,0	0,5	3280,0±310,0a	270,0±50,0a	1010,0±270,0a	210,0±30,0a	-	-
7,5	0,5	3300,0±280,0a	300,0±30,0a	960,0±160,0a	200,0±60,0a	-	-
Escuro							
2,5	0,5	-	-	520,0±60,0b	230,0±10,0a	260,0±50,0a	40,0±20,0a
5,0	0,5	-	-	520,0±30,0b	230,0±30,0a	270,0±60,0a	30,0±0,0a
7,5	0,5	-	-	220,0±40,0c	100,0±20,0b	-	-

Legenda: - = ausência de calogênese; PF = peso fresco; PS = peso seco. Os dados representam média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Nas culturas mantidas em meios de composição salínica B5 suplementados apenas com a auxina PIC, o início da resposta morfogênica iniciou-se a partir de 30 dias de cultivo, caracterizado apenas pelo intumescimento dos explantes foliares e caulinares em todas as concentrações, tanto na presença quanto ausência de luminosidade.

Em relação às culturas mantidas na presença de luz, os explantes foliares apresentaram início de calogênese no primeiro mês de cultura, porém ao final de 90 dias, foi evidenciada alta taxa de oxidação e poucos explantes responsivos. Paralelamente, nos experimentos mantidos na ausência de luminosidade, ocorreu apenas o intumescimento dos explantes (Figura 10) não havendo resposta calogênica.

As culturas oriundas de explantes caulinares de *S. brasiliensis* tiveram como resposta morfogênica apenas o intumescimento dos explantes, sendo evidenciados, ao final de 90 dias, poucos explantes com início de calogênese, enquanto outros se apresentavam oxidados (Figura 11).

Culturas de explantes radiculares inoculados em meios suplementados com PIC, tanto na ausência quanto na presença de luz, não apresentaram resposta calogênica, estando oxidados ao final de 90 dias. Nesses casos, tais explantes e condições não se mostraram adequados à indução da calogênese na espécie.

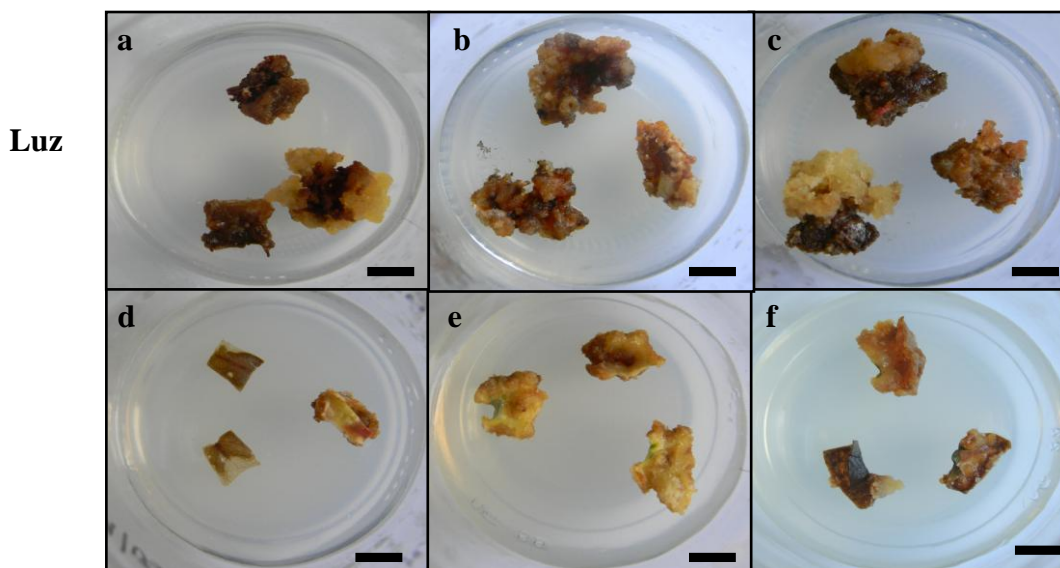
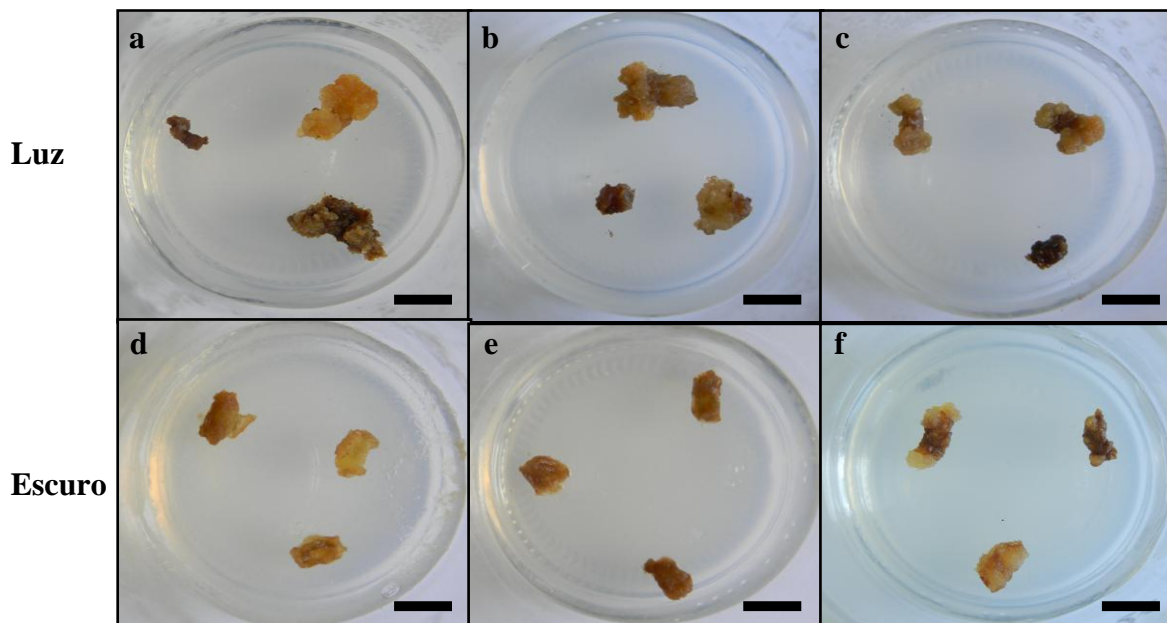


Figura 10 – Resposta morfogênica de explantes foliares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 90 dias de cultivo.

Legenda: a) 2,5 mg.L⁻¹ de PIC sob luminosidade; b) 5,0 mg.L⁻¹ de PIC sob luminosidade; c) 7,5 mg.L⁻¹ de PIC sob luminosidade; d) 2,5 mg.L⁻¹ de PIC na ausência de luminosidade; e) 5,0 mg.L⁻¹ de PIC na ausência de luminosidade; f) 7,5 mg.L⁻¹ de PIC na ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

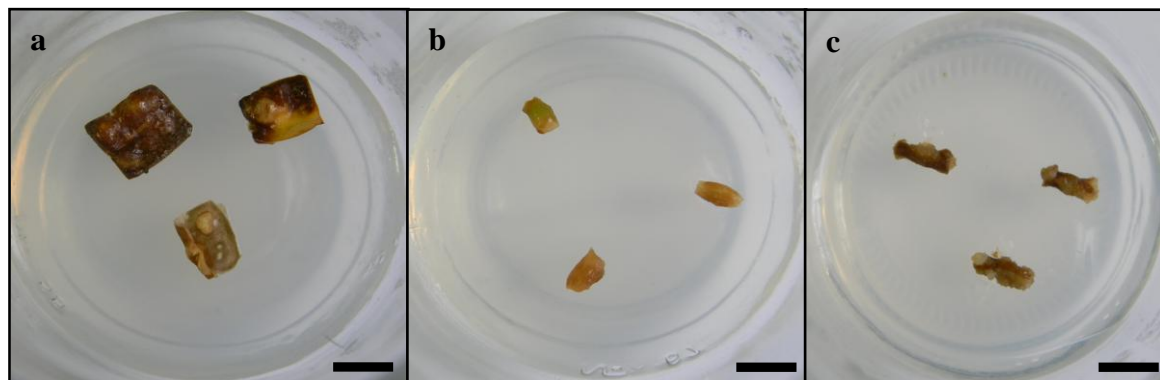
Figura 11 – Resposta morfogênica de explantes caulinares de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 90 dias de cultivo.



Legenda: a) 2,5 mg.L⁻¹ de PIC sob luminosidade; b) 5,0 mg.L⁻¹ de PIC sob luminosidade; c) 7,5 mg.L⁻¹ de PIC sob luminosidade; d) 2,5 mg.L⁻¹ de PIC na ausência de luminosidade; e) 5,0 mg.L⁻¹ de PIC na ausência de luminosidade; f) 7,5 mg.L⁻¹ de PIC na ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

A auxina 2,4-D não promoveu resposta calogênica nas diferentes concentrações testadas, tanto na presença quanto ausência de luz. Ao final dos 90 dias em cultivo, o explantes foliares, em grande maioria, apresentavam-se oxidados, enquanto os caulinares e radiculares apresentaram leve intumescimento, porém sem a formação de calos (Figura 12).

Figura 12 – Resposta morfogênica de diferentes explantes de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com 7,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de luz, após 90 dias de cultivo.



Legenda: a) explantes foliares; b) explantes caulinares; c) explantes radiculares. Barra = 1 cm.

A partir dos resultados obtidos em relação ao acúmulo de biomassa, definiu-se que o meio B5 suplementado com PIC e KIN foi o melhor para induzir a calogênese em explantes foliares e caulinares. Entretanto, apesar dos calos obtidos a partir de explantes foliares na presença de luz apresentaram maior acúmulo de biomassa, após 90 dias em cultivo, eles mostraram-se muito oxidados. Por isso optou-se por realizar o subcultivo apenas dos calos obtidos a partir de explantes caulinares mantidos em meios suplementados com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, uma vez que eles apresentavam poucas áreas de oxidação e maior acúmulo de biomassa.

Os calos foram subcultivados mensalmente para meio de igual composição com a finalidade de avaliar seu crescimento e desenvolvimento. Percebeu-se que, ao longo dos subcultivos, as regiões superficiais dos calos começaram a apresentar áreas de oxidação. Por isso, visando controlar esse processo, parte das culturas foi colocada na ausência de luminosidade. Após sucessivos subcultivos, foi possível perceber que os calos mantidos sob luminosidade oxidaram-se totalmente, enquanto os calos mantidos na ausência de luminosidade não estavam mais sofrendo esse processo, apresentando coloração bege claro, consistência friável e o crescimento celular (Figura 13). Dessa forma, estes calos foram escolhidos para serem usados nas etapas de elicitação e obtenção das culturas de células em suspensão. Além disso, foram subcultivados por pelo menos dois anos, mantendo elevada capacidade de produção de biomassa, constituindo um estoque de material biotecnológico para posteriores análises biológicas e fitoquímicas.



Figura 13 – Culturas de calos obtidos a partir de explantes caulinares de *Schwartzia brasiliensis* mantidos em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, sob ausência de luminosidade. Barra = 1 cm.

3.1.2 Elicitação

3.1.2.1 Avaliação do efeito do óxido nítrico na resposta morfogênese in vitro

Foram avaliadas as respostas morfogênicas de explantes foliares, caulinares e radiculares inoculados em meio B5 suplementados com SNP nas concentrações de 1, 3, 5 e 10 μM .

Os resultados, após 60 dias de cultivo, mostraram que o SNP promoveu a produção de raízes em explantes foliares, e a produção de brotos, oriundos da gema em explantes caulinares, independentemente da concentração testada. Em explantes radiculares houve a formação de raízes em apenas alguns explantes (Figura 14).

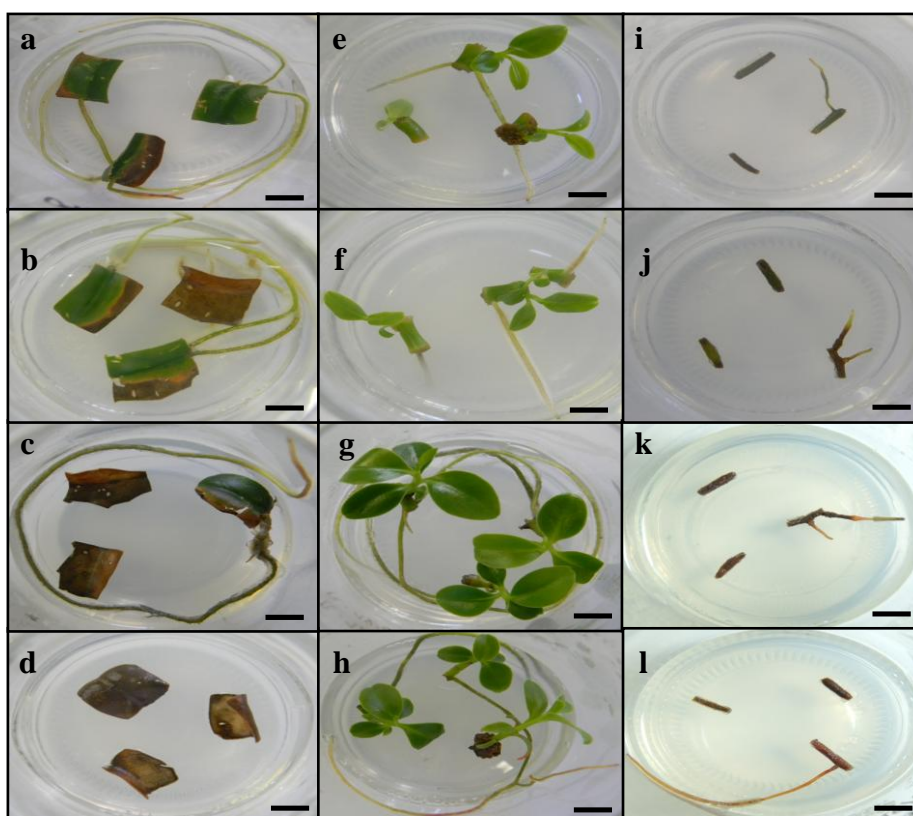


Figura 14 – Resposta morfogênica de diferentes explantes de *Schwartzia brasiliensis* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de SNP, após 60 dias de cultivo, sob luminosidade.

Legenda: a) Explantes foliares inoculados com 1 μM de SNP; b) Explantes foliares inoculados com 3 μM de SNP; c) Explantes foliares inoculados com 5 μM de SNP; d) Explantes foliares inoculados com 10 μM de SNP; e) Explantes caulinares inoculados com 1 μM de SNP; f) Explantes caulinares inoculados com 3 μM de SNP; g) Explantes caulinares inoculados com 5 μM de SNP; h) Explantes caulinares inoculados com 10 μM de SNP; i) Explantes radiculares inoculados com 1 μM de SNP; j) Explantes radiculares inoculados com 3 μM de SNP; k) Explantes radiculares inoculados com 5 μM de SNP; l) Explantes radiculares inoculados com 10 μM de SNP; Barra = 1 cm

3.1.2.2 Avaliação do efeito do óxido nítrico e do metil jasmonato na calogênese

Visando estabelecer um protocolo que permitisse o maior acúmulo de biomassa em calos de *S. brasiliensis*, dois gramas de massa calogênica de culturas já estabelecidas em meio B5 suplementado com 5,0 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN, foram expostos à diferentes concentrações (1, 3 e 5 µM) de MJ e SNP, sob ausência de luminosidade.

Após 60 dias em cultivo, a maior produção de biomassa foi obtida nas culturas mantidas em meio suplementado com 1 µM de MJ (310,0±90,0 mg), porém não houve diferença significativa (p<0,05) para os demais tratamentos com o elicitador (Tabela 5). Em relação ao uso do SNP, a concentração de 1 µM foi induziu o maior acúmulo de biomassa, não havendo diferença significativa (p<0,05) entre este tratamento e as culturas elicitadas com MJ.

Tabela 5 – Acúmulo de biomassa em calos de *Schwartzia brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de elicitores, após 60 dias em cultura sob ausência de luminosidade.

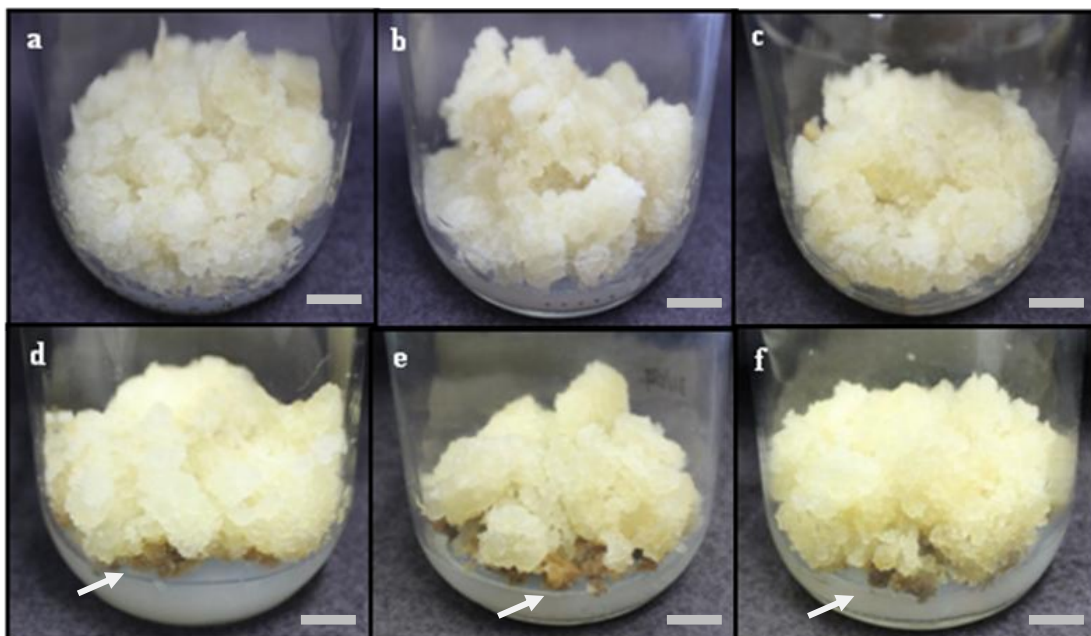
Elicitor (µM)	Acúmulo de biomassa (mg)	
	Pf	Ps
MJ		
-	12010,0±600,0c	190,0±10,0b
1	17800,0±280,0a	310,0±90,0a
3	17340,0±900,0ab	290,0±40,0a
5	16310,0±810,0b	300,0±20,0a
SNP		
1	15680,0±200,0b	290,0±20,0a
3	13210,0±810,0c	230,0±20,0ab
5	16170,0±630,0b	260,0±60,0ab

Legenda: - = controle (ausência de elicitador); Pf = peso fresco; Ps = peso seco; MJ = metil jasmonato; SNP = nitroprussiato de sódio. Os dados representam média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Além do acúmulo de biomassa, avaliou-se também a coloração e textura dos calos. Independentemente do tipo e concentração do elicitador utilizado, todas as culturas apresentavam calos com coloração bege e consistência friável. Porém, observou-se que as culturas mantidas em meio suplementado com SNP, além de apresentarem menores valores de peso fresco, quando comparadas às culturas elicitadas com 1 µM de MJ,

possuíam áreas de oxidação na parte inferior do calo que fica diretamente em contato com o meio de cultura (Figura 15).

Figura 15 - Cultura de calos mantidos em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN e diferentes concentrações de elicitores, após 60 dias de cultivo, sob ausência de luminosidade.



Legenda: a) B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN + $1 \mu\text{M}$ de MJ; b) B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN + $3 \mu\text{M}$ de MJ; c) B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN + $5 \mu\text{M}$ de MJ; d) Áreas de oxidação em calos (seta) em meio B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN + $1 \mu\text{M}$ de SNP; e) Áreas de oxidação em calos (seta) em meio B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN + $3 \mu\text{M}$ de SNP; f) Áreas de oxidação em calos (seta) em meio B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN + $5 \mu\text{M}$ de SNP. Barra = 1 cm.

Com base nos resultados acima, calos mantidos em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, elicitados com $1 \mu\text{M}$ de MJ foram selecionados e subcultivados para meio fresco de igual composição visando à manutenção de culturas estoque.

3.1.2 Estabelecimento das culturas de células em suspensão

Visando iniciar as culturas de células em suspensão (CCS), foram utilizados calos friáveis cultivados em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN e elicitados com $1 \mu\text{M}$ de MJ.

Inicialmente, foi avaliada a quantidade de inóculo mais adequada para o estabelecimento das CCS, a partir da aferição de peso de matéria fresca (PF) das culturas, sendo testados inóculos de 1,5; 2 e 3 g de massa calogênica.

As culturas foram observadas periodicamente, e após 21 dias determinou-se o fim do experimento, onde foi possível observar que as culturas iniciadas com dois e três gramas de inóculo apresentavam os maiores valores de PF não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 6).

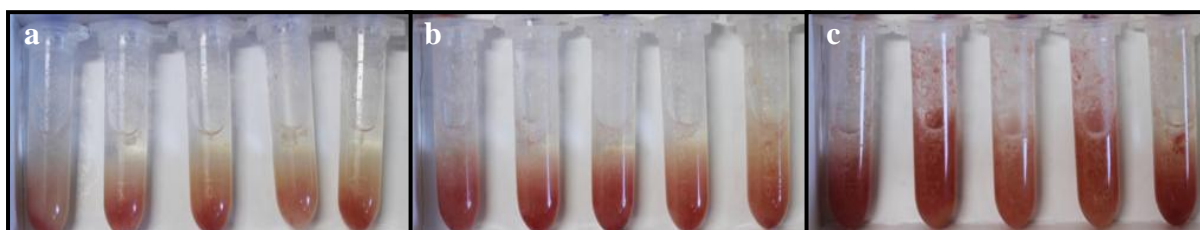
Tabela 6 – Avaliação da quantidade de inóculo para o estabelecimento das culturas de células em suspensão de *Schwartzia brasiliensis* em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, após 21 dias.

Peso do inóculo (g)	Peso fresco (mg)
1,5	3960,0±670,0b
2	5660,0±390,0a
3	5860,0±540,0a

Legenda: PF = peso fresco. Os dados representam a média \pm desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Os inóculos também foram avaliados quanto à sua viabilidade, utilizando-se o teste topográfico de tetrazólio. Após a avaliação, pôde-se concluir que todas as células estavam viáveis independentemente do inóculo inicial testado (Figura 16). Sendo assim, considerando o acúmulo de massa calogênica e viabilidade celular, optou-se pelo início das CCS de *S. brasiliensis* com inóculo de dois gramas de calos.

Figura 16 – Teste de viabilidade celular dos inóculos das culturas de células em suspensão de *Schwartzia brasiliensis* mantidas em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, após 21 dias.



Legenda: a) inóculos de 1,5 g; b) inóculos de 2 g; c) inóculos de 3 g.

Após a definição do peso ideal do inóculo, deu-se início as CCS, que foi avaliada por 31 dias, visando estabelecer a curva de crescimento.

A curva de crescimento estabelecida apresentou fase lag de aproximadamente sete dias de cultivo. A partir do oitavo dia, as culturas entraram na fase exponencial (fase log), alcançando peso máximo de matéria seca de $222,0 \pm 11,78$ mg no 24º dia (Figura 17). Nesta fase as culturas apresentavam-se homogêneas e com coloração bege (Figura 18). Entre o 24º e 27º dia, as culturas começaram a apresentar redução na proliferação de células, caracterizando a fase estacionária

A intensa diminuição no crescimento das culturas foi observada a partir do 27º dia, período o qual as células apresentavam-se mais escuras, evidenciando início da oxidação e morte celular (Figura 18).

Figura 17 - Curva de crescimento das culturas de células em suspensão de *Schwartzia brasiliensis* cultivadas em meio B5 + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN, após 31 dias em cultura, sob ausência de luminosidade.

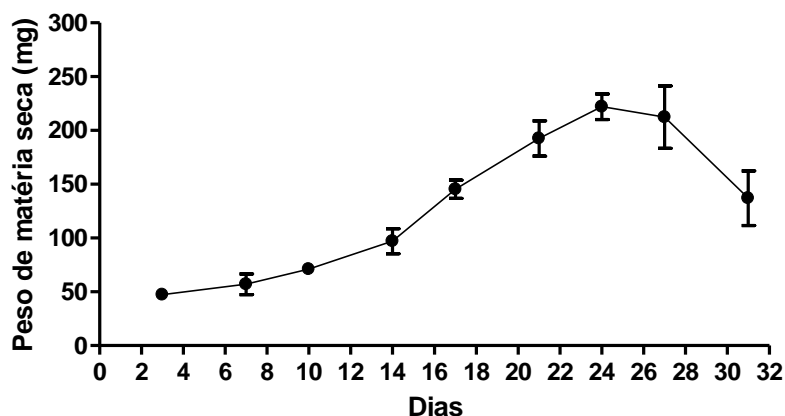


Figura 18 – Culturas de células em suspensão de *Schwartzia brasiliensis* cultivadas em meio B5 suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ PIC + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN, sob ausência de luminosidade.



Legenda: a) CCS com 21 dias em cultura; b) CCS com 31 dias em cultura. Barra = 1 cm.

Após a definição da curva de crescimento, o subcultivo das CCS passou a ser realizado no 21º dia visando à manutenção das células na fase exponencial de crescimento. As culturas eram filtradas e cerca de dois gramas de células inoculadas em meio de cultura fresco de igual composição. Após três subculturas, foi verificado que a proliferação celular era mantida e que as CCS apresentavam sempre o mesmo aspecto e coloração.

3.2 Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico através do ensaio de eletroforese em gel de agarose com DNA plasmidial

O ensaio de eletroforese em gel de agarose utilizando DNA plasmidial foi usado a fim de avaliar as propriedades genotóxica e antigenotóxica de extratos metanólicos de *Schwartzia brasiliensis* mantida sob condições *in vivo* e materiais obtidos *in vitro*, assim como frações obtidas a partir de extratos metanólicos da espécie cultivada *in vivo*.

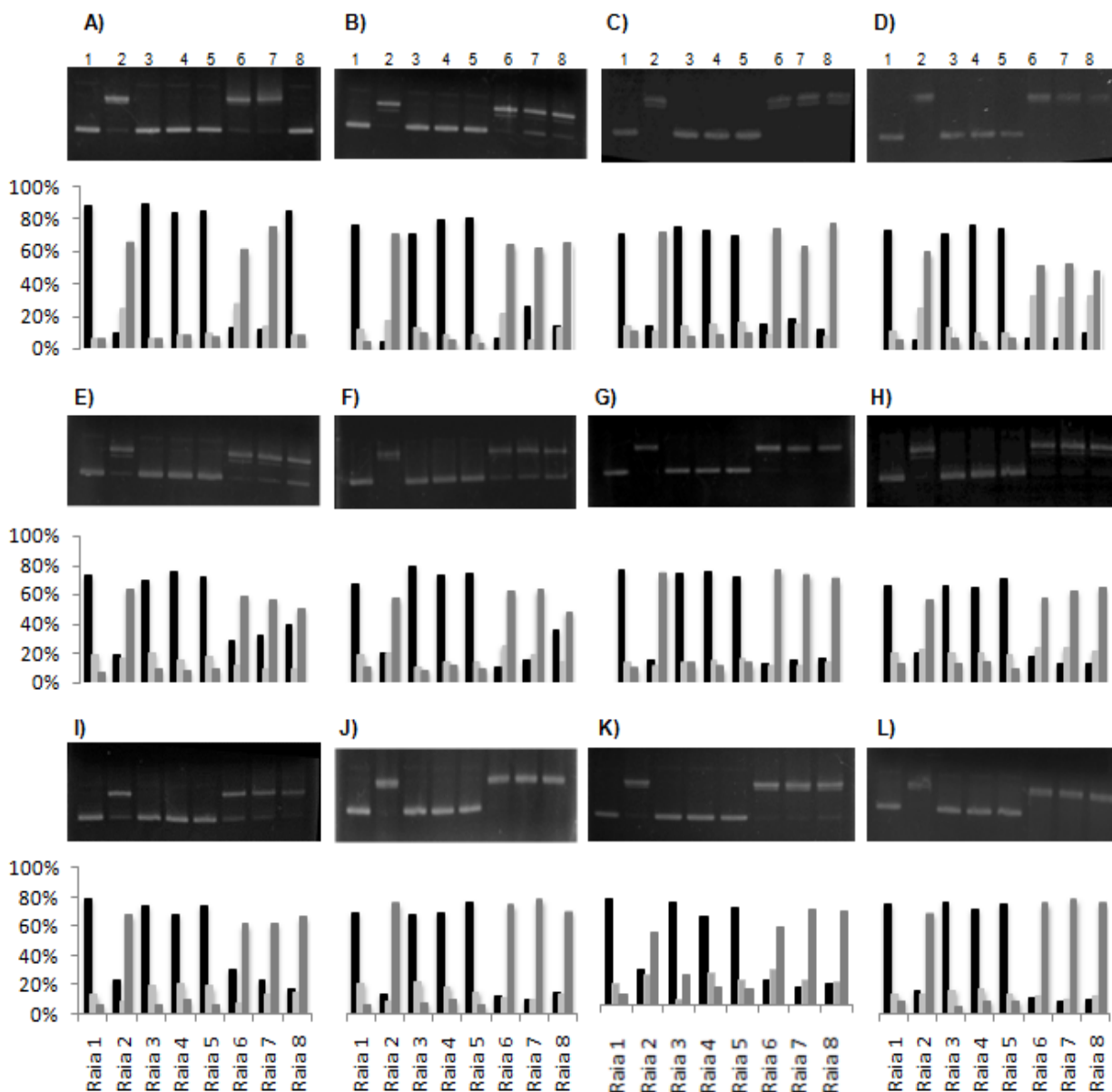
Em relação ao material *in vivo*, o extrato metanólico obtido a partir de folhas, quando testado na concentração de 250 µg/mL, foi capaz de proteger totalmente o DNA contra a quebra induzida pelo cloreto estanoso (Figura 19A), o que pode ser observado através da análise da forma predominante I (88,6% na amostra de controle, raia 1), 10,3% na raia 2 (9,1 pUC com SnCl₂) e 85,4% quando o extrato metanólico foi adicionado (Figura 19A - raia 8).

A fração aquosa de folhas também apresentou efeito antigenotóxico, capaz de reduzir o número de quebras de DNA induzida pelo cloreto estanoso (Figura 19B – raias 6, 7 e 8). Na raia 7 é possível constatar 28,23% de moléculas de plasmídeo na forma I enquanto que, no controle com cloreto estanoso (raia 2) apenas 18,78%.

Na avaliação do extrato metanólico obtido a partir caules de *S. brasiliensis*, também verificou-se o potencial antigenotóxico (Figuras 19E – raias 6, 7 e 8), na concentração de 250 µg/mL. A raia 8 apresentou 39,89% de moléculas de plasmídeo na forma I enquanto que, no controle, apenas 19,14% (Figura 19E). O mesmo foi observado para a fração aquosa de caules, que na concentração de 250 µg/mL, a raia 8 apresentou 36,17% de moléculas de plasmídeo na forma I enquanto na raia 2 apresentou 21,12% (Figura 19F).

O extrato metanólico e as frações obtidas a partir de raízes, assim como as frações acetato de etila e hexano de folhas e caules, não mostraram potencial antigenotóxico (Figura 19 C, D, G, H, I, J, K, L – raias 6, 7 e 8).

Na avaliação do potencial genotóxico, os dados obtidos mostraram que nenhum extrato ou fração causou dano ao DNA (Figura 19A a L – raias 3, 4 e 5).



Gráficos: Superhelicoidizada ■ Linear ■ Círculo aberto □

Figura 19 - Análises qualitativa e quantitativa do potencial genotóxico e antigenotóxico de extratos e frações de *Schwartzia brasiliensis* no plasmídeo pUC 9.1. As bandas correspondentes às alíquotas da solução de plasmídeo (200 ng) com extratos tratados (25, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$).

Legenda: A) extrato metanólico de folhas; B) fração aquosa de folhas; C) fração hexano de folhas; D) fração acetato de etila de folhas; E) extrato metanólico de caules; F) fração aquosa de caules; G) fração hexano de caules; H) fração acetato de etila de caules; I) extrato metanólico de

raízes; J) fração aquosa de raízes; K) fração hexano de raízes; L) fração acetato de etila de raízes. Os gráficos de barra representam a mensuração do DNA plasmidial através do programa Image J (Software). Raias: 1) pUC 9.1; 2) pUC 9.1 + 200µg/mL SnCl₂; 3) pUC 9.1 + 25 µg/mL de extrato; 4) pUC 9.1 + 125 µg/mL de extrato; 5) pUC 9.1 + 250 µg/mL de extrato; 6) pUC 9.1 + 25 µg/mL de extrato + 200µg/mL SnCl₂; 7) pUC 9.1 + 125 µg/mL de extrato + 200µg/mL SnCl₂; 8) pUC 9.1 + 250 µg/mL de extrato + 200µg/mL SnCl₂.

Na avaliação dos extratos metanólicos obtidos a partir de materiais produzidos *in vitro* (calos, calos elicitados e suspensões celulares), os resultados obtidos mostraram que nenhum extrato mostrou-se genotóxico (Figura 20A a C – raias 3, 4 e 5). Em relação ao potencial antigenotóxico, o extrato obtido a partir das suspensões celulares foi capaz de proteger parcialmente o DNA contra a quebra causada pelo cloreto estano em todas as concentrações testadas (Figura 20C). As raias 6, 7 e 8 apresentaram, respectivamente, 22,74; 22,91 e 22,66% de moléculas de plasmídeo na forma I enquanto que, no controle (raia 2) apresentou 14,52%.

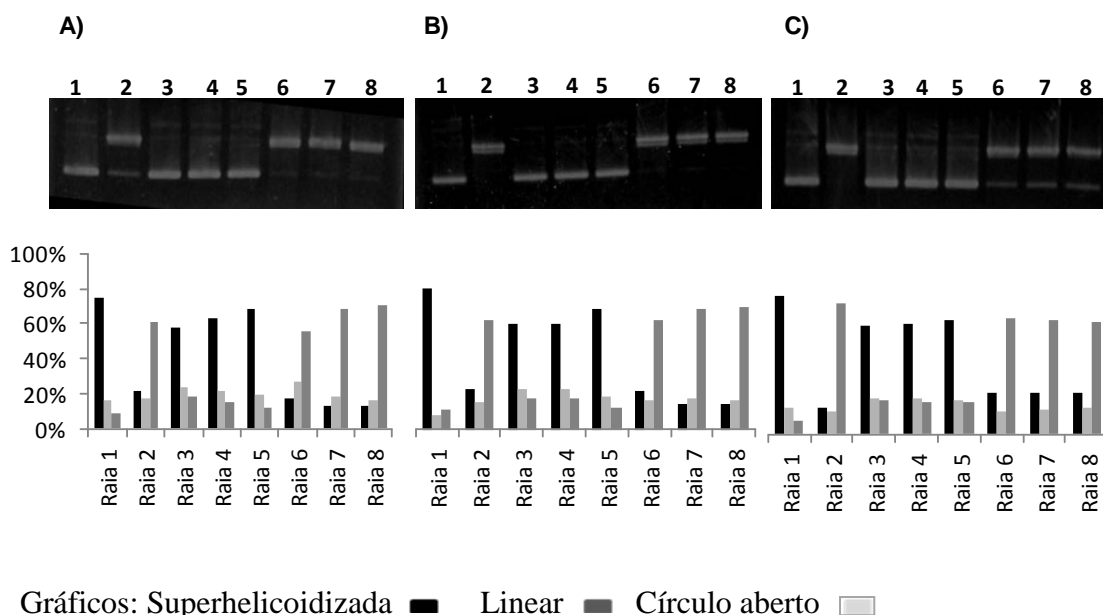


Figura 20 - Análises qualitativa e quantitativa do potencial genotóxico e antigenotóxico de extratos metanólicos de materiais produzidos *in vitro* de *Schwartzia brasiliensis* no plasmídeo pUC 9.1. As bandas correspondentes às alíquotas da solução de plasmídeo (200 ng) com extratos tratados (25, 125 e 250 µg/mL).

Legenda: A) extrato metanólico de calos; B) extrato metanólico de calos elicitados; C) extrato metanólico de suspensões celulares. Os gráficos de barra representam a mensuração do DNA plasmidial através do programa Image J (Software). Raias: 1) pUC 9.1; 2) pUC 9.1 + 200µg/mL SnCl₂; 3) pUC 9.1 + 25 µg/mL de extrato; 4) pUC 9.1 + 125 µg/mL de extrato; 5) pUC 9.1 + 250 µg/mL de extrato; 6) pUC 9.1 + 25 µg/mL de extrato + 200µg/mL SnCl₂; 7) pUC 9.1 + 125 µg/mL de extrato + 200µg/mL SnCl₂; 8) pUC 9.1 + 250 µg/mL de extrato + 200µg/mL SnCl₂.

Parte dos resultados deste ítem constitui o artigo “Assessment of the genotoxic and antigenotoxic potential of crude extracts and fractions of *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedel ex Giraldo-Cañas”, publicado no periódico Journal of Medicinal Plant Research, v. 9, p. 223-230, 2015.

3.3 Avaliação do potencial antineoplásico

3.3.1 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de redução do MTT

A avaliação da citotoxicidade, realizada através do MTT em células K562, revelou que o extrato metanólico mais citotóxico, considerando os controles como 100% de viabilidade celular, foi o obtido a partir de folhas de *Schwartzia brasiliensis* mantidas sob condições *in vivo*, onde a IC_{50} foi de 82,53 $\mu\text{g/mL}$, seguido do extrato metanólico de raízes ($IC_{50} = 134,95 \mu\text{g/mL}$). O extrato menos citotóxico foi o obtido a partir de caules ($IC_{50} = 292,82 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 7).

Na avaliação da citotoxicidade, os extratos de folhas e raízes nas concentrações de 600 e 300 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de matar todas as células (Figura 21). Nas concentrações de 18,75 e 37,5 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferença significativa quando comparadas aos controles.

Em relação aos extratos obtidos a partir do material vegetal produzido *in vitro*, nenhum se mostrou citotóxico. A maior concentração testada não foi capaz de diminuir a viabilidade celular, sendo o $IC_{50} > 600 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de IC₅₀ de extratos metanólicos de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* e de materiais produzidos *in vitro*, determinados pelo teste de citotoxicidade através do MTT realizado em células K562.

Material <i>in vivo</i>	IC₅₀ (µg/mL)	Material <i>in vitro</i>	IC₅₀ (µg/mL)
Folha	82,53±27,77a	Calo	> 600
Raiz	134,95±38,59a	Calo elicitado	> 600
Caule	292,82±18,99b	CCS	> 600

Legenda: Os resultados representam a média ± desvio padrão. O cálculo da IC₅₀ foi realizado por regressão linear utilizando o Graph Pad Prism – versão 5. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

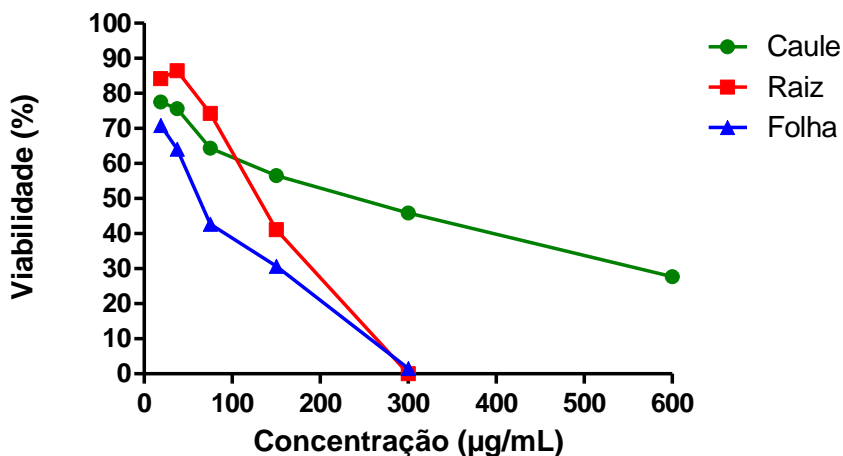


Figura 21 – Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT com células K562 tratadas com diferentes concentrações de extratos metanólicos obtidos a partir de caules, folhas e raízes de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo*. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

A partir dos resultados acima, selecionou-se as frações acetato de etila, aquosa, hexano e diclorometano obtidas a partir de extrato metanólico de folhas para também serem avaliadas quanto a sua citotoxicidade.

Os resultados obtidos mostraram que a fração mais citotóxica foi a de acetato de etila onde a IC_{50} obtida foi igual a $32,94 \pm 6,49 \mu\text{g/mL}$, seguida da fração diclorometano ($IC_{50} = 44,14 \pm 4,76 \mu\text{g/mL}$), hexano ($IC_{50} = 46,35 \pm 5,28 \mu\text{g/mL}$) e aquosa ($IC_{50} = 66,90 \pm 11,13 \mu\text{g/mL}$) (Figura 22). Entretanto, não houve diferença significativa entre as frações de acetato de etila e diclorometano, nem entre as frações diclorometano e hexano (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de IC_{50} de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo*, determinados pelo teste de citotoxicidade através do MTT realizado em células K562.

Fração avaliada	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Acetato de etila	$32,94 \pm 6,49a$
Diclorometano	$44,14 \pm 4,76ab$
Hexano	$46,35 \pm 5,28b$
Aquosa	$66,90 \pm 11,13c$

Legenda: Os resultados representam a média \pm desvio padrão. O cálculo da IC_{50} foi realizado por regressão linear utilizando o Graph Pad Prism – versão 5. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

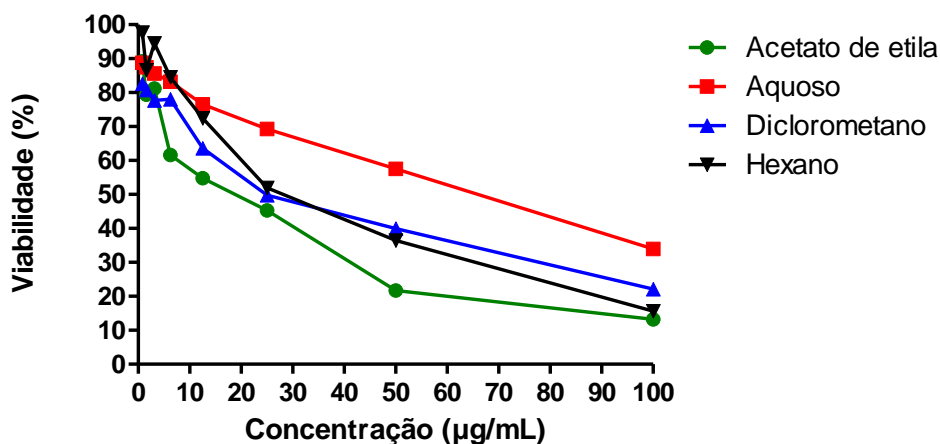


Figura 22 – Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT com células K562 tratadas com diferentes concentrações de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo*. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

3.3.2 Avaliação da morfologia celular

As células tratadas com os extratos de *S. brasiliensis* foram avaliadas por microscopia óptica onde a morfologia celular corroborou os resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT.

Nas concentrações de 600 e 300 µg/mL, as células sofreram lise celular quando incubadas com extratos de folhas e raízes. Paralelamente, nas células tratadas com os extratos na concentração de 150 µg/mL foram observadas algumas células mortas e alterações morfológicas como o aumento do tamanho e conformação alongada das células, o que não foi observado nos controles (Figuras 23 e 24).

Em relação ao extrato de caules, as maiores concentrações (600, 300 µg/mL) causaram alta taxa de lise celular, sendo observado que na medida em que ocorria a diminuição das concentrações dos extratos, maior era a presença de células arredondadas, apresentando características semelhantes às do controle (Figura 25).

Na avaliação da morfologia celular por microscopia óptica das frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*, foi possível observar lise celular nas células incubadas com as frações acetato de etila, diclorometano e hexano na concentração de 100 µg/mL (Figuras 26, 28 e 29). Na concentração de 50 µg/mL haviam muitas células mortas, enquanto outras apresentavam alterações morfológicas, como aumento do tamanho das células, o que não foi observado nos controles (Figuras 26, 27, 28 e 29). Nas outras concentrações, foi observado que conforme ocorria a

diminuição das concentrações das frações, maior era a presença de células arredondadas, apresentando características semelhantes aos controles (Figuras 26, 27, 28 e 29).

Na análise da morfologia celular dos extratos metanólicos obtidos a partir dos materiais produzidos *in vitro* não foi identificada nenhuma alteração morfológica mesmo quando testada a maior concentração (dados não mostrados).

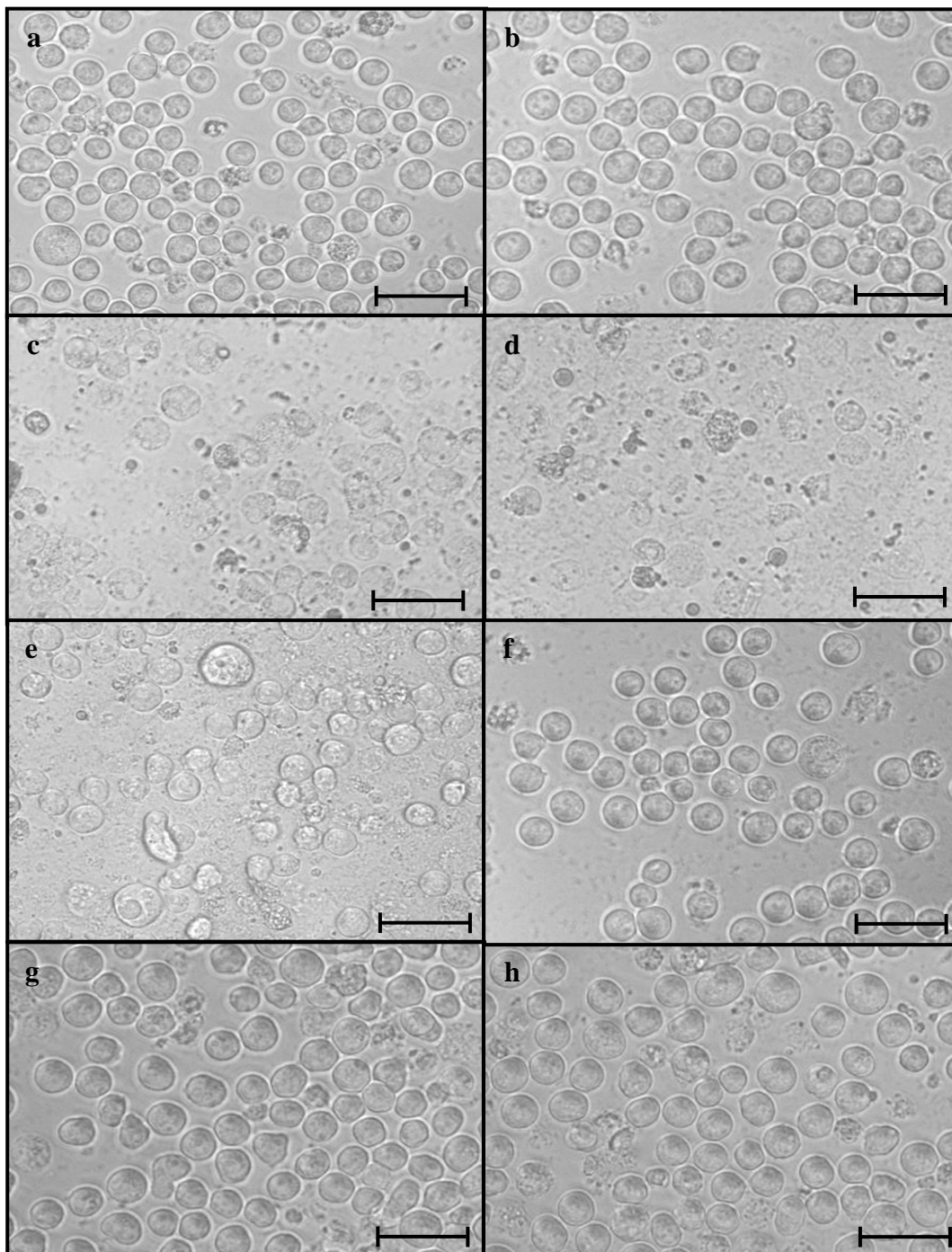


Figura 23 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 600 µg/mL; d) 300 µg/mL; e) 150 µg/mL; f) 75 µg/mL; g) 37,5 µg/mL; h) 18,75 µg/mL. Barra: 20µm.

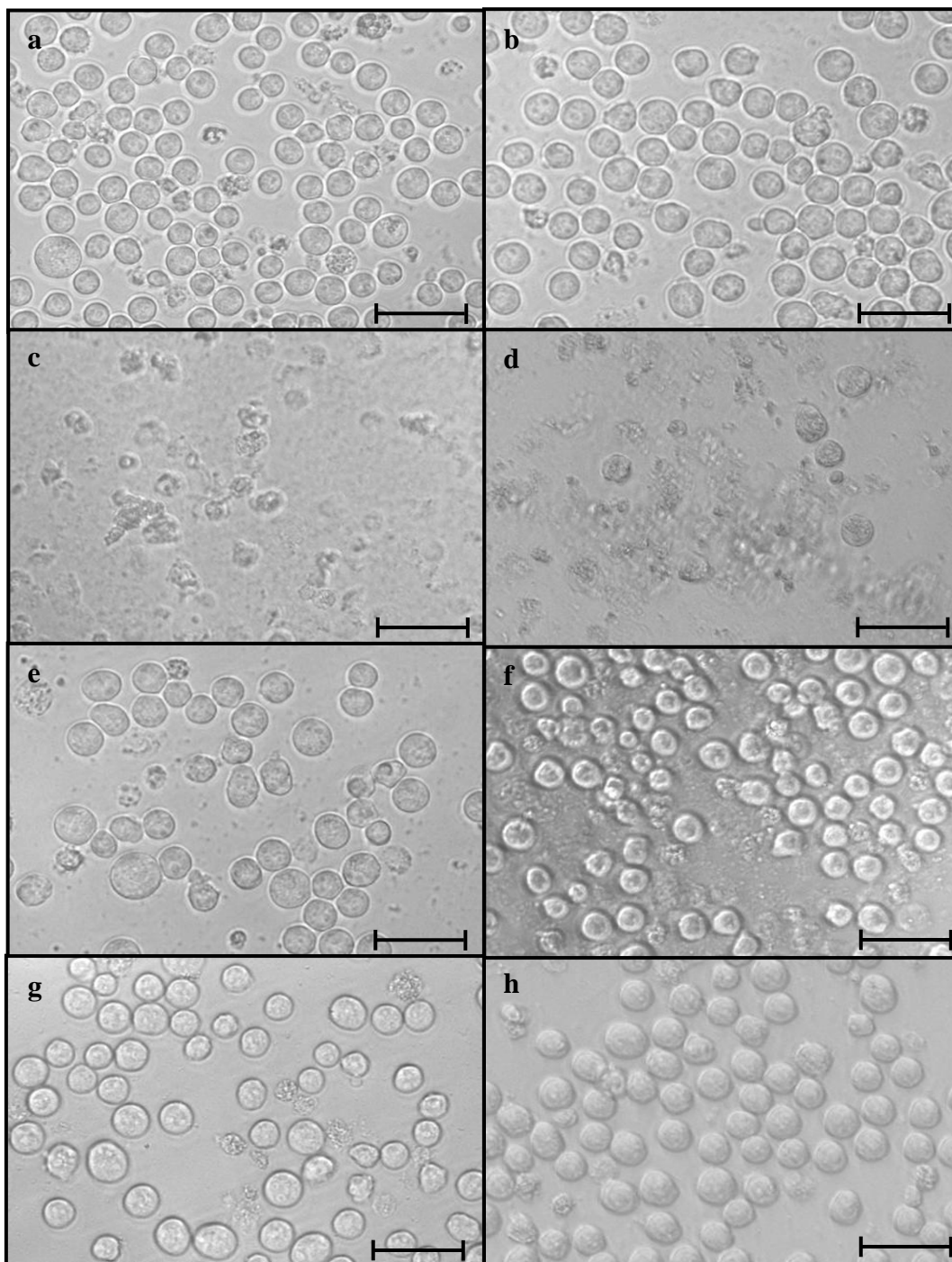


Figura 24 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de raízes de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 600 µg/mL; d) 300 µg/mL; e) 150 µg/mL; f) 75 µg/mL; g) 37,5 µg/mL; h) 18,75 µg/mL. Barra: 20µm.

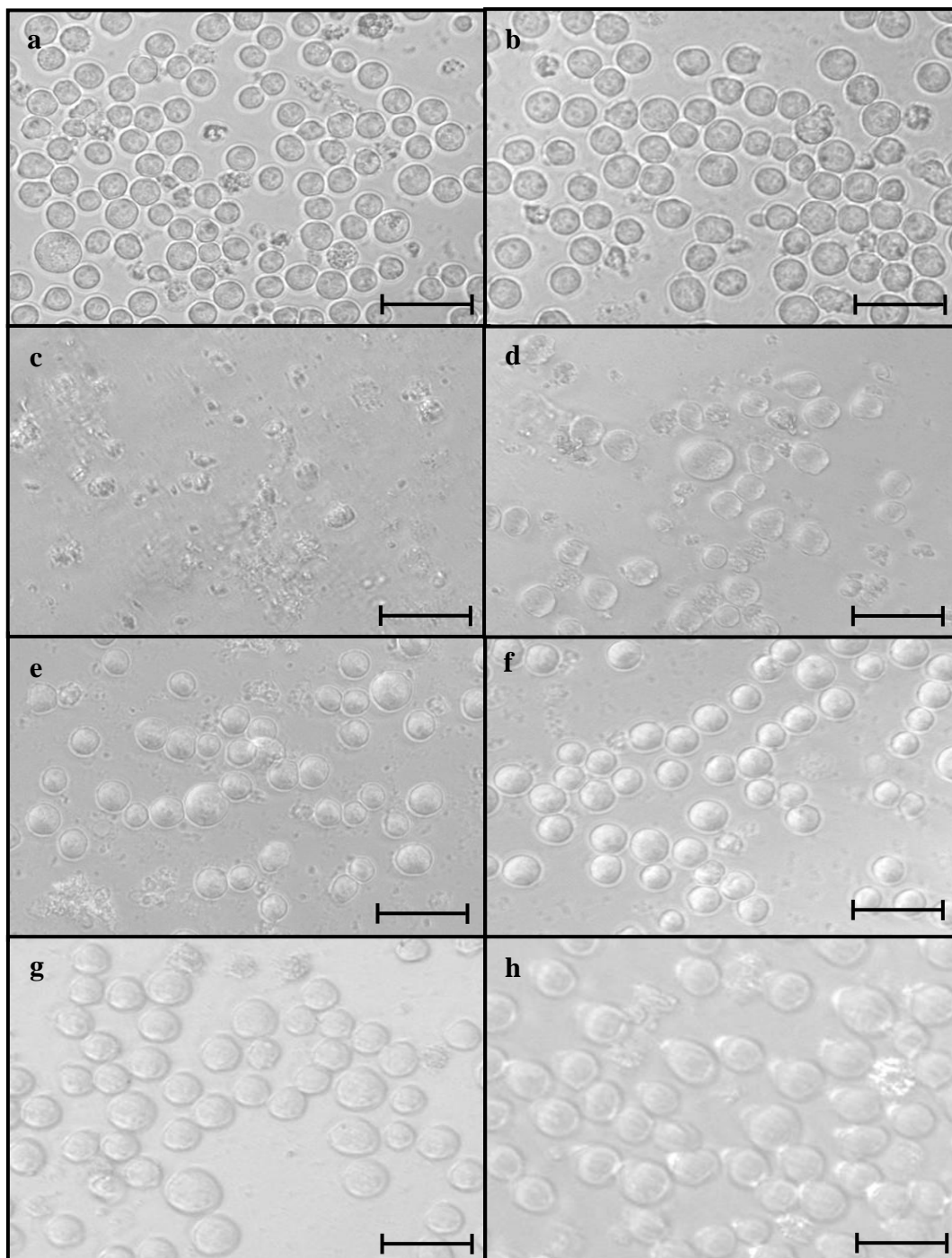


Figura 25 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de caules de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 600 µg/mL; d) 300 µg/mL; e) 150 µg/mL; f) 75 µg/mL; g) 37,5 µg/mL; h) 18,75 µg/mL. Barra: 20µm.

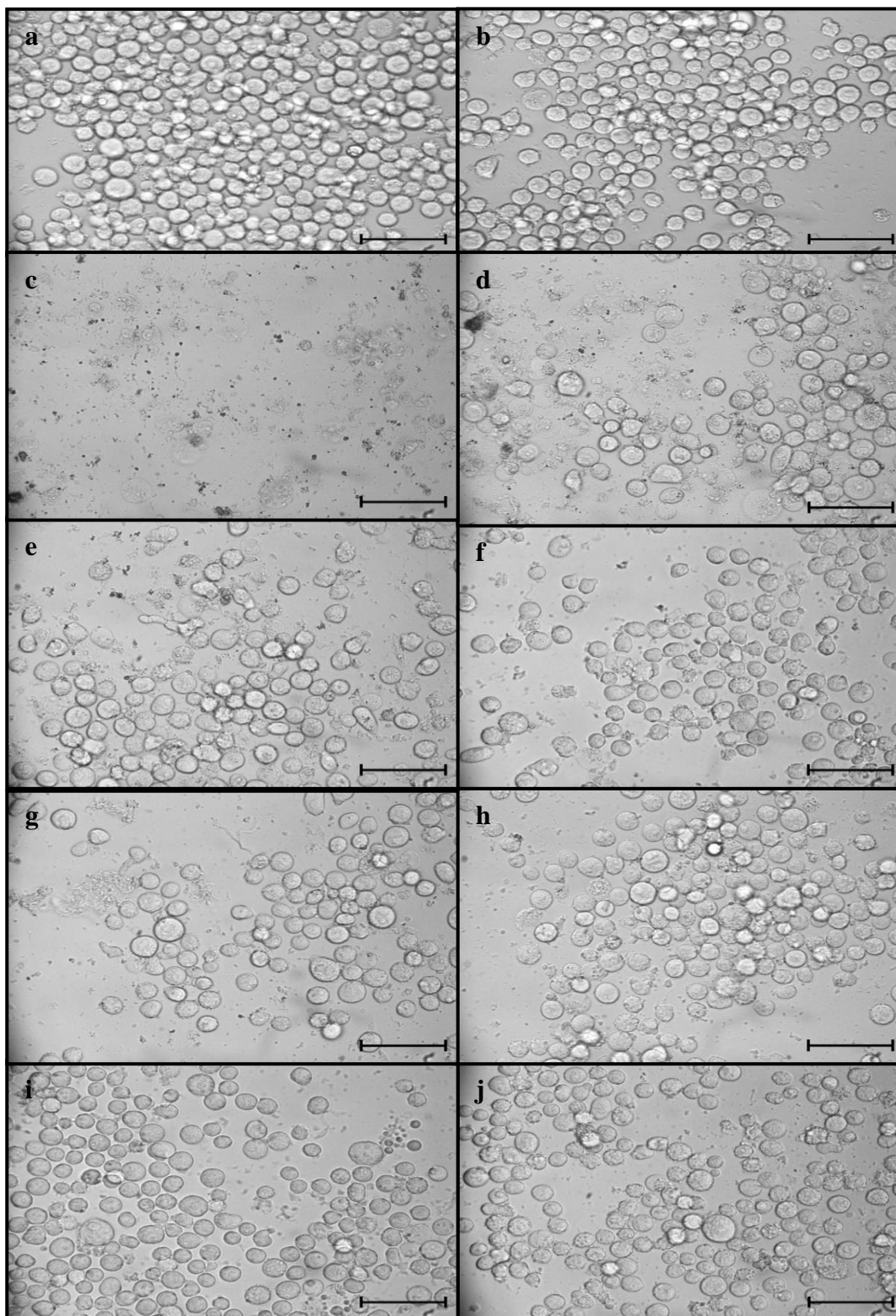


Figura 26 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações da fração acetato de etila obtida a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 100 µg/mL; d) 50 µg/mL; e) 25 µg/mL; f) 12,5 µg/mL; g) 6,25 µg/mL; h) 3,125 µg/mL; i) 1,5625 µg/mL; j) 0,78125 µg/mL. Barra: 20µm.

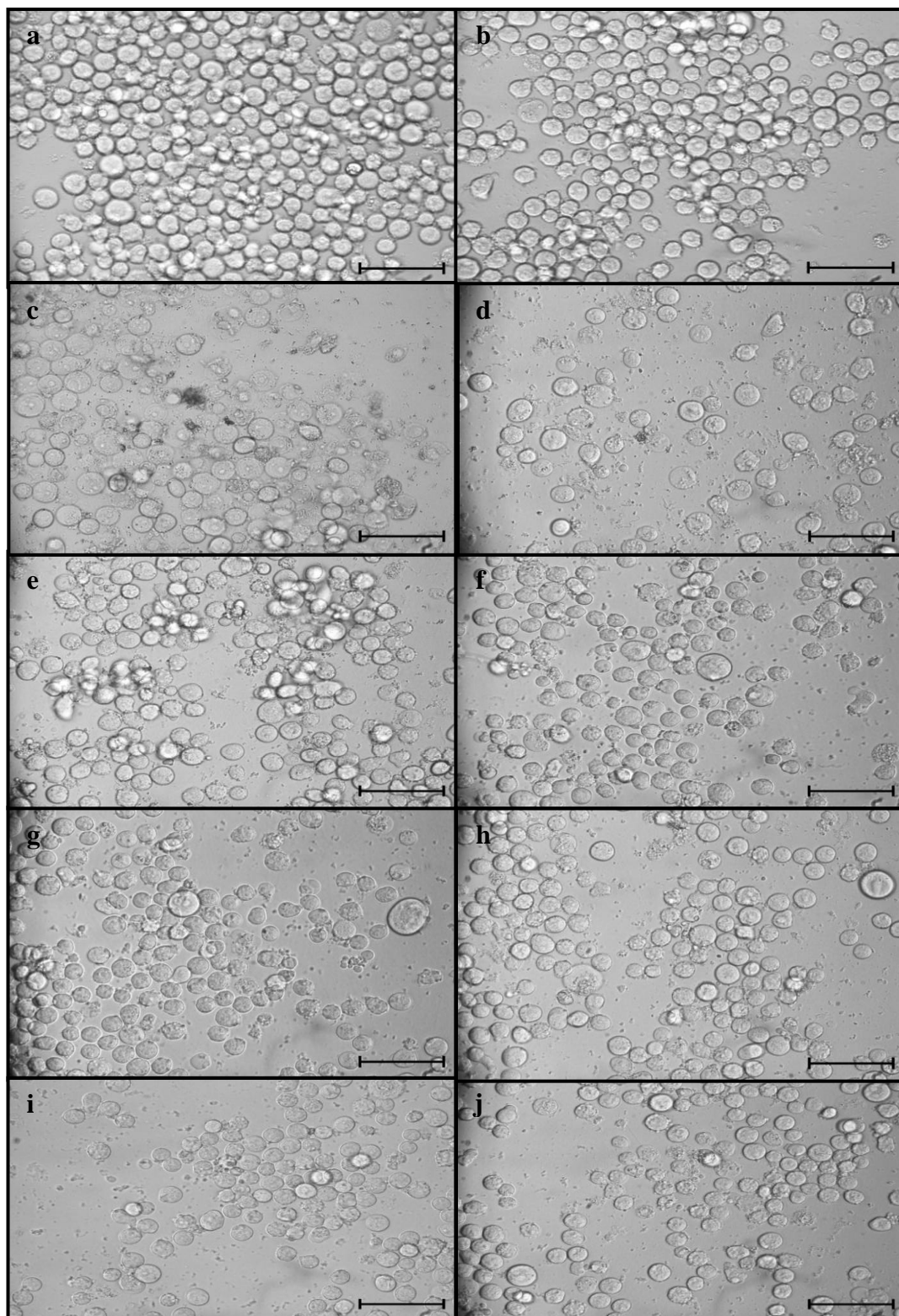


Figura 27 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações da fração aquosa obtida a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 100 µg/mL; d) 50 µg/mL; e) 25 µg/mL; f) 12,5 µg/mL; g) 6,25 µg/mL; h) 3,125 µg/mL; i) 1,5625 µg/mL; j) 0,78125 µg/mL. Barra: 20µm.

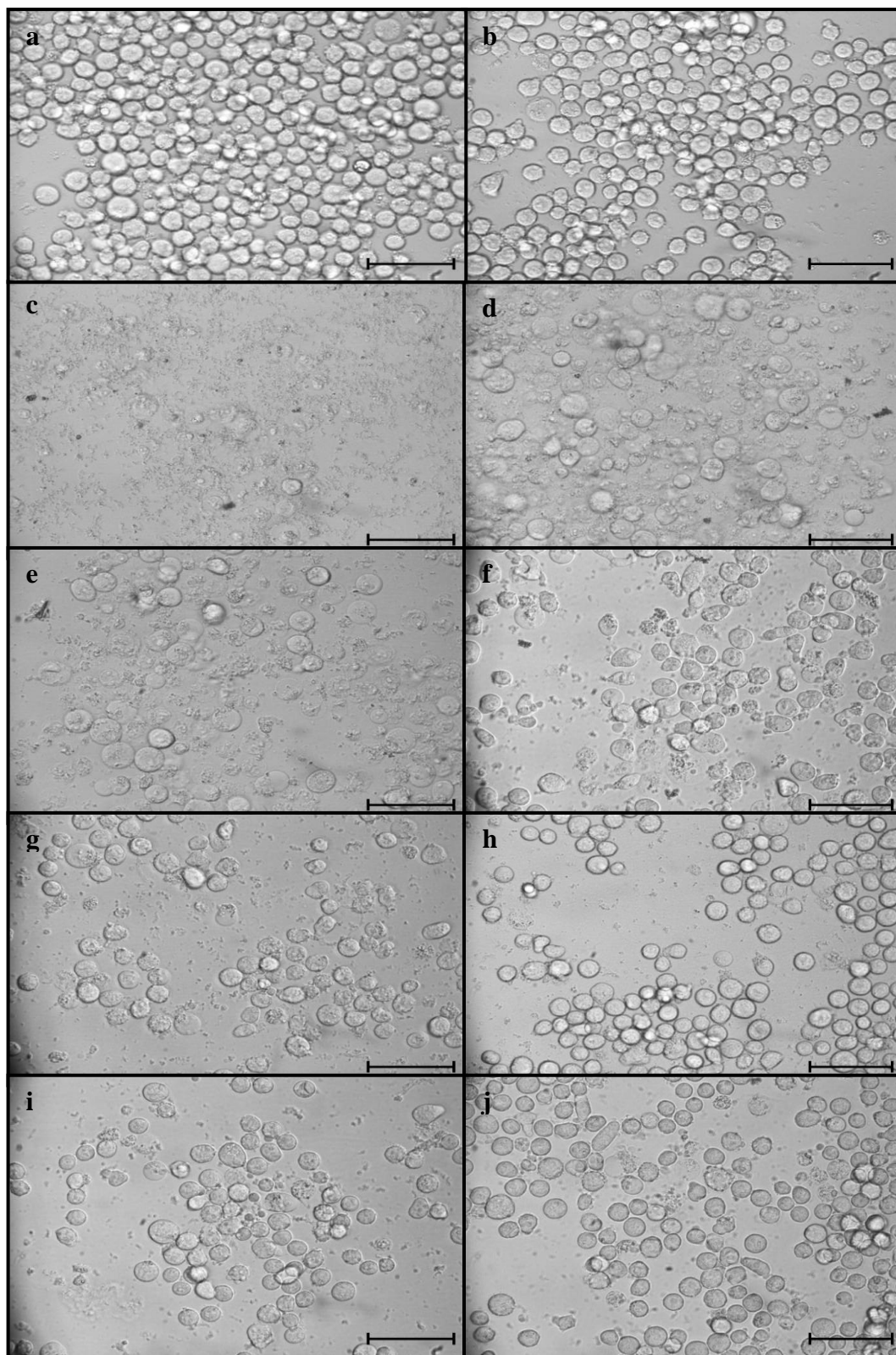


Figura 28 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações da fração diclorometano obtida a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 100 µg/mL; d) 50 µg/mL; e) 25 µg/mL; f) 12,5 µg/mL; g) 6,25 µg/mL; h) 3,125 µg/mL; i) 1,5625 µg/mL; j) 0,78125 µg/mL. Barra: 20µm.

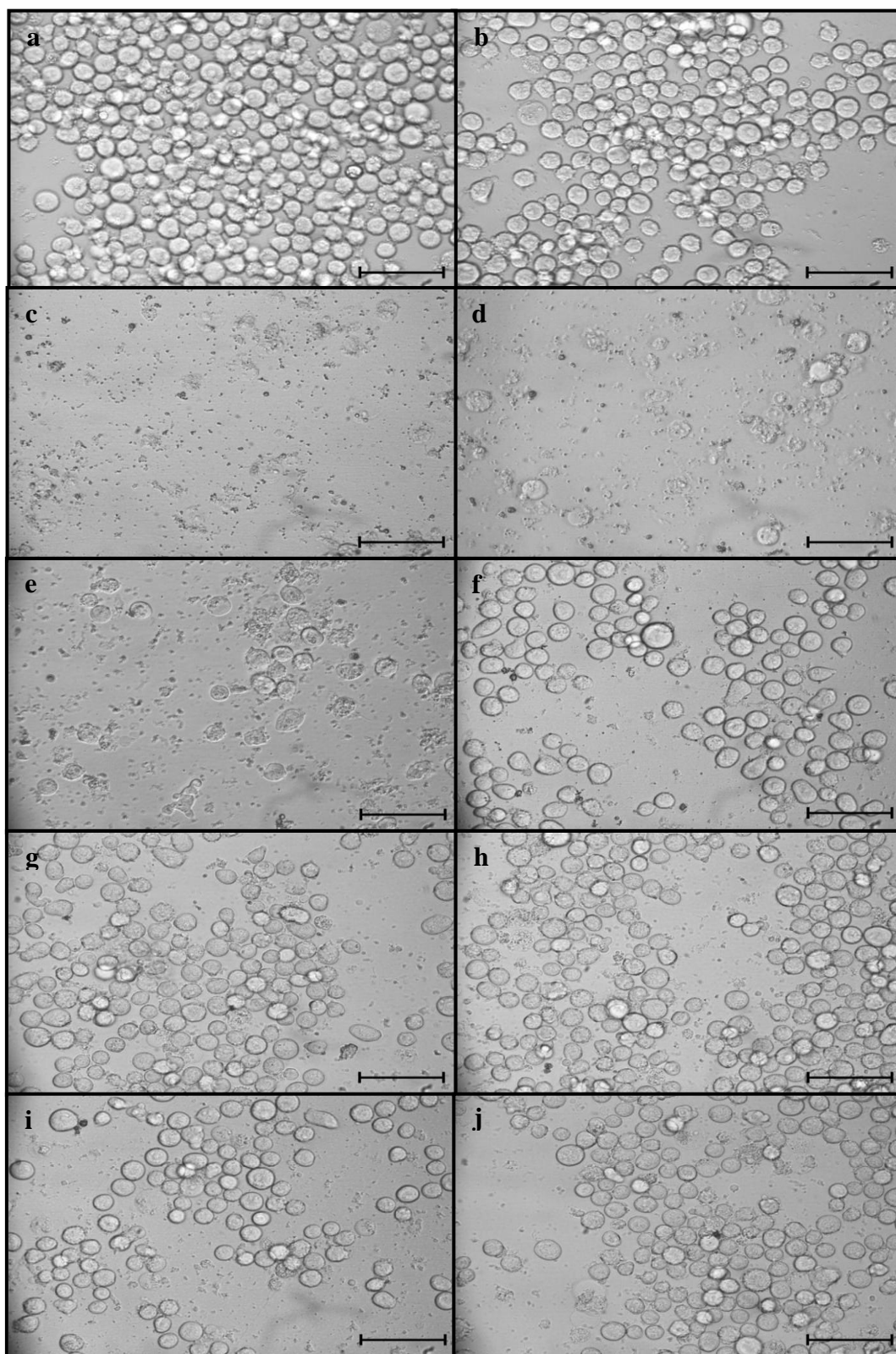


Figura 29 – Células K562 tratadas com diferentes concentrações da fração hexano obtida a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis* cultivada *in vivo* avaliadas pelo método do MTT, observadas por microscopia óptica (aumento de 400 x).

Legenda: a) controle; b) DMSO 0,01%; c) 100 µg/mL; d) 50 µg/mL; e) 25 µg/mL; f) 12,5 µg/mL; g) 6,25 µg/mL; h) 3,125 µg/mL; i) 1,5625 µg/mL; j) 0,78125 µg/mL. Barra: 20µm.

3.3.3 Avaliação da morte celular por apoptose ou necrose

O método de dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo (PI) foi utilizado para avaliar a morte celular por meio da técnica de citometria de fluxo. A linhagem K562 foi tratada com doses correspondentes aos valores de IC₅₀ e metade ($\frac{1}{2}$ de IC₅₀), apenas das frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*, uma vez que estas apresentaram maior citotoxicidade.

Após aquisição no citômetro de fluxo, as células foram consideradas viáveis no quadrante inferior esquerdo, em apoptose no quadrante superior esquerdo, em apoptose tardia/necrose no superior direito e em necrose no inferior direito (Figura 30).

Após 24 horas, foi possível observar que o percentual de células viáveis era reduzido quando tratadas com todas as frações na concentração correspondente ao IC₅₀, principalmente nas frações aquosa (0,5±0,4%), de diclorometano (0,4±0,3%) e de hexano (0,6±0,3%), não havendo diferença significativa entre elas. O tratamento com acetato de etila foi o que apresentou o maior percentual (p<0,05) de células viáveis (7,4±3,3%) (Tabela 9).

Em relação à marcação apenas com PI, o percentual foi alto em todos os tratamentos, entretanto nas frações aquosa, diclorometano e hexano foram obtidos os maiores percentuais, que variaram entre 89,9±4,7 a 91,7±3,3%, não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação da morte de células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC₅₀ de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis*.

IC ₅₀	Morte celular (%)			
	Viáveis	Apoptose	Apoptose tardia/necrose	Necrose
Controle negativo	100a	0,0a	0,0a	0,0a
Controle positivo	2,9±0,6c	24,5±10,8b	76,6±17,8b	0,8±0,7b
Acetato de etila	7,4±3,3b	1,2±0,6c	9,2±5,5c	82,3±5,4c
Aquoso	0,5±0,4d	0,2±0,2a	7,7±2,4c	91,7±3,3c
Diclorometano	0,4±0,3d	0,1±0,1a	8,5±5,2c	91,0±5,6c
Hexano	0,6±0,3d	0,2±0,2a	9,3±5,0c	89,9±4,7c

Legenda: controle negativo = DMSO 0,01%; controle positivo = álcool perílico (1500µM). Os resultados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste ANOVA seguido de Tukey, a 5%.

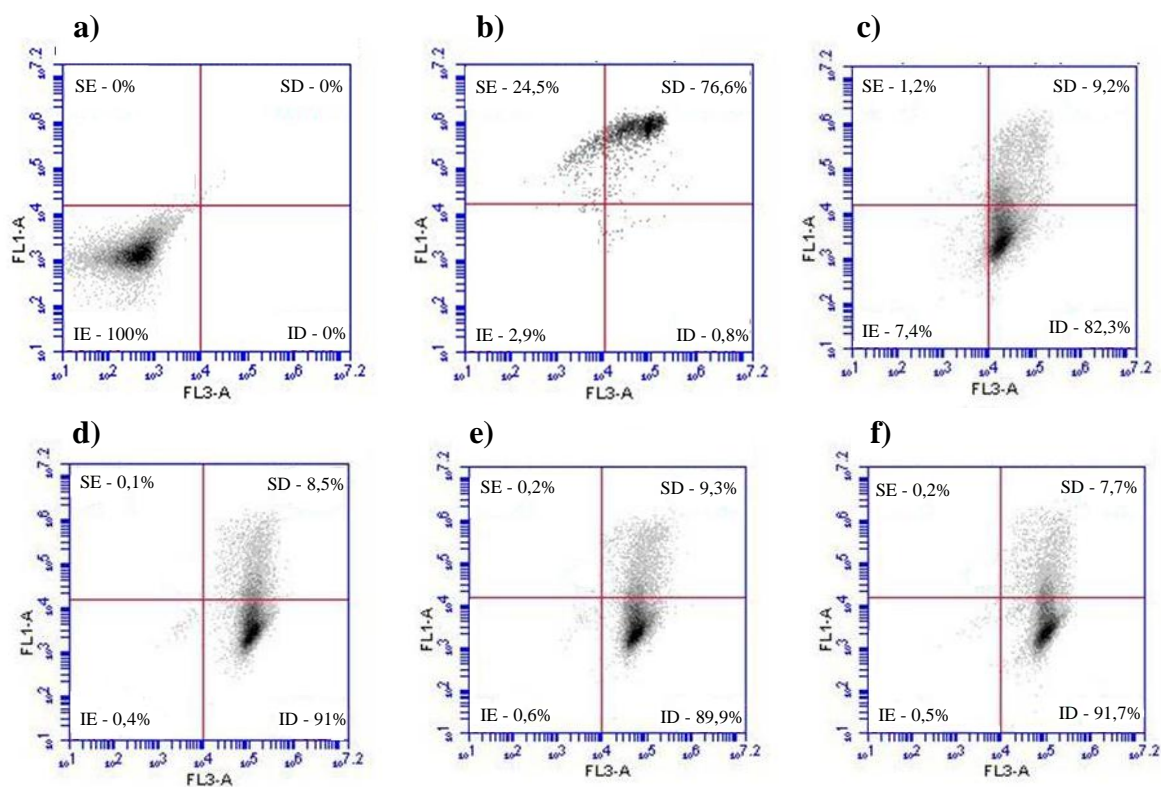


Figura 30 – Citogramas representativos da análise de citometria de fluxo com marcação para anexina V e PI, em células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis*. Os dados são representativos de três experimentos independentes em triplicata.

Legenda: a) controle negativo (DMSO 0,01%); b) controle positivo (álcool perílico - 1500µM); c) fração acetato de etila; d) fração diclorometano e) fração hexano; f) fração aquosa.

Quando tratadas com as concentrações de extrato correspondentes à metade dos valores de IC_{50} , as frações aquosa e diclorometano induziram as maiores porcentagens de necrose ($85,3 \pm 1,0$ e $88,2 \pm 4,4\%$, respectivamente) não havendo diferença significativa entre elas, seguida da fração hexano ($66,4 \pm 4,2\%$) (Tabela 10). Enquanto isso, células tratadas com a fração acetato de etila apresentaram menor percentual de células necróticas ($37,3 \pm 3,6\%$) e maior percentual de células viáveis ($53,1 \pm 3,1\%$) quando comparadas às outras frações (Figura 31).

Tabela 10 – Avaliação da morte de células K562 tratadas com doses correspondentes à metade dos valores de IC₅₀ de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis*.

$\frac{1}{2}$ IC ₅₀	Morte celular (%)			
	Viáveis	Apoptose	Apoptose tardia/necrose	Necrose
Controle negativo	100a	0,0a	0,0a	0,0a
Controle positivo	2,9±0,6b	24,5±10,8b	76,6±17,8b	0,8±0,7b
Acetato de etila	53,1±3,1c	3,8±1,1c	5,6±0,7c	37,3±3,6c
Aquoso	2,0±0,3b	1,3±0,3d	8,5±3,8c	88,2±4,4e
Diclorometano	3,3±0,9b	1,2±0,2d	10,3±0,9c	85,3±1,0e
Hexano	25,1±7,0d	2,1±0,7d	6,4±2,2c	66,4±4,2d

Legenda: controle negativo = DMSO 0,01%; controle positivo = álcool perfílico (1500µM). Os resultados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste ANOVA seguido de Tukey, a 5%.

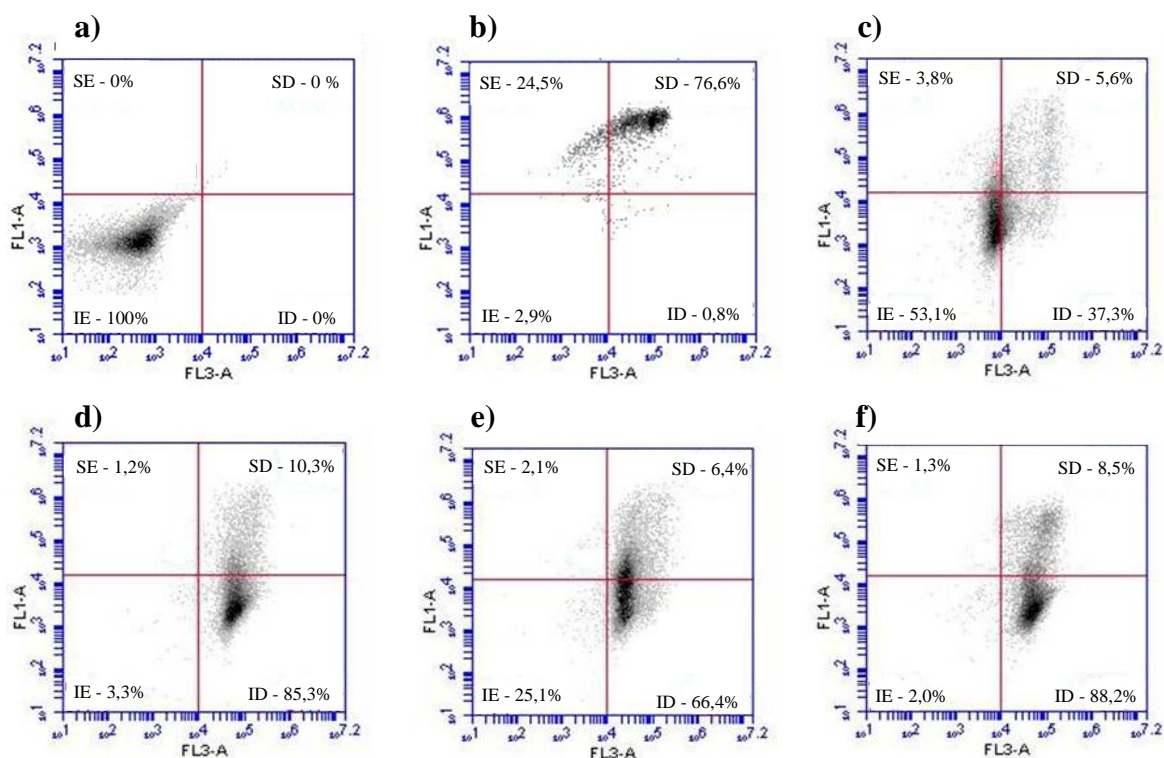


Figura 31 – Citogramas representativos da análise de citometria de fluxo com marcação para anexina V e PI, em células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores da metade do IC₅₀ de frações obtidas a partir de extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis*. Os dados são representativos de três experimentos independentes em triplicata.

Legenda: controle negativo (DMSO 0,01%); b) controle positivo (álcool perfílico - 1500µM); c) fração acetato de etila; d) fração diclorometano e) fração hexano; f) fração aquosa.

3.3.4 Avaliação da fragmentação do DNA e ciclo celular

As avaliações da fragmentação do DNA e ciclo celular foram realizadas por meio da técnica de coloração com iodeto de propídeo (PI) e posterior análise por citometria de fluxo. A linhagem K562 foi tratada com doses correspondentes aos valores de IC_{50} e metade ($\frac{1}{2}$ de IC_{50}), apenas das frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*, uma vez que estas apresentaram maior citotoxicidade.

Em relação à dose do IC_{50} , na avaliação da fragmentação do DNA das células (Sub G0/G1) foi possível determinar que a fração aquosa causou maior percentual de danos ao DNA, sendo detectados $6,5 \pm 1,3\%$ de fragmentação nas células tratadas, em comparação com $3,7 \pm 0,8\%$ nas células não tratadas (controle negativo), representando um aumento de aproximadamente 43% ($p < 0,05$) (Figura 32).

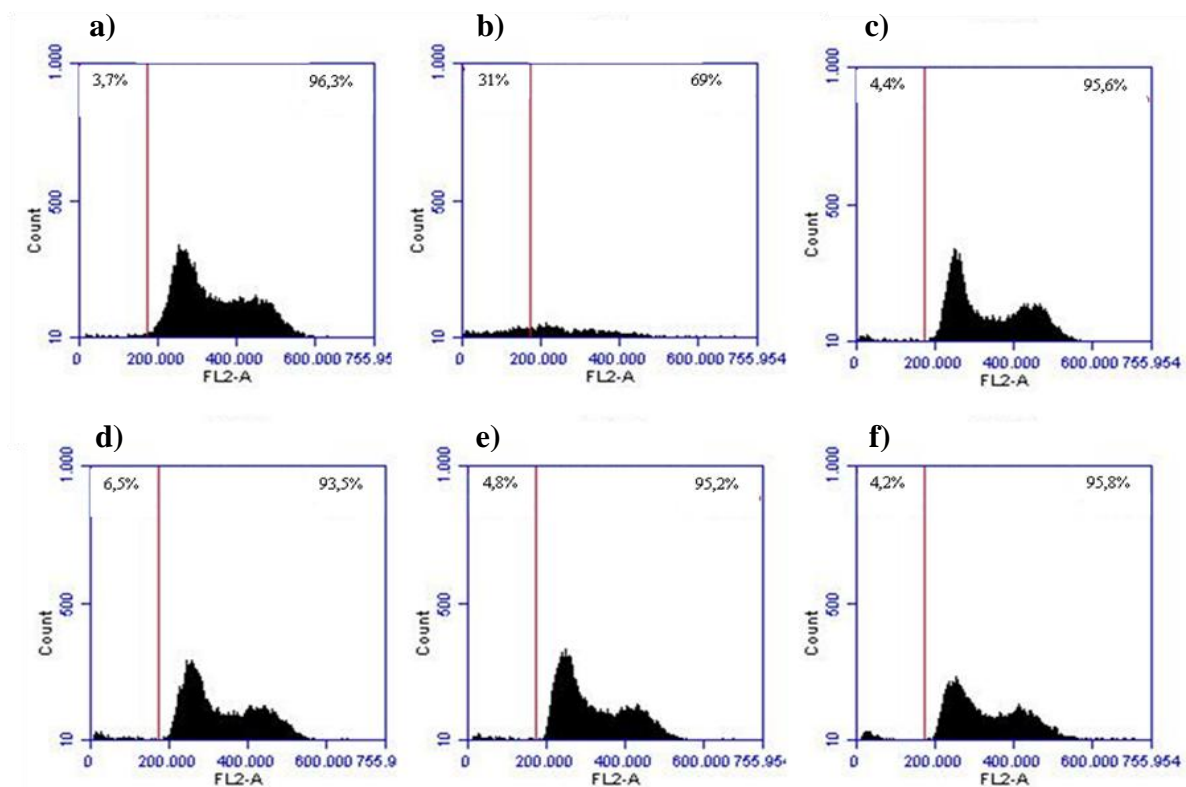


Figura 32 - Histogramas representando a análise da fragmentação de DNA das células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir do extrato metanólico de *Schwartzia brasiliensis* por 24 h. Os dados são representativos de três experimentos independentes em triplicatas.

Legenda: a) controle negativo (DMSO 0,01%); b) controle positivo (álcool perfílico - 1500µM); c) fração acetato de etila; d) fração aquosa; e) fração diclorometano; f) fração hexano.

Na análise do ciclo celular, não houve diferença significativa na progressão das fases G1 e G₂M entre as frações testadas e o controle negativo (células tratadas com DMSO 0,01%). Paralelamente, foi possível observar que ocorreu um aumento de células na fase S ($p < 0,05$) nas células tratadas com as frações acetato de etila e hexano, com aumento de aproximadamente 1% (Tabela 11). Quanto à poliploidia não houve diferença significativa entre as frações e os controles.

Tabela 11 – Avaliação da fragmentação do DNA e distribuição das fases do ciclo celular em células K562 tratadas com doses correspondentes aos valores de IC₅₀ de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis*.

IC ₅₀	Fases do ciclo celular (%)				
	PP	Sub G0/G1	G1	S	G ₂ M
Controle negativo	2,8±1,4a	3,7±0,8a	43,4±4,6a	16,6±0,4a	33,1±4,5a
Controle positivo	7,4±4,9a	30,9±2,9b	24,7±3,7b	10,1±5,2b	12,4±7,1b
Acetato de etila	2,8±0,8a	4,4±1,3a	41,0±10,2a	18,1±0,2c	33,3±10,5a
Aquoso	2,0±0,1ab	6,5±1,3c	42,4±4,7a	18,8±2,0ac	26,3±4,7a
Diclorometano	2,2±0,3a	4,8±1,1a	46,2±6,9a	17,1±1,4ac	29,3±6,7a
Hexano	1,8±0,6ab	4,2±0,5a	47,9±6,4a	18,4±1,2c	27,1±5,9a

Legenda: controle negativo = DMSO 0,01%; controle positivo = álcool perfílico (1500µM); PP = poliploidia. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste ANOVA seguido de Tukey, a 5%.

Na análise das células submetidas ao tratamento com doses referentes à metade do IC₅₀ (½ IC₅₀) das frações não houve diferença significativa entre o controle negativo e os tratamentos com as frações de *S. brasiliensis* em relação à fragmentação do DNA (Figura 33), sendo observado apenas um aumento do número de células na fase S do ciclo celular, nos tratamentos com as frações de acetato de etila e de hexano (Tabela 12).

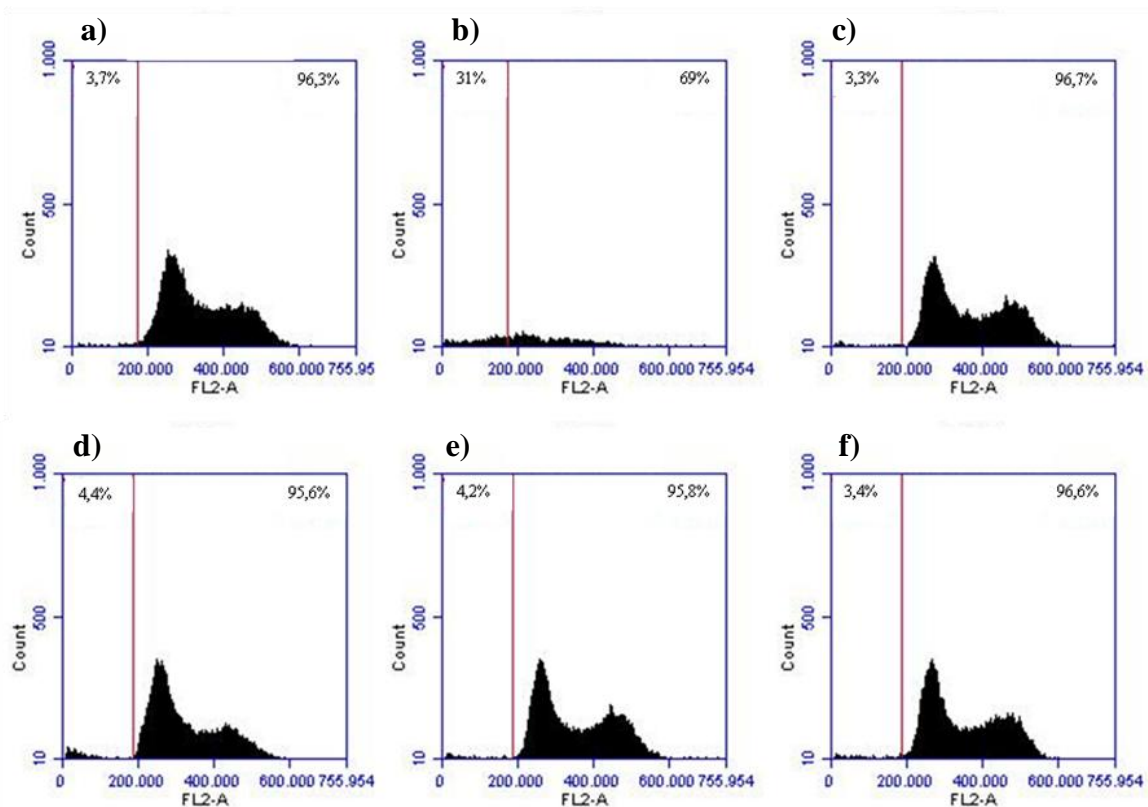


Figura 33 - Histogramas representando a análise da fragmentação de DNA das células K562 tratadas com doses correspondentes à metade dos valores de IC_{50} de frações obtidas a partir do extrato metanólico de *Schwartzia brasiliensis* por 24 h. Os dados são representativos de três experimentos independentes em triplicatas.

Legenda: a) controle negativo (DMSO 0,01%); b) controle positivo (álcool perílico - 1500µM); c) fração acetato de etila; d) fração aquosa; e) fração diclorometano; f) fração hexano.

Tabela 12 – Avaliação da fragmentação do DNA e distribuição das fases do ciclo celular em células K562 tratadas com doses correspondentes à metade dos valores de IC₅₀ de frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *Schwartzia brasiliensis*.

$\frac{1}{2}$ IC ₅₀	Fases do ciclo celular (%)				
	PP	SubG0/G1	G1	S	G ₂ M
Controle negativo	2,8±1,4a	3,7±0,8a	43,4±4,6a	16,6±0,4a	33,1±4,5a
Controle positivo	7,4±4,9a	30,9±2,9b	24,7±3,7b	10,1±5,2b	12,4±7,1b
Acetato de etila	4,1±1,9a	3,3±0,9a	36,1±5,3a	18,4±1,1c	37,6±6,6a
Aquoso	1,8±0,2ab	4,4±0,8a	46,3±4,9a	18,3±2,1ac	26,6±5,5a
Diclorometano	3,3±1,9a	4,2±1,5a	42,0±7,4a	16,9±0,8ac	33,2±9,1a
Hexano	2,2±1,1a	3,4±0,4a	42,9±7,5a	17,5±0,3c	32,6±8,4a

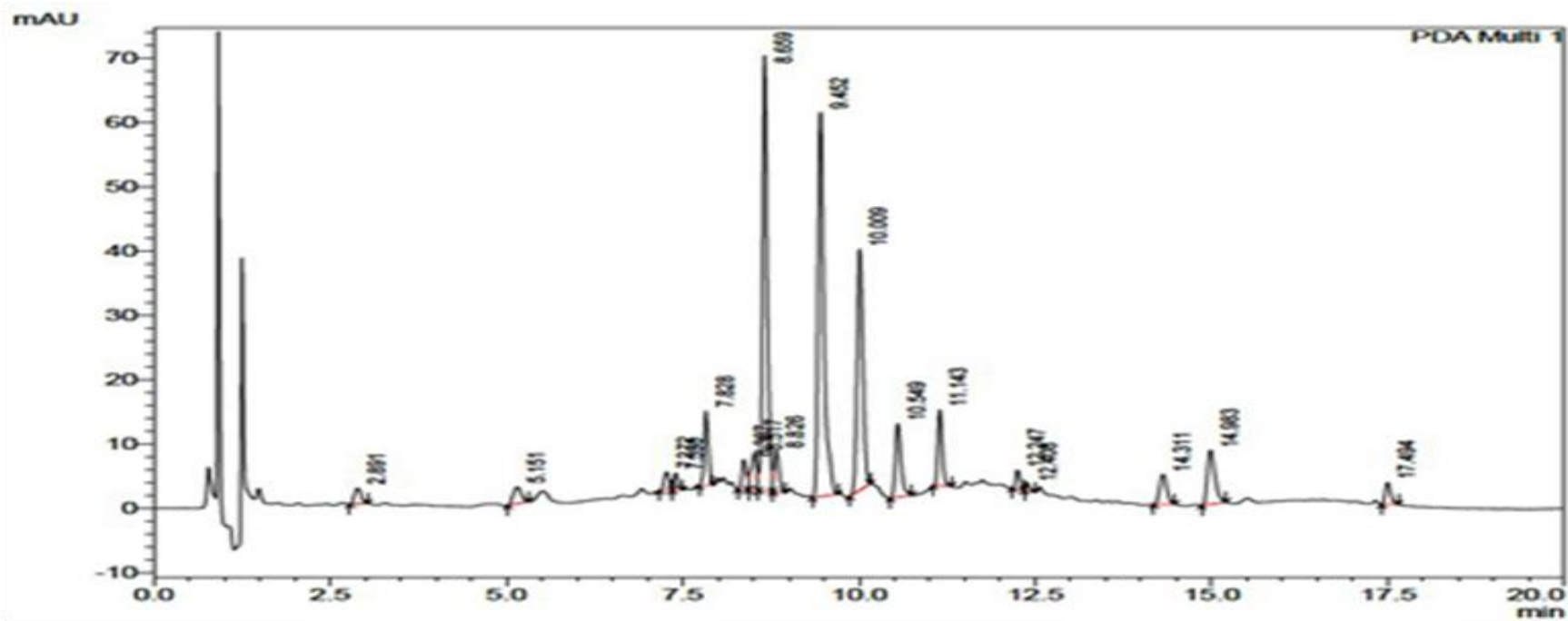
Legenda: controle negativo = DMSO 0,01%; controle positivo = álcool perfílico (1500µM); PP = poliploidia. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste ANOVA seguido de Tukey, a 5%.

3.4 Análise do perfil fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-UV-DAD)

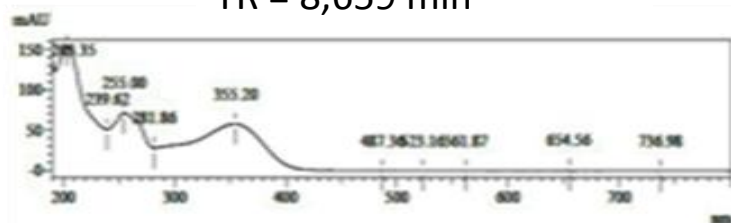
O perfil fitoquímico de diferentes materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* de *S. brasiliensis* foi definido a partir de extratos e frações que apresentaram resultados positivos nas avaliações biológicas realizadas no presente trabalho. A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-UV-DAD).

A análise cromatográfica do extrato metanólico e frações obtidas a partir de folhas da espécie cultivada *in vivo*, assim como do extrato metanólico de suspensões celulares obtidas *in vitro* com 21 dias de crescimento, indicaram a presença de substâncias com picos de absorção em 254 e 340 nm e tempos de retenção (TR) entre 8,659 e 32,673 minutos (Figura 34). As análises dos espectros de absorvância dos picos majoritários em extratos e frações sugerem se tratar da classe química dos flavonoides, devido aos seus padrões característicos de absorção, com 2 a 3 picos de absorvância (Figura 34).

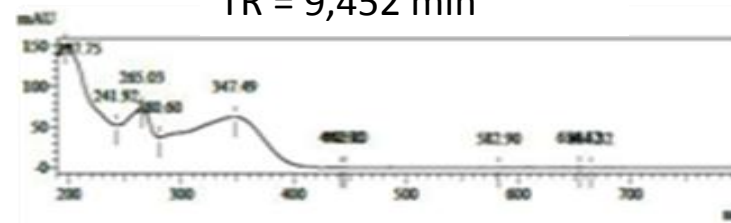
A

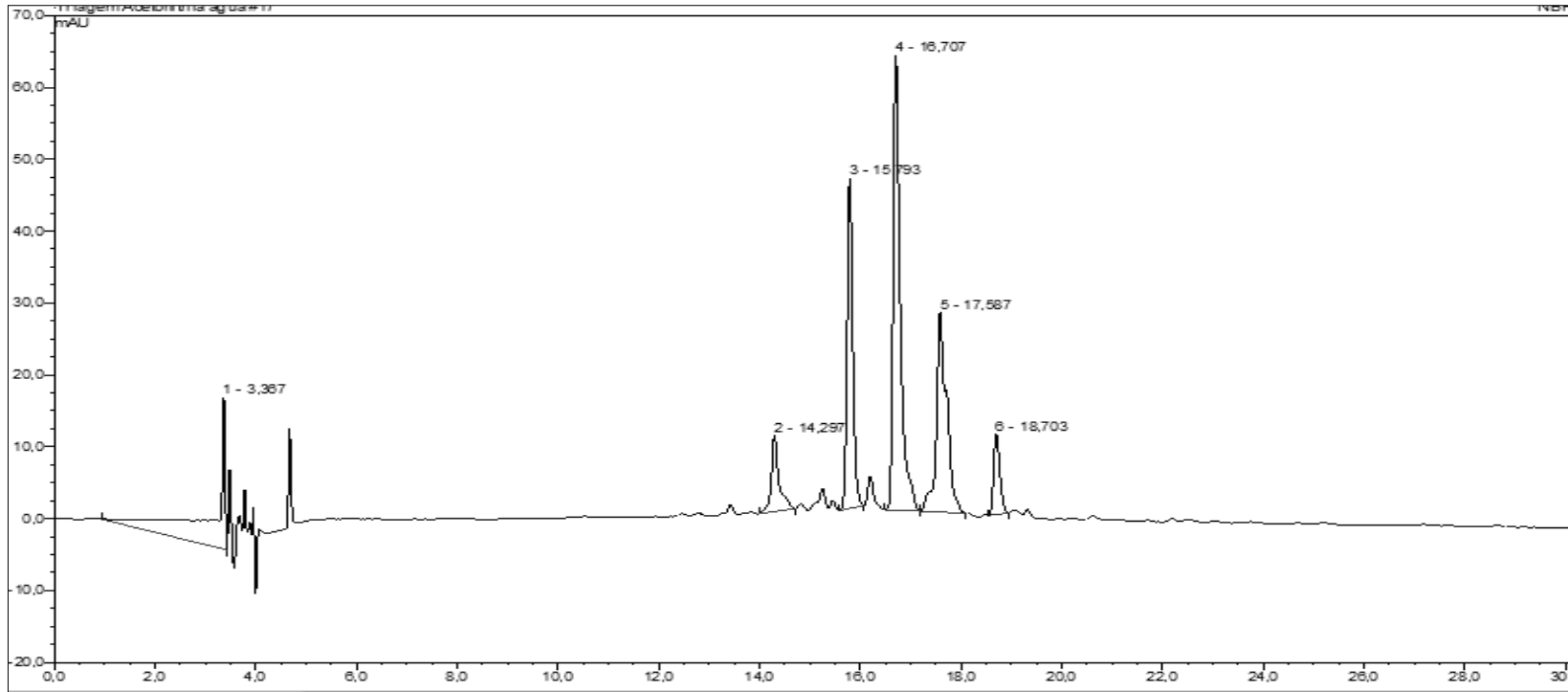


TR = 8,659 min



TR = 9,452 min

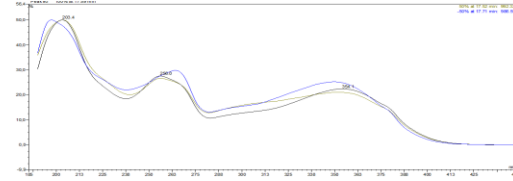
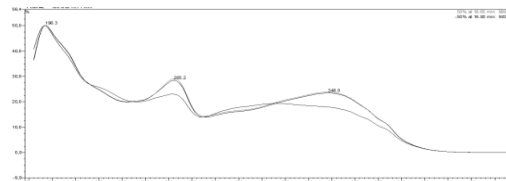
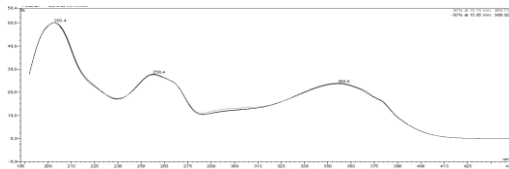


B

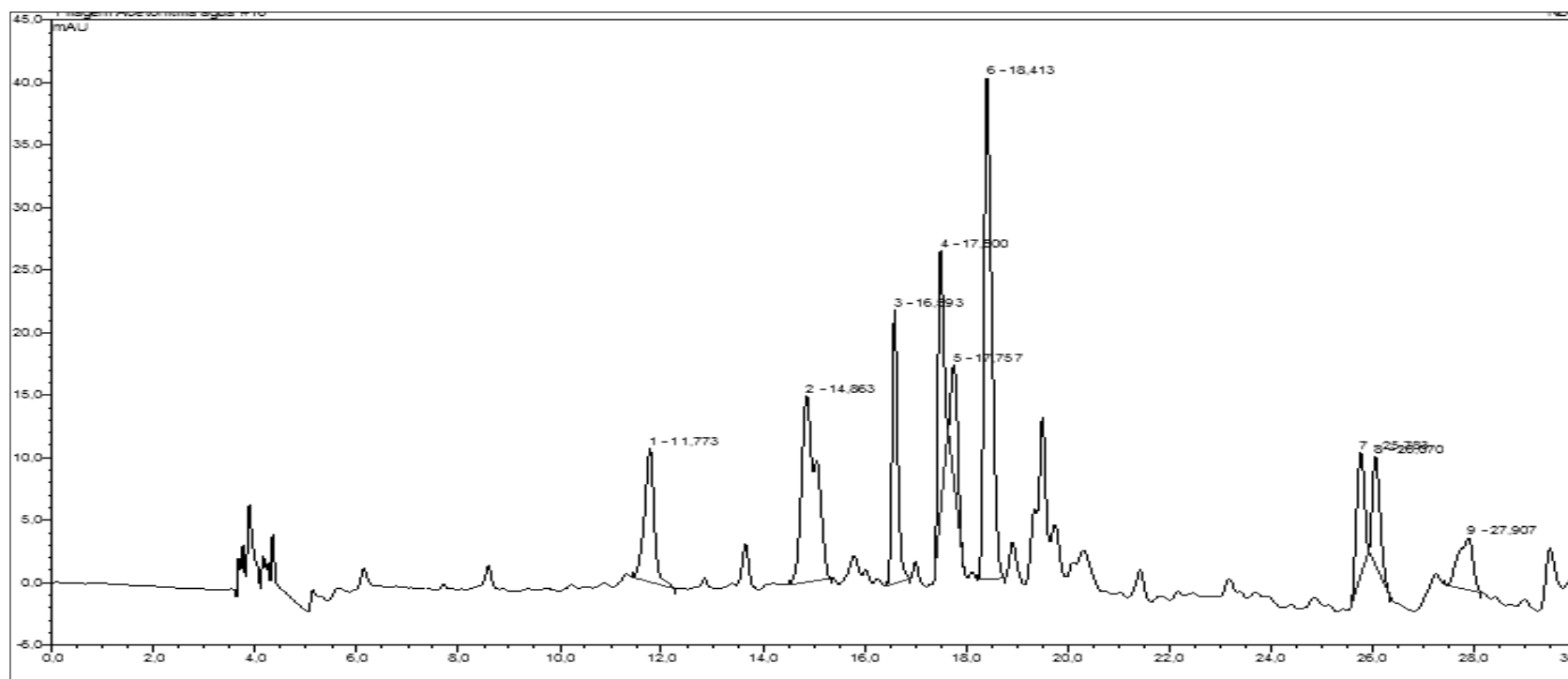
TR = 15, 793 min

TR = 16, 707 min

TR = 17, 567 min



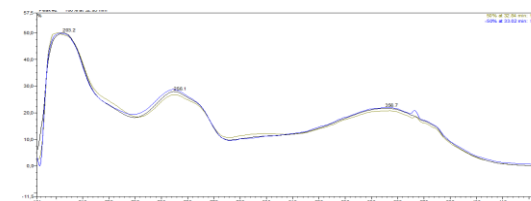
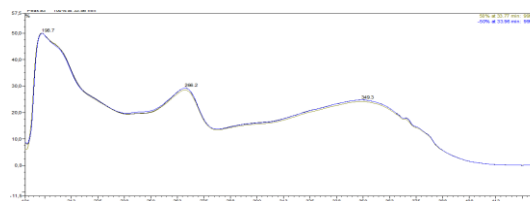
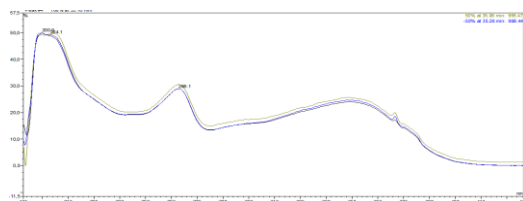
C

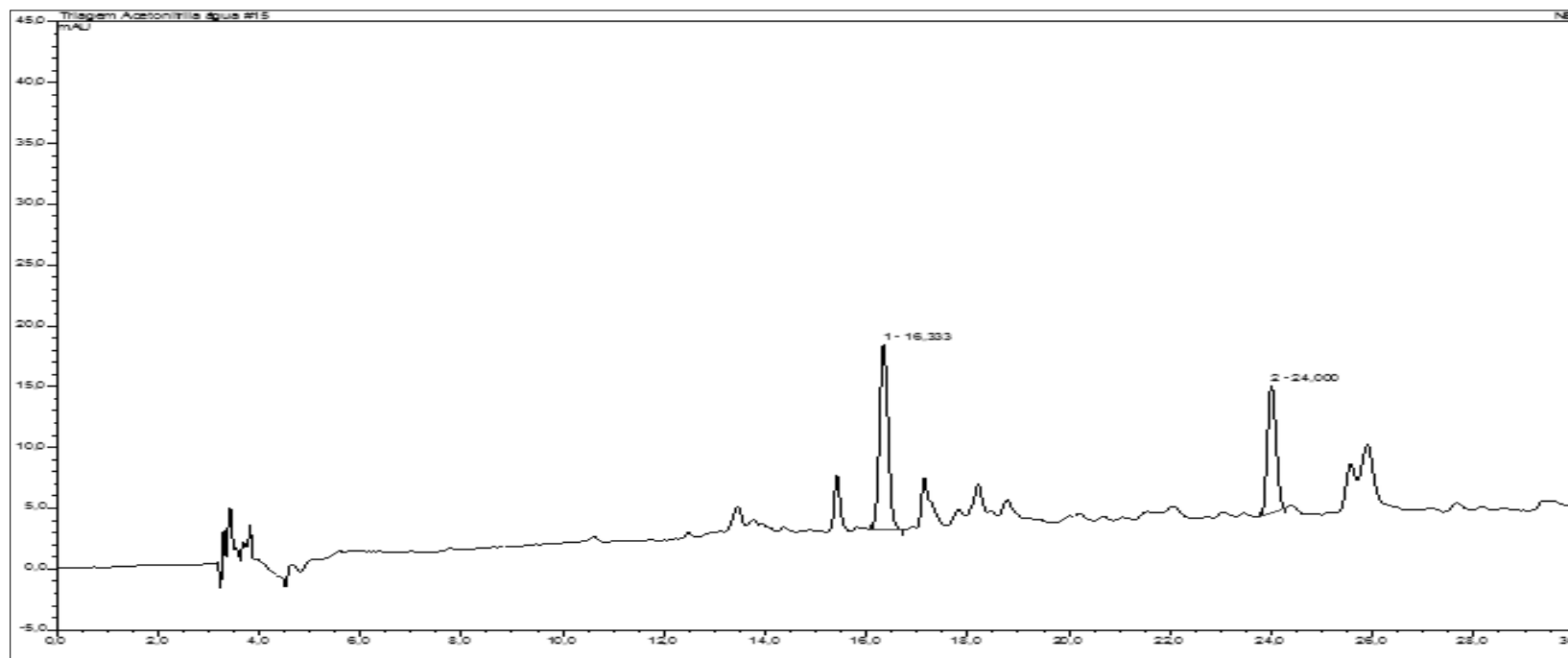


TR = 16, 593 min

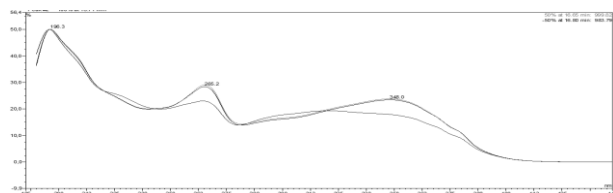
TR = 17, 800 min

TR = 18, 413 min

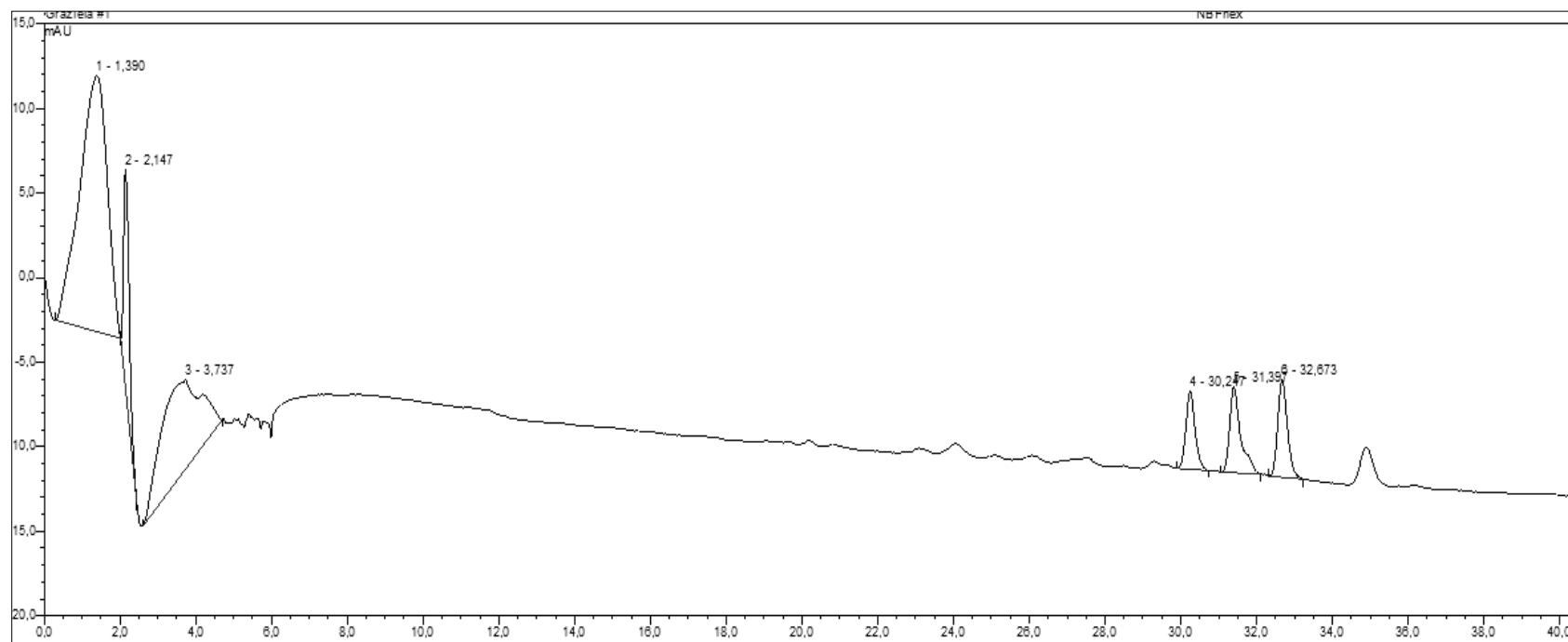


D

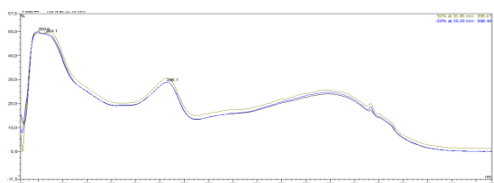
TR = 16, 333 min



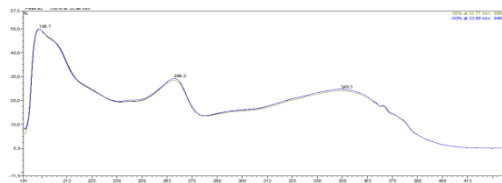
E



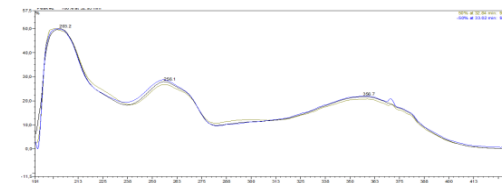
TR = 30, 247 min



TR = 31, 396 min



TR = 32, 673 min



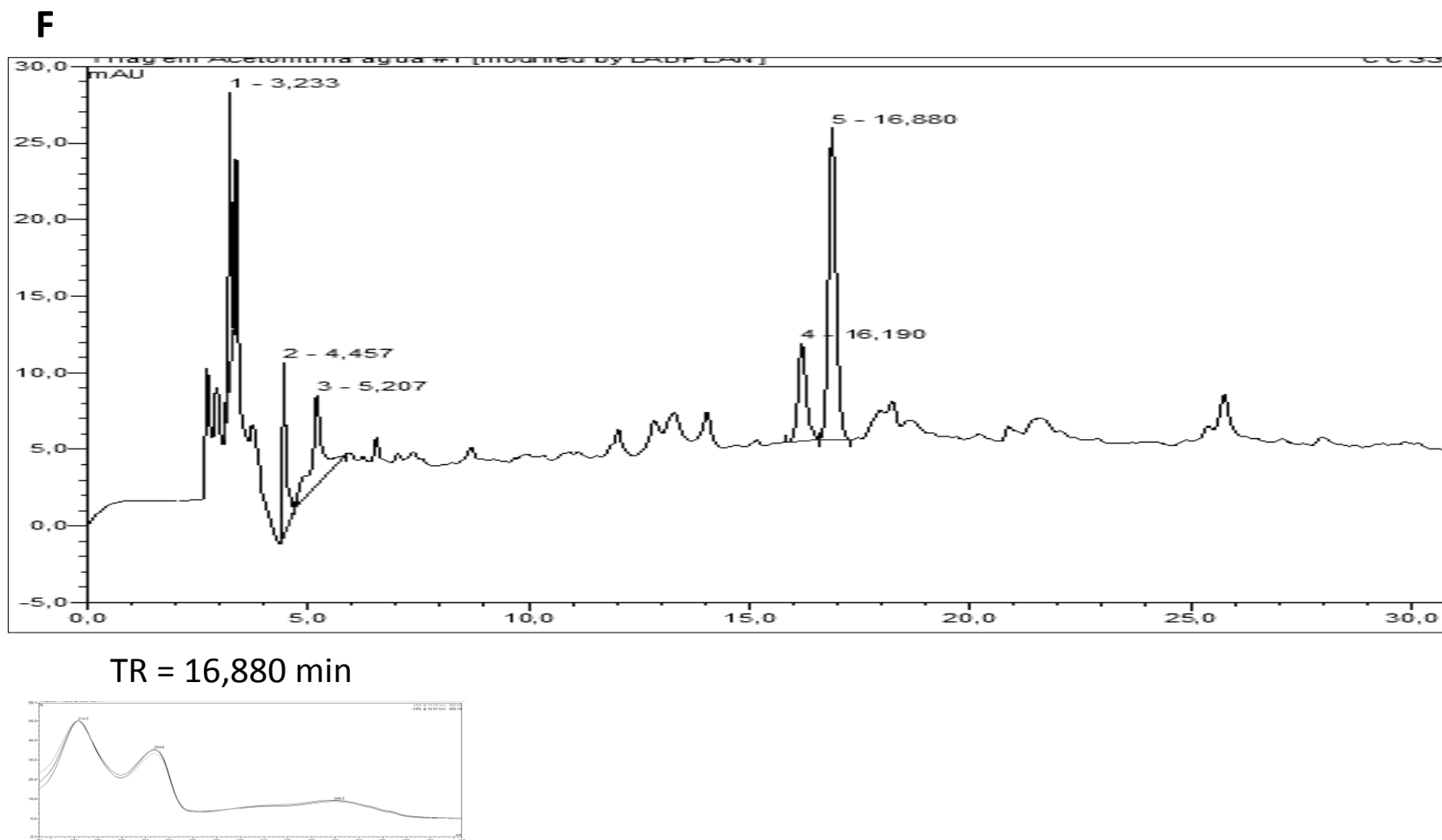


Figura 34 - Análise por CLAE-UV-DAD dos compostos majoritários de extratos e frações de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* de *Schwartzia brasiliensis* e seus espectros característicos na região do ultravioleta.

Legenda: A) extrato metanólico de folhas; B) fração aquosa de folhas; C) fração acetato de etila de folhas; D) fração diclorometano de folhas; E) fração hexano de folhas; F) extrato metanólico de suspensões celulares. TR = tempo de retenção.

4 DISCUSSÃO

As técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido amplamente utilizadas para a produção de muitas substâncias de interesse comercial e farmacológico, em especial culturas de calos e de suspensões celulares (GEORGE, 2008; WILSON et al., 2014; GANDHI et al., 2015). Nesse sentido, os resultados obtidos no presente trabalho visando ao estabelecimento das culturas de calos e de células em suspensão de *S. brasiliensis* são de grande relevância quando se pretende o estudo do potencial medicinal da espécie.

Sabe-se que diversos fatores podem influenciar o processo de indução da calogênese, por isso, no presente estudo, foi avaliada a resposta de diferentes explantes frente a diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores e a presença ou ausência de luz.

A composição e a concentração hormonal usadas na cultura de tecidos vegetais são fatores muito estudados, tendo em vista a grande influência que exercem na resposta morfogênica. Em relação à indução de calos, comumente são utilizados reguladores da classe das auxinas e citocininas, de forma isolada ou em combinação, em diferentes concentrações. As auxinas estão relacionadas principalmente ao alongamento, divisão e diferenciação celular, enquanto as citocininas predominantemente estimulam as divisões celulares. Assim, através do balanço entre estas duas classes hormonais, é possível obter uma variedade de calos, com diferentes colorações, grau de compactação e capacidade morfogênica (GEORGE, 2008).

No presente estudo, a adição de diferentes reguladores de crescimento ao meio de cultura resultou em diferentes respostas morfogênicas, levando à formação de calos friáveis, compactos e também à produção de brotos por organogênese indireta.

A combinação da citocinina BAP com a auxina ANA propiciou o desenvolvimento de calos compactos, com coloração verde, a partir de explantes foliares mantidos na presença de luz, conforme mostrado na Figura 7. A luz é um fator importante na formação de cloroplastos e sua incidência contínua pode induzir a coloração verde em calos (GEORGE, 2008). Diferentes tipos e cores de luzes podem influenciar no acúmulo de biomassa e produção de metabólitos especiais (NHUT et al., 2015; AHMAD et al., 2016). Além disso, tem sido relatado em diversos trabalhos,

o potencial morfogênico de calos verdes e compactos (VARSHNEY et al., 2011; CAI et al., 2015; CYBULARZ-URBAN et al., 2015).

Calos compactos podem ser utilizados no desenvolvimento de Culturas de Agregados de Calos, cuja sigla em inglês é CCC (*Compact Callus Clusters*), que já demonstraram ser um potencial sistema de produção de metabólitos como foi verificado em *Catharanthus roseus* (ZHAO et al., 2001), *Saussurea medusa* (FU et al., 2005) e *Hovenia dulcis* (RIBEIRO et al., 2015).

A combinação de BAP e ANA propiciou também o desenvolvimento de brotos a partir de calos oriundos de explantes caulinares, resposta que pode ser otimizada visando à multiplicação de brotos. Os trabalhos realizados pelo grupo com a espécie não alcançaram a produção massal de brotos (CAMPOS, 2003; SÁ, 2010) e não há outros relatos. Apesar de a formação de órgãos por meio indireto, passando pela fase de calo, aumentar as chances de variação somaclonal, esta pode ter seu uso direcionado para o melhoramento genético (TERMIGNONI, 2005).

A combinação da auxina PIC com a citocinina KIN mostrou-se eficiente na indução de calos friáveis, que apresentaram coloração bege, apesar de algumas áreas apresentarem oxidação, conforme mostrado nas Figuras 5 e 6. Tem sido descrito que a luz influencia na indução e eficiência do processo de calogênese, podendo levar à maior produção de biomassa quando comparada a culturas mantidas no escuro (DA ROCHA et al., 2015; LAGE et al., 2015). Entretanto, a incidência luminosa também pode favorecer a produção de compostos fenólicos, os quais podem interferir na atividade dos reguladores de crescimento e levar à oxidação do material (GEORGE, 2008), resposta que foi observada em algumas culturas de calos de *S. brasiliensis* obtidas neste trabalho.

Na avaliação do tipo de explante, os órgãos que melhor favoreceram a indução da calogênese em *S. brasiliensis* foram folha e caule. Entretanto, explantes foliares mostraram-se mais adequados ao acúmulo de biomassa, considerando os valores de peso seco, conforme demonstrado na Tabela 4. Trabalhos têm sugerido essa fonte de explante como a ideal para iniciar a formação de calos *in vitro* (KAMRUZZAMAN et al., 2015; KUMLAY & ERCISLI et al., 2015), uma vez que esse órgão normalmente oferece boa quantidade de segmentos (explantes) para inoculação, menor taxa de contaminação e tem sido considerado uma importante fonte de metabólitos especiais (NANDAGOPAL & KUMARI, 2007; SINAVESAN & JEONG, 2009).

Uma vez estabelecidas as melhores condições para o crescimento de massa calogênica, foi aplicada a estratégia de elicitação, visando otimizar a produção *in vitro* de massas celulares. Este é o primeiro trabalho a fazer uso de elicitores em cultura de calos de *S. brasiliensis* e o protocolo proposto mostrou-se eficiente no aumento de massa calogênica.

O uso de elicitores tem sido adotado, frequentemente, para aumentar a síntese de metabólitos *in vitro*. Contudo, tem sido relatada a eficácia dessas substâncias, também no aumento de biomassa celular, o que é extremamente desejável em trabalhos desta natureza, quando se consegue a associação de maior produção de biomassa e acúmulo de metabólitos (PARALE et al., 2010; SIVANANDHAN et al., 2013).

O uso de metil jasmonato resultou em um aumento significativo da biomassa em calos de *S. brasiliensis*, principalmente na menor concentração testada, conforme demonstrado na Tabela 6. Estes compostos estão envolvidos em muitos processos do ciclo de vida das plantas, estando relacionados à sua adaptação a condições de estresse ambiental (GUNDLACH et al., 1992). Dessa forma, o metil jasmonato vem sendo muito utilizado na cultura de tecidos vegetais, em estudos que visam ao acúmulo de biomassa e aumento da produção de metabólitos de interesse, como antocianinas em raízes de *Kalanchoe blossfeldiana*, furocumarinas em calos de *Conium maculatum*, triterpenos em calos de *Ocimum sp* (GÓRAJ-KONIARSKA et al., 2015; MEIER et al., 2015; PANDEY et al., 2015).

No presente trabalho, o uso do SNP promoveu um aumento de massa calogênica, quando comparado ao controle. Entretanto, foram observadas áreas de oxidação na parte inferior do calo, conforme mostrado na Figura 15. Na literatura relacionada ao tema, ainda são escassos os trabalhos que indicam o uso óxido nítrico como elicitor visando ao aumento de massa calogênica. Segundo Floryszak-Wieczorek e colaboradores (2006), a aplicação de doadores de óxido nítrico pode variar em tipos e concentrações, e dosagens muito altas podem levar à citotoxicidade celular. Dessa forma, pode-se sugerir que as doses de nitroprusiato de sódio, doador de óxido nítrico utilizado nesse trabalho, podem ter sido altas para calos de *S. brasiliensis*, ocasionando citotoxicidade das células em contato com o meio, resultando na formação de áreas de oxidação.

A partir dos experimentos visando à calogênese, calos friáveis cultivados em meio B5 suplementado com 5,0 mg.L⁻¹ de PIC + 0,5 mg.L⁻¹ de KIN, elicitados com 1 µM de metil jasmonato mantidos na ausência de luminosidade, foram utilizados como fontes de inóculo para o estabelecimento das CCS em *S. brasiliensis*.

A cultura de células em suspensão é uma das técnicas biotecnológicas mais eficientes para a produção de metabólitos *in vitro*, uma vez que representa um sistema homogêneo e com alta taxa de proliferação celular. Além disso, o uso de meio líquido possibilita a excreção dos metabólitos no meio de cultura, otimizando a obtenção de substâncias de interesse, sem a necessidade do uso direto das células, que leva à eliminação do material (IKEUCHI et al., 2013).

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, é possível afirmar que o protocolo estabelecido se mostrou adequado à obtenção da cultura de células em suspensão de *S. brasiliensis*. Inicialmente, avaliou-se a quantidade do inóculo considerado ideal para o início das CCS. Posteriormente, com base na curva de crescimento e viabilidade celular, definiu-se o valor de dois gramas de células como o mais adequado, onde as culturas iniciadas com essa quantidade apresentaram elevada taxa de proliferação. Segundo George e colaboradores (2008), a quantidade do inóculo vai depender do genótipo da planta, tornando-se necessária essa avaliação para que se possa definir a quantidade de células ideal para a espécie estudada.

Avaliando-se a curva de crescimento das CCS após 31 dias em cultura foi possível definir as quatro fases características do crescimento, a saber: lag, exponencial, estacionária e desaceleração. A fase lag corresponde ao período de adaptação ao meio, onde não ocorre divisão celular. Já as fases exponencial e estacionária correspondem, respectivamente, a uma intensa divisão celular, levando a um aumento de biomassa, e em seguida, uma estabilização no número de mitoses (TERMIGNONI, 2005). É nessa fase (estacionária), que normalmente ocorre a maior produção de metabólitos, o que vem sendo comprovado em trabalhos realizados com diferentes espécies (SIMÕES-GURGEL et al., 2011; LAGE et al. 2015).

Uma vez estabelecidos protocolos para a produção de substâncias de interesse, estas devem ser identificadas, visando ao uso dos sistemas *in vitro* para diferentes fins. Sabe-se que as plantas contêm diversos constituintes do metabolismo especial, que pertencem a diferentes classes, sendo relacionados a várias atividades biológicas (WINK, 2015). O conhecimento da composição química de uma espécie pode indicar

seu potencial medicinal e ser uma fonte para a descoberta de novas moléculas de interesse. Dessa forma, quando se tem o objetivo de avaliar as possíveis atividades medicinais de seus extratos e frações, a análise da composição química é de extrema importância.

Atualmente, uma das ferramentas analíticas mais usadas para a avaliação fitoquímica de extratos vegetais é Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que tem a capacidade de separar, identificar e quantificar diferentes substâncias presentes nas amostras, e por isso tem sido amplamente utilizada, tanto na área farmacêutica, como ambiental, forense, alimentícia e outras (RAO et al., 2015).

No presente estudo, os resultados obtidos nas análises por CLAE-DAD realizados com extratos e frações de folhas de *S. brasiliensis* cultivada *in vivo*, assim como suspensões celulares obtidas *in vitro*, sugerem que as substâncias bioativas majoritárias estão relacionadas à classe dos flavonoides, sendo que no extrato metanólico de folhas e nas frações acetato de etila e aquosa foram obtidos os maiores picos de absorção, conforme apresentados na Figura 32.

Os flavonoides são derivados fenólicos mais solúveis em solventes polares do que apolares (YUNES & CALIXTO, 2001). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram este fato, uma vez que os maiores picos de absorção foram encontrados em frações mais polares (metanólica, acetato de etila e aquosa).

Os flavonoides são sintetizados por duas rotas biossintéticas: a do ácido chiquímico e a do acetato (SANTOS, 2003). São normalmente encontrados em frutos, flores, raízes, chás, entre outros materiais (NIJVELDT al., 2001). Nos últimos anos, essa classe de substâncias chamou a atenção da comunidade científica por apresentar atividades biológicas, sendo relacionadas principalmente às propriedades antibacteriana, antioxidante e antineoplásica (KUMAR & PANDEY, 2013; BUSCH et al., 2015; LIU et al., 2015). Na área da oncologia, a atividade medicinal dos flavonoides tem sido relatada em diferentes linhagens tumorais como em células leucêmica, do colo-retal e pulmonar (ISODA et al., 2014; DU et al., 2015; GHALI et al., 2015).

Estudos realizados com *S. brasiliensis* vêm revelando seu potencial medicinal por meio das atividades antileishmanicida, antimalárica e antibacteriana (SÁ, 2010; MELLO, 2012; MELLO et al., 2014). No presente trabalho, foram avaliadas pela primeira vez as propriedades genotóxica, antigenotóxica e antineoplásica da espécie,

com base nos estudos citados anteriormente que demonstram a importância medicinal da espécie.

Os resultados obtidos na avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico em relação ao material cultivado *in vivo*, estão discutidos no artigo “Assessment of the genotoxic and antigenotoxic potential of crude extracts and fractions of *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedell ex Giraldo-Cañas”, em anexo (apêndice). Entretanto, de forma geral, os resultados revelaram que, quando os extratos foram incubados com DNA, não ocasionaram dano ao material genético, independentemente da concentração testada, indicando que os extratos não apresentam potencial genotóxico. Em relação ao potencial antigenotóxico, os resultados foram promissores, mostrando uma eficiente proteção à molécula de DNA, principalmente nas maiores concentrações testadas dos extratos metanólicos obtidos a partir de folhas e caules, frações aquosas de folhas e caules e do extrato metanólico de suspensões celulares, conforme mostrado nas Figuras 30 e 31.

O provável efeito antigenotóxico de extratos e frações de *S. brasiliensis* pode estar relacionado aos seus constituintes químicos. Estudos fitoquímicos com a espécie já tinham revelado a presença de flavonoides (MELLO et al., 2015), que são descritos como possíveis agentes protetores contra estresses oxidativos (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011; BRUNETTI et al., 2013; ROMANO et al., 2013). Além disso, no presente trabalho, as análises por CLAE realizadas mostram que as substâncias majoritárias encontradas nesses extratos e frações também pertencem à classe dos flavonoides, inclusive das suspensões celulares produzidas *in vitro*.

Dentre os muitos desafios da medicina, destacam-se os esforços no tratamento e cura do câncer, o que tem sido direcionado pesquisa de agentes mais eficazes, menos tóxicos e, principalmente, seletivos a células doentes. Assim, a descoberta de novos fármacos derivados de plantas possui um importante papel no tratamento da doença (LAKSHMI et al., 2015).

Na busca por novas substâncias com potencial medicinal, a análise da citotoxicidade é um dos primeiros ensaios que deve ser realizado, sendo consideradas citotóxicas aquelas capazes de causar a morte celular pela inibição das vias metabólicas, levando-se em conta que o número de células afetadas está relacionado à dose da substância capaz de matá-las.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis* cultivada *in vivo* possui alta citotoxicidade para células K562 (Tabela 8). As frações obtidas a partir desse extrato também mostraram-se citotóxicas através do ensaio do MTT, revelando uma dose-dependência, ou seja, quanto maior a dose, maior o percentual de células mortas. Os valores de IC₅₀ das frações ficaram entre 66,90±11,13 µg/mL (fração aquosa) e 32,94±6,49 µg/mL (fração acetato de etila), conforme apresentado na Tabela 9. De acordo com o Instituto Americano Nacional de Câncer, o limite de IC₅₀ considerado promissor para purificação deve ser inferior a 30 µg/mL, em avaliação realizada após 72 horas de incubação (ALSABRI et al., 2013). Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho, medidos após 24 horas de incubação, sugerem que a fração acetato de etila (IC₅₀ 32,94±6,49 µg/mL) apresenta potencial citotóxico e antineoplásico sobre células K562.

Adicionalmente à avaliação citotóxica dos extratos, foi realizada a análise morfológica das células, que é uma ferramenta importante e complementar nesse tipo de estudo, uma vez que os extratos podem ocasionar alterações morfológicas, principalmente na membrana celular, caracterizando determinado tipo de morte (OUYANG et al., 2012; WANG et al., 2015). Células K562 incubadas com extratos metanólicos obtidos a partir de cultivo *in vitro* não apresentaram alteração morfológica. Porém, nas amostras incubadas com 100 µg/mL das frações acetato de etila, diclorometano e hexano, obtidas a partir do extrato metanólico de folhas de *S. brasiliensis*, foi observado um aumento no tamanho das células K562 e rompimento da membrana, levando a lise celular, conforme mostrado nas Figuras 22 a 25.

A morte celular pode ocorrer principalmente de duas formas: por apoptose ou por necrose, que podem ser diferenciadas com base nas características morfológicas, bioquímicas e moleculares de cada processo. A apoptose é um evento programado, tendo como mudança morfológica característica a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática, que é um fosfolípídeo intramembranar, que, quando externalizado, indica que a célula sofreu apoptose. Paralelamente, a necrose é um processo desordenado, que ocorre em condições patológicas e se caracteriza pela perda de integridade da membrana plasmática levando a ruptura e extravasamento do conteúdo celular (OUYANG et al., 2012; CHAABANE et al., 2013; LEE et al., 2013). Dessa forma, distinguir o tipo de morte celular torna-se relevante, uma vez que

alguns compostos são capazes de induzir mais de um tipo de morte (WANG et al., 2015).

De acordo com Wu e colaboradores (2012), os resultados obtidos na análise da morfologia das células K562 tratadas com diferentes doses de extratos metanólicos de folhas, caules e raízes, assim como em frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas, indicam que a lise celular observada poderia ser devida à ocorrência de necrose. Portanto, as frações de *S. brasiliensis* foram investigadas quanto ao mecanismo de morte induzida. Após o tratamento das células com as frações de *S. brasiliensis*, foram utilizados os marcadores anexina V (proteína com propriedade de se ligar a fosfatidilserina) e iodeto de propídeo (PI - impermeável à membrana plasmática íntegra) que evidenciam, respectivamente, a morte celular por apoptose ou necrose. De maneira geral, os resultados mostraram que as frações induzem a morte celular por necrose. Esses resultados corroboram as análises morfológicas realizadas que evidenciaram a ruptura da membrana (lise celular) característica de morte por necrose. Porém, os percentuais obtidos foram muito altos (acima de 80%), uma vez que foram testados os valores referentes ao IC₅₀ e sua metade ($\frac{1}{2}$ IC₅₀).

Na literatura, tem sido relatada a interação de flavonoides com o sal MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio), ocasionando a redução deste, resultando na formação de formazan, produto de coloração púrpura oriundo da redução do sal, assim como ocorre nas células metabolicamente ativas (WANG et al., 2010). Dessa forma, ao realizar a leitura no espectrofotômetro, a absorvância pode ser tão alta quanto à de células vivas, levando a um resultado falso-positivo. Ou seja, no caso da avaliação da citotoxicidade e consequente obtenção do IC₅₀, caso a amostra testada possua flavonoides e induza à morte celular, o resultado não será obtido de forma correta, pois essas substâncias podem estar reagindo com o MTT. Bruggisser e colaboradores (2002) realizaram um experimento onde o flavonoide kaempferol, mesmo na ausência de células, levou à redução do sal e produção de formazan. Nesse contexto, considerando os valores de citotoxicidade (IC₅₀) e o percentual de morte celular obtidos neste trabalho, e considerando ainda a presença de flavonoides em extratos e frações de *S. brasiliensis*, sugere-se que essas substâncias possam ter influenciado nos resultados de viabilidade celular com o MTT, uma vez que a morte

celular obtida a partir do tratamento com doses de IC_{50} foram muito superior ao esperado (50%).

Uma vez estabelecida a citotoxicidade das frações, e caracterizado o mecanismo de morte celular induzido, foi realizada a avaliação do conteúdo e fragmentação do DNA. As etapas do ciclo celular são uma sequência de eventos que levam à duplicação do DNA e divisão celular (mitose). A sua regulação é um aspecto importante no desenvolvimento ou não do câncer, uma vez que a transição exata da fase G1 para a fase S é crucial no controle da proliferação celular eucariótica, cuja desregulação pode levar à proliferação descontrolada de células, resultando na oncogênese (BERTOLI et al., 2013). Além disso, sabe-se que determinadas substâncias possuem a capacidade de interferir nas fases do ciclo e por isso ele tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, uma vez que sua regulação é um fator determinante na ação de alguns agentes terapêuticos, principalmente os antineoplásicos (LAPENNA & GIORDANO, 2009).

Neste trabalho, apenas a dose referente ao IC_{50} da fração aquosa ocasionou um aumento no percentual da fragmentação do DNA que é característico de morte por apoptose. Esse resultado é importante, pois a morte por apoptose é um evento programado no qual as células, após receberem estímulos específicos, iniciam o processo de morte. Dessa forma, compostos que induzem esta via de morte podem se tornar possíveis agentes antineoplásicos (KOFF et al., 2015).

Em relação à alteração do ciclo celular, as frações acetato de etila e hexano induziram um leve aumento de células na fase S, sugerindo um possível bloqueio do ciclo, conforme mostrado na Tabela 12. Muitos fármacos de origem vegetal que são eficazes no tratamento do câncer possuem ação na regulação do ciclo celular e são conhecidos como ciclo-específicos, como por exemplo, a Podofilotoxina e o Paclitaxel, que tem mecanismo de ação baseado na interação com o DNA, induzindo a parada na fase G_2/M , dessa forma, a célula não consegue completar o ciclo e não se duplica (ALMEIDA et al., 2005). Assim, a indução da parada do ciclo tem sido considerada a maior causa de anti-proliferação (HSIAO et al., 2007). Nesse sentido, o resultado obtido, principalmente com a fração acetato de etila, é de extrema relevância, pois além de ser mais citotóxica, essa fração parece induzir um bloqueio do ciclo celular.

A análise em conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho indicam o estabelecimento da cultura de calos e suspensões celulares de *S. brasiliensis* como forma viabilizar a produção contínua e controlada de metabólitos de interesse, cujo potencial para as atividades antígeno-tóxica e antineoplásica foi verificada em extratos e frações da espécie cultivada *in vivo* e *in vitro*, realçando a importância de se de aprofundar os estudos relacionados ao potencial medicinal da espécie.

5 CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos para a cultura de tecidos, análises fitoquímicas e avaliações do potencial medicinal de *Schwartzia brasiliensis*, foi possível concluir que:

5.1 Cultura de tecidos vegetais

- Os protocolos de calogênese propostos mostraram-se eficientes para a indução e desenvolvimento de calos com produção satisfatória de biomassa;
- A combinação dos fitorreguladores KIN e PIC propiciou a mais alta taxa de produção de biomassa, com proliferação de calos friáveis a partir de explantes foliares e caulinares, enquanto a combinação dos fitorreguladores BAP e ANA propiciaram alta produção de calos compactos a partir de explantes foliares;
- Foi possível a produção de calos friáveis, que foram utilizados no estabelecimento das CCS a partir da combinação dos fitorreguladores KIN e PIC;
- O uso de metil jasmonato (1 μ M) foi definido como o melhor tratamento para a elicitação de calos, levando ao maior acúmulo de biomassa;
- O protocolo visando à cultura de células em suspensão mostrou-se eficiente para a produção de metabólitos de interesse;

5.2 Potencial medicinal e análise fitoquímica

- O potencial antígeno-tóxico contra quebra de DNA causada pelo cloreto estanofo foi verificado tanto no material obtido *in vivo* (extratos metanólicos e frações aquosas de folhas e caules), quanto no material *in vitro* (extrato metanólico das CCS);

- Tanto os materiais obtidos *in vivo* quanto *in vitro* avaliados não se mostraram genotóxicos ao DNA plasmidial;
- O extrato metanólico de folhas do material obtido *in vivo*, assim como suas frações, apresentaram maiores efeitos antineoplásicos frente à linhagem de célula neoplásica K562;
- As frações obtidas a partir do extrato metanólico de folhas obtidas *in vivo* induziram a morte celular por necrose;
- A fração aquosa ocasionou um aumento no percentual da fragmentação do DNA;
- As frações acetato de etila e hexano interferiram no ciclo celular, sugerindo um possível bloqueio;
- Os compostos majoritários presentes nos extratos e frações avaliados sugerem se tratar de flavonoides, segundo análise por CLAE-DAD.

PERSPECTIVAS

- Identificação dos flavonoides relacionados às atividades encontradas;
- Avaliação dos extratos e frações em outros modelos de indicação do potencial antineoplásico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A.D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International Journal of Pharmaceutical Science and Nanotechnology**, v.4, n. 2, p.1394-1398, 2011.
- AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities.I. Atlantic rain forest. Ecological Station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2004.
- AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 154, p.51-56, 2016.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALSABRI, S.G.; EL-BASIR, H.M.; RMELI, N.B.; MOHAMED, S.N.; ALLAFI, A.A.; ZETRINI, A.A.; SALEM, A.A.; MOHAMED, S.S.; GBAJ, A.; EL-BASEIR, M.M. Phytochemical screening, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities study of *Arbutus pavarii* plant. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p.32-36, 2013.
- AMARAL, J.B. & MACHADO-SANTELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1-20, 2011.
- ANZUINI, F.; BATTISTELLA, A.; IZZOTTI, A. Physical activity and cancer prevention: a review of current evidence and biological mechanisms. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 52, p. 174-180, 2011.
- APTSIAURI, N.; CABRERA, T.; MENDEZ, R.; GARCIA-LOR, A.; RUIZ-CABELO, F.; GARRIDO, F. Role of altered expression. of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 601, p. 123-131, 2007.
- AVANCI, N.C.; LUCHE D.D.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 484-505, 2010.
- BALUSAMY, S.R.D.; RAHIMI, S.; SUKWEENADHI, J.; KIM, Y.; YANG, D. Exogenous methyl jasmonate prevents necrosis caused by mechanical wounding and increases terpenoid biosynthesis in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 341-348, 2015.

- BAQUE, M.A.; HAHN, E.; PAEK, K. Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, p. 109-116, 2010.
- BARREIRO, E.J. & BOLZANI, V.S.; Biodiversidade: fonte para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARROS, A.A.M. Vegetação vascular litorânea da Lagoa de Jacarepiá, Saquarema, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n.1, p. 97-110, 2009.
- BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J.M.; BRUIN, R.A.M.. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 518-528, 2013.
- BOUCLE, S.; MELIN, C.; MARC CLASTRE, M.; GUILLARD, J. Design, Synthesis and Evaluation of New Marine Alkaloid-Derived Pentacyclic Structures with Anti-Tumoral Potency. **Marine Drugs**, v. 13, p. 655-665, 2015.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. **Diário Oficial da União**, 2004.
- BRUGGISSER, R.; VON-DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, n. 68, v. 5, p. 445-448, 2002.
- BRUNETTI C.; FERDINANDO, M.D.; FINI, A.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. **Int. J. Mol. Science**, v. 14, p. 3540-3555, 2013.
- BUSCH, C.; BURKARD, M.; LEISCHNER, C.; LAUER, U.M.; FRANK, J.; VENTURELLI, S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 64, p.1-18, 2015.
- BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.
- CAI, Z.; JING, X.; TIAN, X.; JIANG, J.; LIU, F.; WANG, X. Direct and indirect *in vitro* plant regeneration and the effect of brassinolide on callus differentiation of *Populus euphratica* Oliv. **South African Journal of Botany**, v. 97, p. 143-148, 2015.
- CAMPOS, D.B. Métodos de propagação *in vivo* e *in vitro* de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). 2003. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2003.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A., DANTAS, F.J.S., MORAES, M.O., FELZENSZWALB, I., BERNARDO-FILHO, M. Stannous chloride participates in the generation of reactive oxygen species. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 48, p. 109-113, 1996.

CHAABANE, W.; USER, S.D.; EL-GAZZAH, M.; JAKSIK, R.; SAJJADI, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; ŁOS, M.J. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, p.43-58, 2013.

CHANG, C.; CHEN, W.; HO, T.; WU, H.; WEI, Y. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 501-511, 2012.

COGGON, D.; NTANI, G.; HARRIS, C.; PALMER, K. Risk of cancer in workers exposed to styrene at eight British companies making glass-reinforced plastics. **Occupational Environmental Medicine**, v. 72, p.165-170, 2015.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S. V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.A. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CREELMAN, R.A. & MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 92, p. 4114-4119, 1995.

CYBULARZ-URBAN, T.; HANUS-FAJERSKA, E.; BACH, A. Callus induction and organogenesis *in vitro* of cattleya from protocorm-like bodies (plbs) under different light conditions. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 14, n. 6, p. 29-38, 2015.

DA ROCHA, A. S.; ROCHA, E. K.; ALVES, L. M.; AMARAL, B.M.; CARVALHO, T.C.; ALBARELLO, N.; SIMÕES-GURGEL, C. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, p. 105-113, 2015.

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

- DONG, Y.; ZHAO, H.; LI, H.; LI, X.; YANG, S. DNA methylation as an early diagnostic marker of cancer (Review). **Biomedical reports**, v. 2, p. 326-330, 2014.
- DRESSLER, S. Marcgraviaceae. In: N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W. Stevenson & S.V. Heald (eds), **Flowering Plants of the Neotropics**, p. 236-238, 2004.
- DU, W.; YANG, X.; SONG, Z.; WANG, J.; ZHANG, W.; HE, X.; ZHANG, R.; ZHANG, C.; LI, F.; YU, C.; WANG, C.; YUAN, C. Antitumor activity of total flavonoids from *Daphne genkwa* in colorectal cancer. **Phytotherapy Research**, v.1, p.1-8, 2015.
- DÜSMAN, E.; BERTI, A.P.; SOARES, L.C., VICENTINI, V.E.P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p.66-81, 2012.
- EL-BELTAGI, H.S.; AHMED, O.K.; HEGAZY, A.E. Molecular role of nitric oxide in secondary products production in *Ginkgo biloba* cell suspension culture. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n. 1, p. 12-18, 2015.
- ESTRADA-ZÚÑIGA, M.E.; CRUZ-SOSA, F.; RODRIGUEZ-MONROY, M.; VERDE-CALVO, J.R.; VERNON-CARTER, E.J. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.97, p. 39-47, 2009.
- FERREIRA, G. Anatomia foliar de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). **Arquivos do Jardim Botânico**, v. 26, p. 87-94, 1982.
- FERREIRA, G. Estudo taxonômico das espécies brasileiras do gênero *Norantea* Aublet (Marcgraviaceae). **Arquivos do Jardim Botânico**, v. 33, p. 9-53, 1995.
- FERREYRA, M.L.F.; SEBASTIÁN P. RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant science**, v.3, p. 1-15, 2012.
- FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v.224, p. 1363-372, 2006.
- FORBES, A.M.; LIN, H.; MEADOWS, G.G.; MEIER, G.P. Synthesis and anticancer activity of new flavonoid analogs and inconsistencies in assays related to proliferation and viability measurements. **International Journal Of Oncology**, v. 45, p. 831-842, 2014.
- FRESHNEY, I.R. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 3rd edition. New York, Wiley-Liss, 1994.
- FU, C.X.; ZHAO, D.X.; HUANG, Y.; MA, F.S. Cellular aggregate size as the critical factor for flavonoid production by suspension cultures of *Saussurea medusa*. **Biotechnology Letters**, v. 27: p. 91-95, 2005.

- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p.151-158, 1968.
- GANDHI, S.G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, p.303-317, 2015.
- GAO, X.; YANG, D.; CAO, D.; AO, M.; SUI, X.; WANG, Q.; KIMATU, J.N.; WANGJ, L. *In vitro* micropropagation of freesia hybrida and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 257-267, 2010.
- GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE CLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3rd edition. Vol. 1. The background. Springer, The Netherlands, 2008.
- GHALI, W.; VAUDRY, D.; JOUENNE, T.; MARZOUKI, M.N. *Lycium europaeum* fruit extract: antiproliferative activity on a549 human lung carcinoma cells and PC12 rat adrenal medulla cancer cells and assessment of its cytotoxicity on cerebellum granule cells. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 4, p. 637-646, 2015.
- GIRALDO-CAÑAS, D. Las Marcgraviaceae de la Amazonia colombiana: estudio reliminar sobre su diversidad, distribución y fitogeografía. **Darwiniana**, v. 37, p. 15-24, 1999.
- GIRALDO-CAÑAS, D. Una nueva especie de *Marcgravia*, grupo *Galeatae* (Marcgraviaceae) de la Cordillera Oriental y catálogo del género para Colombia. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 26, p. 367-371, 2002.
- GIRALDO-CAÑAS, D. Las especies del género *Schwartzia* (complejo *Norantea*, Marcgraviaceae) en Brasil. **Darwiniana**, v.42, p. 169-175, 2004.
- 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.
- GÓRAJ-KONIARSKA, J.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; MOŁDOCH, J.; SANIEWSKI, M. Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.57, n.1, p. 141-148, 2015.
- GOTTLIEB, O. R. & BORIN, M. R. M. B. Químico-Biologia Quantitativa: um novo paradigma?. **Química Nova**, v.35, n.11, p. 2105-2114, 2012.
- GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**, Brasília: Editora UNB, 2005.
- GUCHELAAR, H. J.; TEN NAPEL, C. H. H.; DE VRIES, E. G. E.; MULDER, N. H. Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review. **Clinical Oncology**, v. 6, n. 1, p. 40-48, 1994.

GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia**. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 41p. 2006.

GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A**, v. 89, p. 2389-2393, 1992.

HSIAO, Y.C.; HSIEH, Y.S.; KUO, W.H.; CHIOU, H.K.; YANG, S.F.; CHIANG, W.L.; CHU, S.C. The tumor-growth inhibitory activity of flavanone and 2-OH flavanone *in vitro* and *in vivo* through induction of cell cycle arrest and suppression of cyclins and CDKs. **Journal of Biomedical Science**, v. 14, p. 107-119, 2007.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

INCA. 2013. Disponível em:< <http://www2.inca.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2015

ISODA, H.; MOTOJIMA, H.; ONAGA, S.; SAMET, I.; VILLAREAL, M.O.; HAN, J. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, p. 269-277, 2014.

JARDIM, L.S.; SAMPAIO, P.T.B.; COSTA, S.S.; GONÇALVES, C.Q.; BRANDAO, H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta amazônica**, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

JEANDET, P.; CLÉMENT, C.; COUROT, E. Resveratrol production at large scale using plant cell suspensions. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, p. 622-632, 2014.

JEBELLI, B.; GHAZI, I.; MAHAMOODZADEH, A.; GHAZANCHAE, E. Silica exposure in the glass industry and human health risk assessment. **International Journal of Health System and Disaster Management**, v.3, p. 151-155, 2015.

KALRA, C. & BABBAR, S.S. Nitric oxide promotes *in vitro* organogenesis in *Linum usitatissimum* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 103, p. 353-359, 2010.

KAMRUZZAMAN, M.; AKTHER, A.; FARUQ, M.O.; PERVIN, A.; MYTI, S.; PRODHAN, S.H. Establishment of an efficient callus induction method from leaf and stem in kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) and citron (*Citrus medica* L.). **African Journal of Biotechnology**.v. 14, n.15, p. 1290-1296, 2015.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009.

KLEPPER, L.A. Inhibition of nitrite reduction by photosynthetic inhibitors. **Weed Science**, v. 23, p. 188-190, 1975.

KLEPPER, L.A. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. **Atmospheric Environment**, v. 13, p. 537-542, 1979.

KOFF, J.L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 2942-2955, 2015.

KOPYRA, M. & GWÓZDZ, E.A. The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 26, n. 4, p. 459-472, 2004.

KUMAR, S. & PANDEY, A.P. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-16, 2013.

KUMLAY, A.M. & ERCISLI, S. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 1075-1084, 2015.

KUMMROW, R. Marcgraviáceas do Estado do Paraná. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, v.31, p.1-7, 1977.

LAGE, D. A.; TIRADO, M.S.; VANICORE, S. R.; SABINO, K. C. COSTA; ALBARELLO, N. Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 341-350, 2015.

LAKSHMI, P.M.; BHANU, P.K.; VENKATA, S. K.; JOSTHNA, P. Herbal and Medicinal Plants Molecules Towards Treatment of Cancer: A Mini Review. **American Journal of Ethnomedicine**, v. 2, n. 2. p. 136-142, 2015.

LAPENNA, S. & GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 547-566, 2009.

LEE, E.J.; PARK, S.Y.; PAEK, K.Y. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n.1, p. 1-10, 2015.

LEE, S.H.; MENG, X.W.; FLATTEN, K.S.; LOEGERING, D.A.; KAUFMANN, S.H. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, p. 64-76, 2013.

LI, M.; PEEBLES, C.A.M.; SHANKS, J.V.; SAN, K. Effect of sodium nitroprusside on growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 625-630, 2011.

LIU, C.M.; YEH, H.C.; HUANG, S.C.; LI, C.T.; CHEN, C.Y. The antioxidation and antiproliferation activity of new flavonoids from the leaves and stems of *Cinnamomum reticulatum*. **Medicinal chemistry**, v.5, p. 064-066, 2015.

- LOYOLA-VARGAS, V.M. & VÁZQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. Methods in molecular biology. Second Edition. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2006.
- LU, D.; DONG, J.; JIN, H.; SUN, L.; XU, X.; ZHOU, T.; ZHU, Y.; XU, M. Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is essential for gungal elicitor-induced camptothecin accumulation of *Camptotheca acuminata* suspension cell cultures. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.90, p. 1073-1081, 2011.
- LU, H.; WANG, X.; MAO, W. Targeted therapies in small cell lung cancer (Review). **Oncology letters**, v. 5, p. 3-11, 2013.
- LURIA, S.E & BURROUS, J.W. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. **Journal of Bacteriology**, v. 74, n. 4, p. 461-476, 1957.
- MACBRIDE, J. Marcgraviaceae, Flora of Peru. **Publications of the Field Museum of Natural History Botanical series**, v. 13, p. 703-717, 1956.
- MAGALHAES, E. A. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.1, p. 65-69, 2010.
- MALZYNER, A. & CAPONERO R. **Câncer e prevenção**. 1 ed. São Paulo. MG Editores, 2013.
- MARQUES, R.C.; MEDEIROS, S.R.B.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGNES-LIMA, L.F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the ames test. **Mutation Research**, v. 536, p.117-120, 2003.
- MEDEIROS, J.D. A Biotecnologia e a extinção de espécies. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed. 30, p. 109-113, 2003.
- MEIER, P.; HOTTI, H.; RISCHER, H. Elicitation of furanocoumarins in poison hemlock (*Conium maculatum* L.) cell culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 3, p. 443-453, 2015.
- MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 11-14, 2011.
- MELLO, G.S. **Avaliação do potencial antimalárico de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae) cultivada *in vitro* e *in vivo***. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.
- MELLO, G.S.; IGNACIO A.C.P.R.; ALBARELLO, N. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedell ex Giraldo-Cañas cultivada *in vivo* e *in vitro***. Novas Edições Acadêmicas, OmniScriptum GmbH & Co. Saarbrücken, Deutschland/Alemanha, 2014.

MELLO, G. S.; MATTOS, J. C.; AMARAL, A. C.; AMORIM, L.; ARAUJO, A.C.; ALBARELLO, N. Assesment of the genotoxic and antigenotoxic potential of crude extracts and fractions of *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedel ex Giraldo-Cañas. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 9, p. 223-230, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plantas de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1>. Acesso em: 23 dez. 2013.

MOAN, J.; GRIGALAVICIUS, M.; BATURAITE, Z.; DAHLBACK, A.; JUZENIENE, A. The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 31, p. 26-35, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 69-78, 2007.

NANDAGOPAL, S. & KUMARI, B. D.R. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2007.

NHUT, D.T.; HUY, N.P.; TAI, N.T.; NAM, N.B.; LUAN, V.Q.; HIEN, V.T.; TUNG, H.T.; VINH, B.T.; LUAN, T.C. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 299-308, 2015.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p. 418-425, 2001.

OLIVEIRA, M.B.; JUNIOR, M.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; PETROFEZA, S. Exogenous application of methyl jasmonate induces a defense response and resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 182, p. 13-22, 2015.

OMS. 2013. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/manual_oncologia_15_edicao_06_09_2013.pdf. Acesso em: 14 jan. 2014.

OSUNA, L.; TAPIA, N.; CUSIDÓ, R.; PALAZÓN, J.; BONFILL, M.; ZAMILPA, A.; LÓPEZ-UPTON, J.; CRUZ-SOSA, F. Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.37, n. 199, p.1-8, 2015.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, p. 487-498, 2012.

PAN, Q.; MUSTAFA, N.R.; TANG, K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. **Phytochemistry Reviews**, n. 1, p. 1-30, 2015.

PALAVAN-UNSAL, N. & ARISAN, D. Nitric Oxide signalling in plants. **The botanical review**, v. 75, p. 203-229, 2009.

PANDEY, H.; PANDEY, P.; SINGH, S.; GUPTA, R.; BANERJEE, S. Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. **Protoplasma**, v. 252, n. 2, p. 647-655, 2015.

PARALE, A.; BARMUKH, R.; NIKAM, T. Influence of organic supplements on production of shoot and callus biomass and accumulation of bacoside in *Bacopa monniera* (L.) Pennell. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 16, n. 2, p. 167-175, 2010.

PATEL, H. & KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in Plant Tissue Culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.2, n.2, p. 60-65, 2013.

PEREIRA, R.J & CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PICCA, P. & GIRALDO-CAÑAS, D. Una nueva especie de *Marcgravia* (Marcgraviaceae) dela Amazonia colombiana. **Hickenia**, v. 2, p. 293-298, 1999.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

PUNT, W. Pollen morphology of the genera *Norantea*, *Souroubea*, and *Ruyschia* (Marcgraviaceae). **Pollen & Spores**, v. 13, p. 199-232, 1971.

QAZZAZ, M.E.; RAJA, V.J.; LIM, K.; KAM, T.; LEE, J.B.; GERSHKOVICH, P.; BRADSHAW, T.D. *In vitro* anticancer properties and biological evaluation of novel natural alkaloid jerantinine B. **Cancer Letters**, v.370, n. 2, p. 185-197, 2016.

RAMACHANDRA RAO, S., RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-153, 2002.

RAMAKRISHNA, A. & RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress singles on secondary metabolites in plants. **Plant Sign Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.

RAO, B.V.; SOWJANYA, G.N.; AJITHA, A. A review on stability indicating hplc method development. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 08, p. 405-423, 2015.

RIBEIRO, I. G.; GAYER, C. R. M.; CASTRO, T. C.; 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.

ROCCA, M.A.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Um pica-pau que aprecia bebidas doces: o João-velho procura néctar e poliniza plantas do dossel no Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 6, p. 1-9, 2006.

ROCCA, M.A.; SAZIMA, M. Ornithophilous canopy species in the Atlantic rain forest of southeastern Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v. 79, n 8, p. 130-137, 2008.

ROCHA, M.E.N. **Potencialidades Biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular). Instituto Oswaldo Cruz, 2002.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDAB, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROMANO, B.; PAGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A.L.; MILIC, N.; BORELLI, F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1588-1596, 2013.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5rd ed. Da UFSC, 2003. p.123-146.

SANTOS, M. A. C. & ELISABETSKY, E. Ethnopharmacology as a tool for the selection of medicinal plants for screening antitumour activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n.1, p. 7-17, 1999.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5^a ed., Da UFSC, 2004.

SÁ, A. F. **Conservação *ex situ* e avaliação do potencial medicinal de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SÁ, A. F.; CASTRO, T. C.; SIMÕES, C.; CASTRO, C. R. N.; ALBARELLO, N. Avaliação do potencial para a produção de brotos de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae) a partir de plantas germinadas e propagadas *in vitro*. In: 30. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Goiânia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v. 13, p. 464-468, 2007.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. **Mutation Research**, v. 544, p. 99-106, 2003.

SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE. Espécies ameaçadas de extinção no município do estado do Rio de Janeiro: Flora e Fauna, p. 65, 2000.

SHAH, U.; SHAH, R.; ACHARVA, S.; ACHAR, N. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1. P. 16-23, 2013.

SINAVESAN, I. & JEONG, B.R. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.20, p. 5294- 5300, 2009.

SINGH, B. & SHARMA, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **Biotech**, v. 5, p. 129-151, 2015.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. 2008. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab02_brasil_2008.pdf> - Acesso em: 27 dez. 2013.

SIMÕES C.; BIZARRI, C.H.B.; CASTRO, T.C.; COUTADA, L.C.M.; SILVA, A.J.R.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ ESIMS. **Plant Physiology Biochemistry**, v.47, p.895-903, 2009.

SIMÕES-GURGEL C.; CORDEIRO, L.S.; CASTRO, T.C.; CALLADO, C.H.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC (Capparaceae). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.106, p.537-545, 2011.

SIVANANDHAN, G.; RAJESH, M.; ARUN, M.; JEYARAJ, M.; DEV, G.K.; ARJUNAN, A.; MANICKAVASAGAM, M.; MUTHUSELVAM, M.; SELVARAJ, N.; GANAPATHI, A. Effect of culture conditions, cytokinins, methyl jasmonate and salicylic acid on the biomass accumulation and production of withanolides in multiple shoot culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using liquid culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n.3, p 715-728, 2013.

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

SOUZA, V.C. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000158>> - Acesso em 11 dez. 2013

STANGE, V. S.; GOMES, T. D. U. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), *Cecropiaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2b. p. 637-642, 2008.

- SZYSZYLOWICZ, I. Marcgraviaceae, in A. ENGLER & K. PRANTL, **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, v.3, n. 6, p. 157-164, 1893.
- SWIFT, L.H. & GOLSTEYN, R.M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3403-3431, 2014.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 5rd edition, Ed.Artmed, 2013.
- TELFORD, W.G.; KING, L.E.; FRAKER, P.J. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. **Cytometry**, v. 12, p. 137-143, 1992.
- TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais**, 1ed., editora: UFRGS, 2005.
- TRIANA, J. & PLANCHON, J. Prodrum florae novogranatensis: Ternstroemiaceae trib. Marcgraviaeae. **Annales des Sciences Naturelles Botanique**, v. 4, n. 17. p. 359-379, 1862.
- VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.
- VARSHNEY, A.; SANGAPILLAI, R.; PATIL, M.S.; JOHNSON, T.S. Histological evidence of morphogenesis from various explants of *Jatropha curcas* L. **Trees**, v. 25, p. 689-694, 2011.
- VICENTE, A.M. & DA COSTA, M.C. Experimentação animal e seus limites: core set e participação pública. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 831-849, 2014.
- VISVADER, J.E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 1469, p. 314-322, 2011.
- WANG, H.; LIU, Z.; GOU, Y.; QIN, Y.; XU, Y.; LIU, J.; WU, J. Apoptosis and necrosis induced by novel realgar quantum dots in human endometrial cancer cells via endoplasmic reticulum stress signaling pathway. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5505-5512, 2015.
- WANG, P.; HENNING, S.M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-Based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PlosOne**, v.5, n. 4, p. 1-10, 2010.
- WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v.288, n. 2, p. 369-376, 2005.
- WILSON, S.A.; CUMMINGS, E.M.; ROBERTS, S.C. Multi-scale engineering of plant cell cultures for promotion of specialized metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, p.163-170, 2014.
- WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, p. 251-286, 2015.

WU, W.; LIU, P.; LI, J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 82, n. 3, p. 249-258, 2012.

YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo: fitoterápicos e fitofármacos: biotecnologia: patente**, 1ed, Editora: Argos Editora Universitaria, 2001.

ZAMITH, L.R. & SCARANO, F.R. Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.161-176, 2004.

ZHAO, J.; ZHU, W.; HU, Q.; GUO, Y. Compact callus cluster suspension cultures of *Catharanthus roseus* with enhanced indole alkaloid biosynthesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 1, p. 68-72, 2001.

APÊNDICE – Artigo publicado no periódico Journal of Medicinal Plant Research

Full Length Research Paper

Assessment of the genotoxic and antigenotoxic potential of crude extracts and fractions of *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedell ex Giraldo-Cañas

Mello G. S.¹, De Mattos J. C. P.², Amaral A. C. F.³, Amorim L. M. F.⁴, Caldeira-de-Araujo A.² and Albarello N.^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rua São Francisco Xavier, n. 524, sala 509, 20.550-013, Rio de Janeiro, Brasil.

²Laboratório de Radio e Fotobiologia, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Avenida 28 de setembro, n. 87, 4º. Andar, 20551-030, Rio de Janeiro, Brasil.

³Laboratório de Produtos Naturais 1, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Far-Manguinhos/FIOCRUZ, Rua Sizenando Nabuco, n. 100, 21041-250, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴Laboratório de Oncologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Outeiro de São João Batista s/n., 24020-150, Niterói, Brasil.

Received 15 December, 2014; Accepted 12 February, 2015

Schwartzia brasiliensis (Marcgraviaceae) is a native Brazilian shrub species with neotropical distribution in shoal environments. Recent studies have revealed its medicinal potential for some human diseases; therefore, this study aimed to evaluate the genotoxic and antigenotoxic potential of extracts and fractions obtained from different organs of *S. brasiliensis*. To accomplish this, plant extracts at different concentrations (25, 125 and 250 µg/ml) were incubated with plasmid DNA, either alone, or in the presence of stannous chloride as a positive control. Samples were then examined to detect any plasmid strand breaks or the absence of such breaks, which would indicate protection of these molecules against stannous chloride-induced lesions. Methanol and aqueous extracts of leaves and stems showed the ability to withstand the effects of stannous chloride in that no DNA damage was observed. Moreover, no other extracts or fractions used in the experimental conditions assayed resulted in DNA damage. These findings suggest that *S. brasiliensis* has antigenotoxic properties, indicating, in turn, that its biological activities deserve further study given the medicinal relevance of this plant.

Key words: Medicinal plant, Marcgraviaceae, stannous chloride, flavonoids.

INTRODUCTION

Medicinal plants and their derivatives have been used as important sources of biologically active substances

(Newman and Craag, 2012) that are known to promote health, treat illness, and cure, or prevent many diseases

(Efferth and Grefen, 2014; Gurib-Fakim, 2006; Jachak and Saklani, 2007). Such phytomedicines are usually alternative or complementary options to treatments with synthetic drugs (Dragan et al., 2015; Olasehinde et al., 2014). However, even though considered therapeutic, some bioactive plant derivatives may have toxic properties that will cause damage to the human organism, including the induction of genetic damage (Bednarczuk et al., 2010; Düsman et al., 2012; Efferth and Grefen, 2012).

Schwartzia brasiliensis belongs to the Marcgraviaceae family, and it is found in shoal environments of the Brazilian Atlantic Forest. This is a shrub species whose flowering takes place in summer (Ferreira, 1995; Zamith and Scarano, 2004) and whose conspicuous inflorescences might be used for ornamental purposes. *S. brasiliensis* also presents nectaries to attract bird pollinators (Rocca et al., 2006; Rocca and Sazima, 2008). Initially, the species was included in the *Norantea* genus (Giraldo-Cañas, 2004), but it now belongs to the *Schwartzia* genus. Pharmacological studies with some species of the Marcgraviaceae family indicate antifungal (Jones et al., 2000) and anxiolytic activities (Mullally et al., 2011). Studies investigating the medicinal potential of *S. brasiliensis* also reported antibacterial activities (Mello et al., 2014), and Agripino et al. (2004) showed that ethanol extracts of stems of *S. brasiliensis* could protect against DNA damage. In folk medicine, *S. brasiliensis* tea is used to prevent heart disease (Agra, 2008), but no scientific studies have shown either efficacy or safety. In this context, the present work aims to evaluate the genotoxic and antigenotoxic potential of crude extract and different fractions of *S. brasiliensis* grown in a natural environment.

MATERIALS AND METHODS

Plant

The plants were collected in the morning, around 10:00 a.m., in March, 2012, on a preserved sandbank area, located in Barra da Tijuca, Rio de Janeiro City, 22° 59' 29.7" S to 43° 20' 48.4" W, Rio de Janeiro State, Brazil. The material was collected in vegetative stage under license from SISBIO/IBAMA number 3299651. A voucher (HRJ 11749) has been deposited in the Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ).

Preparation and fractionation of the extracts

Leaf, stem and root samples of *S. brasiliensis* were fragmented, dried at 40°C for 24 h, and added to methanol (MeOH) for 15 days

at environmental conditions. The extracts obtained were filtered using Whatman paper n° 1, evaporated at 40°C and concentrated in vacuum. Then, approximately 3 g of each crude extract were subjected to fractionation with different polarities of chemical solvents (n-hexane, ethyl acetate and distilled water). The fractions were evaporated at 40°C and concentrated in vacuum. Immediately before the use, both the crude methanol extracts and the fractions were solubilized and diluted in ultrapure water until reaching the concentrations required to carry out the experiments.

Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential through agarose gel electrophoresis assay with plasmid DNA

Genotoxic and antigenotoxic potentials of *S. brasiliensis* were evaluated according to Caldeira-de-Araujo et al. (1996). This assay is based on the ability of the reducing agent stannous chloride (SnCl₂) to induce DNA strand breaks. During agarose gel electrophoresis, SnCl₂-induced lesions can cause plasmid DNA conformational changes, leading to modification in migration pattern. Gel electrophoresis was performed in order to separate different conformations of plasmid DNA: native conformation (supercoiled or form I); open circle (or form II), resulting from single-strand DNA breaks; and linear (or form III) generated through double-strand breaks.

The plasmid DNA used in this investigation was pUC 9.1, as maintained in DH5αF'IQ *E. coli* cells. The plasmidial molecules were purified from DH5αF'IQ *E. coli* cultures, in stationary growth phase, according to the Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitex) protocol. In order to evaluate genotoxic and antigenotoxic potential, three different concentrations (25, 125 and 250 µg/ml) of each extract and fraction were incubated with 200 ng of plasmid DNA in the presence, or not, of SnCl₂ (200 µg/ml). All dilutions were done in ultrapure water (Milli-Q system, EMD Millipore, Billerica, MA, USA), and the reaction mixtures were incubated for 40 min at room temperature. Then, aliquots of each sample (10 µl) were mixed with 2 µl of loading buffer (0.25% xylene cyanol; 0.25% bromophenol blue; 30% glycerol in water), applied on agarose gel (0.8%) in TAE 1X buffer and submitted to electrophoresis at 7 V/cm for 30 min. Afterwards, the gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml), and the DNA bands were visualized by fluorescence in an ultraviolet transilluminator system (UVP, LLC, Upland, CA, USA). Each experiment was repeated three times, and the best result was selected for presentation. The gel bands were then digitized, and the results obtained provide a qualitative analysis. A quantitative evaluation in Plasmid DNA conformational structure was also performed by using NIH ImageJ software.

Statistical analysis of DNA strand breaks

The data presented in Figure 1 were analyzed through densitometer scanning, and percentage of form I was used to obtain the average number of breaks per pUC 9.1 plasmid DNA molecule. According to Remington and Schor (1985), the Poisson distribution could be used to obtain the average number of breaks from the percentage of DNA supercoiled forms, as $\mu = -\ln p(0; \mu)$, Considering no breaks = $p(0; \mu)$.

*Corresponding author. E-mail: labplan_uerj@yahoo.com.br. Tel: +55 21 23340293.

Analysis by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC/DAD)

The analysis by HPLC/DAD was performed under the following conditions: Mode: isocratic ACN/aqueous 0.05% TFA (30:70) for 55 min and flow 0.5 ml/min in Shim-pack XR-ODS column (100 mm × 2.0 mm, 2.2 μm, Shimadzu). All injections were performed with a volume of 20 μl loop. Detection was performed in the ultraviolet wavelengths of 254 and 325 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, electrophoresis assay with plasmid DNA was used in order to evaluate both genotoxic and antigenotoxic properties of *S. brasiliensis*. Based on its genotoxic oxidative properties, which result in DNA strand breaks, stannous chloride (SnCl₂) was used as a positive control in this study. Thus, the incubation of *S. brasiliensis* extracts or fractions with plasmid DNA alone, or in combination with SnCl₂, could provide the basis for determining genotoxic vs. antigenotoxic activity. In particular, alterations in plasmid DNA pattern migration through agarose gel in samples incubated with plant extracts or fractions could reflect the potential to promote DNA strand breaks. Conversely, the ability of samples to prevent damage to plasmid DNA caused by SnCl₂ could also reflect the antigenotoxic potential of *S. brasiliensis*. This gel electrophoresis assay is fully described in De Mattos et al. (2004), and the assay has been applied elsewhere to other medicinal species (Simões et al., 2006; Biso et al., 2010; Hamedt et al., 2014). Moreover, since SnCl₂ can induce reactive oxygen species, especially hydroxyl radicals (Caldeira-de-Araujo et al., 1996), the antioxidant properties of *S. brasiliensis* extracts or fractions could prevent DNA damage. However, a full assessment of this property is outside the scope of this paper.

Methanol extract of leaves was able to fully protect DNA against stannous chloride-induced damage, but only when tested at the concentration of 250 μg/ml (Figure 1A), as indicated in the control sample (form 1, lane 1) at 88.6% vs. 10.3% in lane 2 (pUC 9.1 plus SnCl₂), and 85.4% when methanol extract of leaves was added (Figure 1A, lane 8).

Aqueous fraction of leaves also seems to possess an antigenotoxic effect because it was also able to reduce the level of DNA breaks induced by stannous chloride (Figure 1B; lanes 6, 7 and 8). Lane 7 presents 28.23% of plasmid molecules in form I (control native conformation), whereas lane 2 in the same figure shows only 18.78%, supporting the antigenotoxic action of *S. brasiliensis* leaves in aqueous fraction. Both sets of results are based on assessment of the average number of breaks per genome (Figure 2A and B). The chromatograms obtained by High-performance liquid chromatography with

photodiode array detection (HPLC/DAD) revealed that methanol extracts have the majority of signals with retention time values equal to 8.659 and 9.452 min (Figure 3A). Aqueous fraction showed a majority of signals with retention time equal to 8.710 and 9.570 (Figure 3B), being related to the chemical class of flavonoids. Phytochemical analysis of leaves of *S. brasiliensis*, according to Barbosa et al. (2004) showed the presence of phenolic compounds, mainly flavonoids (Mello et al., 2012).

The antigenotoxic effect of *S. brasiliensis* leaves may be related to their chemical constituents. Flavonoids are described as having antioxidant (Brunetti et al., 2013; Procházková et al., 2011; Romano et al., 2013) and antigenotoxic activities (Boubaker et al., 2013; Chaabane et al., 2012). In addition, flavonoids have antineoplastic effects and can also protect against cardiovascular and neurodegenerative diseases (Obrenovich et al., 2010; Obrenovich et al., 2011; Simões et al., 2006).

The methanol extract and aqueous fraction of stems of *S. brasiliensis* also revealed antigenotoxic potential (Figure 1E and F, lane 8), as confirmed by evaluation of the average number of breaks per genome (Figure 2E and F, lane 8). These data corroborate a previous study showing that the ethanol extract of stems is able to reduce DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* (Agrisino et al., 2004).

In the present report, it was observed that the methanol extract and aqueous fraction of stems decreased DNA damage caused by SnCl₂, suggesting a dose-dependent effect (Figure 1E and F). This protective effect has already been observed elsewhere, using the same experimental approach, with extracts of *Cleome rosea* (Simões et al., 2006), *Daphne gnidium* (Chaabane et al., 2012) and *Nitraria retusa* (Boubaker et al., 2013). The chromatograms obtained from the methanol extract and aqueous fraction of stems, using the method proposed, were insufficient to determine their constituents accurately.

In the evaluation of genotoxic potential, the obtained data from methanol extract and aqueous fraction of stems show no DNA damage (Figure 1; lanes 3, 4 and 5), exhibiting instead, antigenotoxic properties. Although antigenotoxic effect was found in stem extracts, analyses of leaf extracts showed more promising results, justifying the choice of this organ for further phytochemical analysis. On the other hand, no antigenotoxic effect was shown for root extracts. This experimental approach has been used elsewhere in order to evaluate a genotoxic or antigenotoxic profile induced by different plant species (Biso et al., 2010; Ferreira-Machado et al., 2004; Hamedt et al., 2014). Therefore, the use of other study designs, both *in vivo* and *in vitro*, is necessary to ensure the safety and efficacy of *S. brasiliensis* as a medicinal plant.

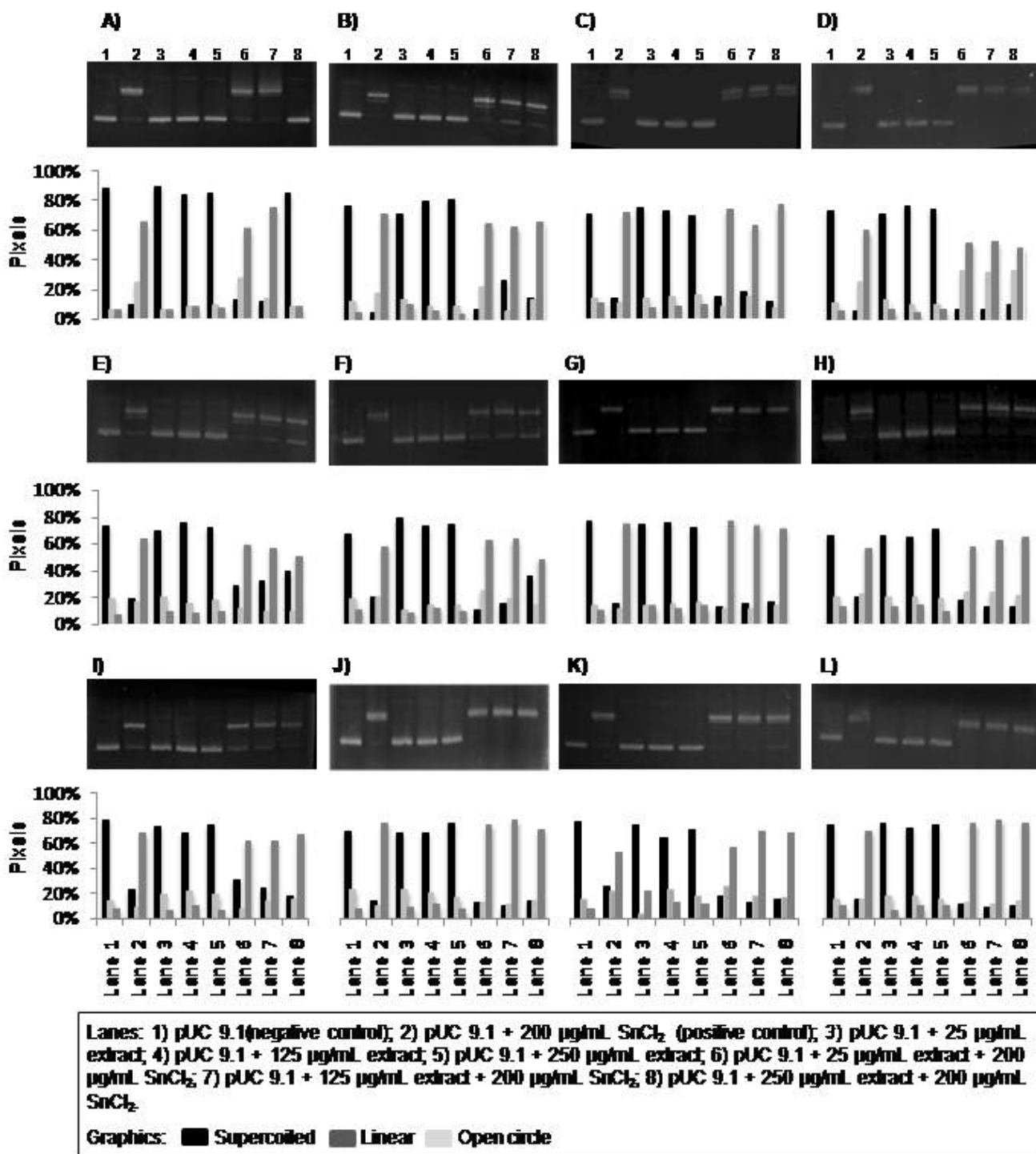


Figure 1. Qualitative and quantitative analysis of the genotoxic and antigenotoxic potential of *S. brasiliensis* extracts and fractions on plasmid pUC 9.1 DNA bands corresponding to aliquots of the plasmid solution (200 ng) treated with extracts and fractions (25, 125 and 250 µg/ml). A) methanol leaf extract; B) aqueous leaf fraction; C) n-hexane leaf fraction; D) ethyl acetate leaf fraction; E) methanol stem extract; F) aqueous stem fraction; G) n-hexane stem fraction; H) ethyl acetate stem fraction; I) methanol stem extract; J) aqueous root fraction; K) n-hexane root fraction; L) ethyl acetate root fraction. Bars represents DNA densitometric measures (%) by image J

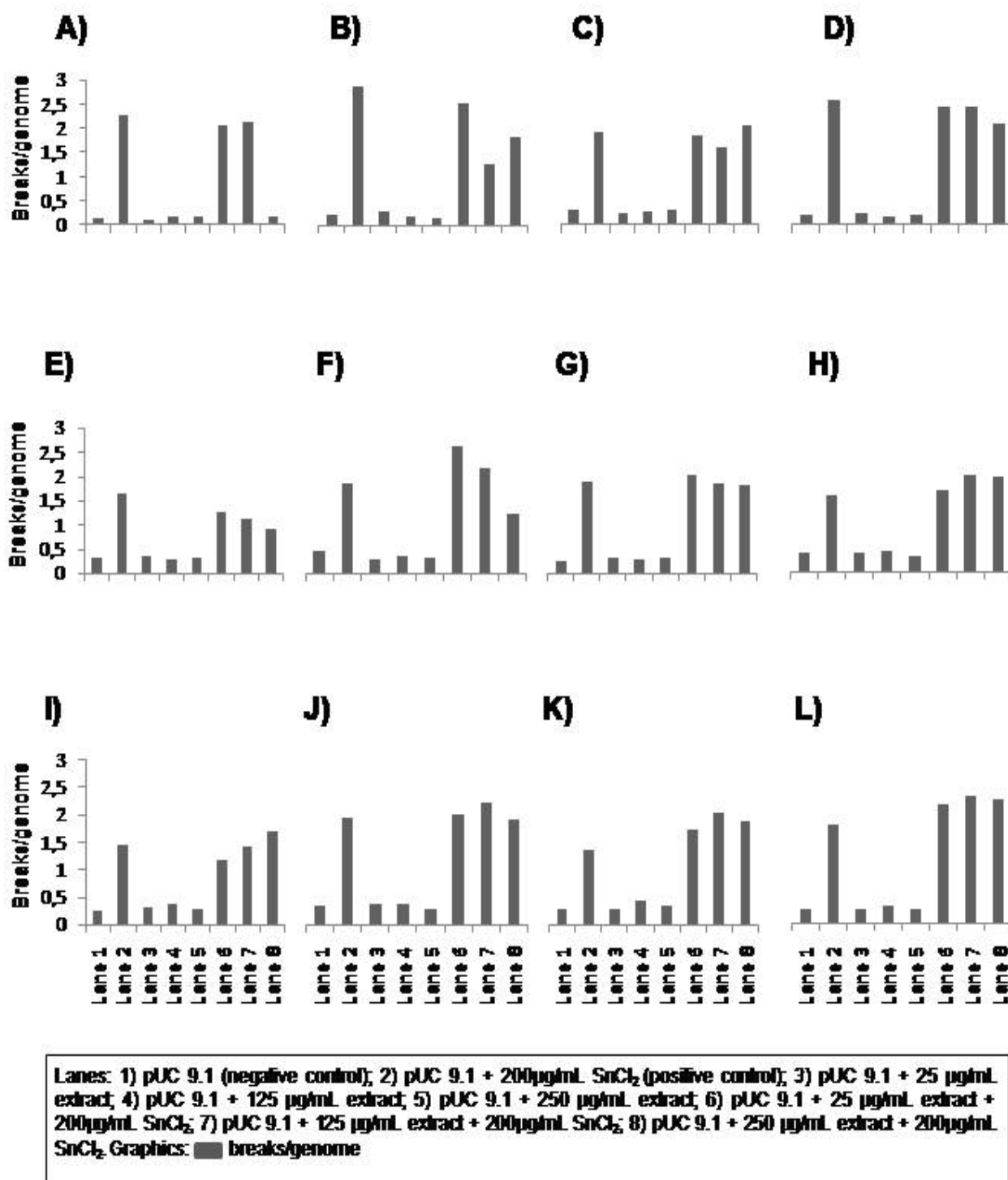


Figure 2. Number of single strand breaks/genome in plasmid pUC 9.1 DNA treated with *S. brasiliensis* extracts and fraction. Lanes corresponding to aliquots of the plasmid solution (200 ng) treated with the extracts and fractions (25, 125 and 250 µg/ml). A) methanol leaf extract; B) aqueous leaf fraction; C) n-hexane leaf fraction; D) ethyl acetate leaf fraction; E) methanol stem extract; F) aqueous stem fraction; G) n-hexane stem fraction; H) ethyl acetate stem fraction; I) methanol stem extract; J) aqueous root fraction; K)n-hexane root fraction; L) ethyl acetate root fraction. Bars represents the number of single strand breaks/genome of three independent experiments.

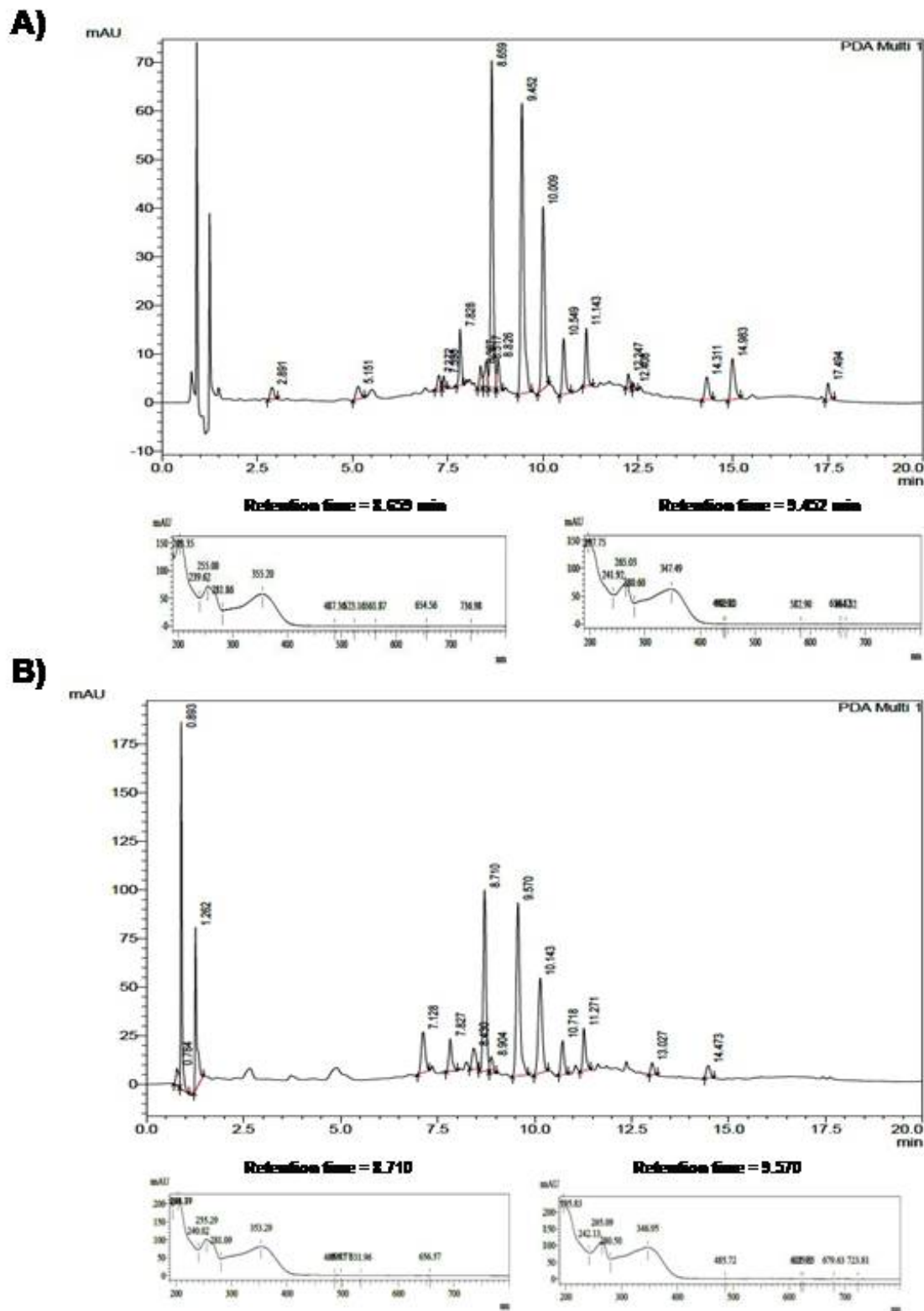


Figure 3. HPLC/DAD analysis of major compounds of methanol extract and aqueous fractions of *S. brasiliensis* in 254 nm and their absorption spectra in the ultraviolet region. A) methanol leaf extract; B) aqueous leaf fraction.

In conclusion, this work constitutes the first report on the genotoxic potential and antigenotoxic properties of *S. brasiliensis*. Results showed no genotoxic effect on DNA plasmid pUC 9.1. Moreover, it was shown that methanol and aqueous fractions of leaves and stems, at the highest concentration tested, have antigenotoxic activity protecting DNA from the breakdown caused by the stannous chloride. Considering the phytochemical profile obtained, we suggest that flavonoid content may be responsible for the activities evaluated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the suggestions of Dr. Flávio J. Dantas and the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Agra MF (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *J. Pharmacol.* 18:472-508.
- Agripino DG, Lima MEL, Silva MR, Meda CI, Bolzani VS, Cordeiro I, Young MCM, Moreno PRH (2004). Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest. *Ecological Station Juréia-Itatins. Biota. Neotrop.* 4:1-15.
- Barbosa WLR, Quignard E, Tavares ICC, Pinto LN, Oliveira FQ, Oliveira RM. (2004). Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. *Rev. Cien. UFPA.* 4.
- Bednarczuk VO, Verdam MCS, Miguel MD, Miguel OG (2010). Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. *Vis. Acad.* 11:43-50.
- Biso FI, Rodrigues CM, Rinaldo D, Reis MB, Bernardi CC, De Mattos JCP, Caldeira-de-Araujo A (2010). Assessment of DNA damage induced by extracts fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). *Mutat. Res.* 702:92-99.
- Boubaker J, Ghedira Z, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2013). Antigenotoxic and antioxidant activity in human chronic myelogenous leukaemia cell line K562 enhanced by *Nitraria retusa* leaf extracts. *Cell Biol. Int. Rep.* 20:5-12.
- Brunetti C, Ferdinando MD, Fini A, Pollastri S, Tattini M (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *Int. J. Mol. Sci.* 14:3540-3555.
- Caldeira-de-Araujo A, Dantas FJS, Moraes MO, Felzenszwalb I, Bernardo-filho M (1996). Stannous chloride participates in the generation of reactive oxygen species. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 48:109-113.
- Chaabane F, Boubaker J, Loussaif A, Neffati A, Kilani-Jaziri S, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2012). Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *Daphne gnidium* leaf extracts. *Complement. Altern. Med.* 12:1-10.
- De Mattos JCP, Dantas FJS, Caldeira-de-Araújo A, Moraes MO (2004). Agarose gel electrophoresis system in the classroom: detection of DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 32:254-257.
- Dragan S, Andrica F, Serban, MC, Timar R (2015). Polyphenols-Rich Natural Products for Treatment of Diabetes. *Curr. Med. Chem.* 22:14-22.
- Düsman E, Berti AP, Soares LC, Vicentini VEP (2012). The main mutagens and carcinogens agents of human exposure. *Rev. Saúd. Biol.* 7:66-81.
- Efferth T, Greten HJ (2012). Quality Control for Medicinal Plants. *Med. Aromat. Plants.* 1:e131.
- Efferth T, Greten HJ (2014). Traditional Medicine with Plants – Present and Past. *Med. Aromat. Plants.* 3:e151.
- Ferreira G (1995). Estudo taxonômico das espécies brasileiras do gênero *Norantea* Aublet (Marcgraviaceae). *Arq. Jard. Bot.* 33:9-53.
- Ferreira-Machado SC, Rodrigues MP, Nunes APM, Dantas FJS, De Mattos JCP, Silva CR (2004). Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicol. Lett.* 151:481-487.
- Giraldo-Cañas D (2004). Las especies del género *Schwartzia* (complejo *Norantea*, Marcgraviaceae) en Brasil. *Darwiniana.* 42:169-175.
- Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drug of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27:1-93.
- Hamedt AL, Ortiz IC, Garcia-Huertasa PA, Sáenzc J, Caldeira-De-Araujo A, De Mattos JCP, Rodríguez-Gasqueze MA, Triana-Chávez O (2014). Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericense* with trypanocidal. *Acta Trop.* 131:92-97.
- Jachak SM, Saklani A (2007). Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Curr. Sci.* 92:1251-1257.
- Jones NP, Arnason JT, Aboud-zaid M, Akpagana K, Sanchez-Vinda P, Smith ML (2000). Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by first nations peoples of Eastern Canada. *J. Ethnopharmacol.* 73:191-198.
- Mello GS, Ignacio ACPR, Albarello N (2014). Potencial antibacteriano de *Schwartzia brasiliensis*. *Novas Edições Acadêmicas. OmniScriptum GmbH & Co. Saarbrücken, Deutschland.* 52 p.
- Mello GS, Moraes BA, Sá AF, Vilardo AF, Rocha AS, Cordeiro LS, Simões-Gurgel C, Albarello N (2012). Estudos fitoquímicos e de toxicidade de *Cleome rosea* e *Norantea brasiliensis* cultivadas *in vivo* e *in vitro*. *Anais do II Simpósio Flora das Restingas Fluminenses; fitoquímica e bioatividade.*
- Mullally M, Kramp K, Cayer C, Saleem A, Ahmed F, Mcrae C, Baker J, Goulah A, Otorola M, Sanchez P, Garcia M, Poveda L, Merali Z, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT (2011). Anxiolytic activity of a supercritical carbon dioxide extract of *Souroubea sympetala* (Marcgraviaceae). *Phytother. Res.* 25:264-270.
- Newman DJ, Cragg GM (2012). Natural Products as Sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75:311-335.
- Obrenovich ME, Nair NG, Beyaz A, Aliev G, Reddy P (2010). The role of polyphenolic antioxidants in health, disease and aging. *Rejuvenation Res.* 13:1-13.
- Obrenovich ME, Li Y, Parvathaneni K, Yendluri BB, Palacios HH, Leszek J, Aliev G (2011). Antioxidants in health, disease and aging. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 10:192-207.
- Olasehinde GI, Ojurongbe O, Adeyeba AO, Fagade OE, Valecha N, Ayanda, IO, Ajayi AA, Egwari LO (2014). *In vitro* studies on the sensitivity pattern of *Plasmodium falciparum* to anti-malarial drugs and local herbal extracts. *Malaria J.* 13:1-7.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:513-523.
- Remington RD, Schor MA (1985). Some important distributions. In: Johnson RA, Wichem DW (Ed.), *Statistics with Applications to the Biological and Health Sciences.* Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs: New Jersey. 415p.
- Rocca MA, Sazima M, Sazima I (2006). Woody woodpecker enjoys soft drinks: the blond-crested woodpecker seeks nectar and pollinates canopy plants in South-Eastern Brazil. *Biota Neotrop.* 6:1-9.

Rocca MA, Sazima M (2008). *Ornithophilous canopy species in the Atlantic rain Forest of southeastern Brazil*. J. Field Ornithol. 79:130-137.

Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borelli F (2013). Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. Phytother. Res. 27:1588-1596.

Simões C, De Mattos JCP, Sabino KCC, Caldeira-De-Araújo A, Coelho MGP, Albarello N, Figueiredo SFL (2006). Medicinal potential from *in*

vivo and acclimatized plants of *Cleome rosea*. Fitoterapia. 77:94-99.
Zamith LR, Scarano FR (2004). Seedlings of species of Restingas the city of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Acta Bot. Bras. 18:161-176.