



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

Bianka de Oliveira Soares

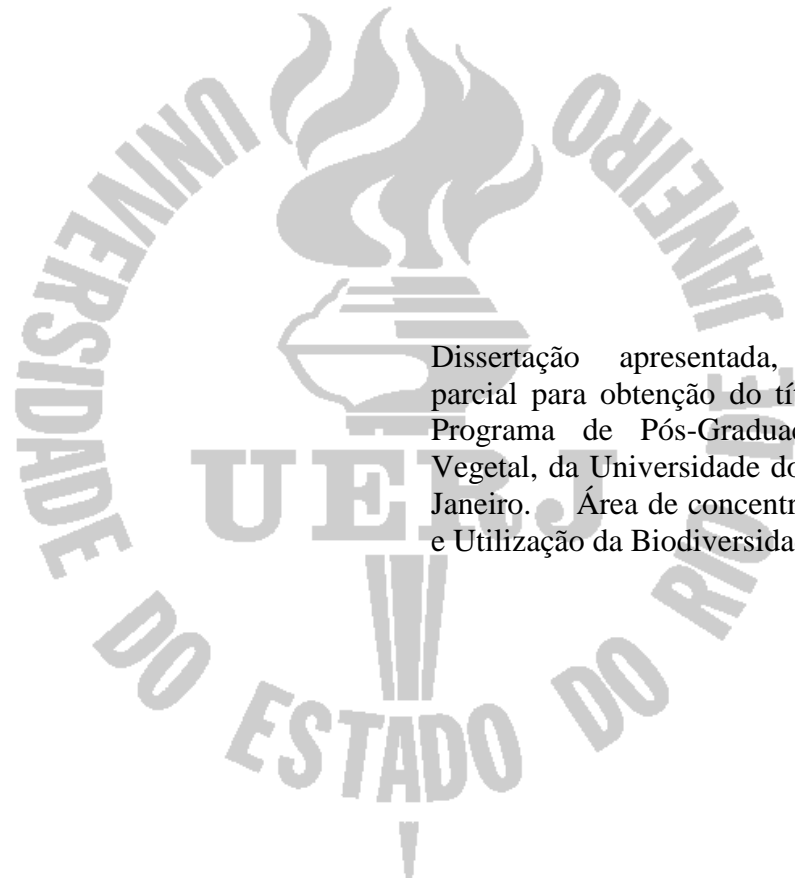
**Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de *Petiveria  
alliacea* L.**

Rio de Janeiro

2011

Bianka de Oliveira Soares

**Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de  
*Petiveria alliacea* L.**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

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

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo

Rio de Janeiro

2011

Bianka de Oliveira Soares

**Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de  
*Petiveria alliacea* L.**

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

Aprovado em dia 28 de Fevereiro de 2011.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Rachel Fatima Gagliardi Araujo (Orientadora)  
Departamento de Biologia Vegetal (IBRAG/UERJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Claudia Ribeiro  
Departamento de Biofísica e Biometria (IBRAG/UERJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Aline Castellar Duarte  
Departamento de Produtos Naturais e Alimentos  
(Faculdade de Farmácia/UFRJ)

---

Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas  
Departamento de Biofísica e Biometria (IBRAG/UERJ)

Rio de Janeiro

2011

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

S676 Soares, Bianka de Oliveira.

Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de *Petiveria alliacea* L. / Bianka de Oliveira Soares. – 2011.

87 f: il.

Orientadora: Rachel Fatima Gagliardi Araujo.

Coorientador: Adriano Caldeira de Araujo.

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

Inclui bibliografia.

1. *Petiveria alliacea* - Teses. 2. Ervas – Uso terapêutico - Teses. I. Araujo, Rachel Fatima Gagliardi. II. Araujo, Adriano Caldeira de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 582.664

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

---

Assinatura

---

Data



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à minha mãe pelo incentivo e carinho demonstrado durante esses anos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado me iluminando, me guardando e me abençoando em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem nas minhas realizações.

À Rachel, uma pessoa maravilhosa, que foi mais do que uma orientadora para mim, obrigada pelo carinho, incentivo, paciência e também pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

Ao meu co-orientador Prof Adriano Caldeira de Araujo, obrigada pela oportunidade e carinho durante esses anos.

A Prof<sup>a</sup>. Elisabeth Mansur e Prof<sup>a</sup>. Norma Albarello pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (Labmit e Labplan).

Ao Prof. Flávio S. Dantas e toda a equipe de técnicos e alunos do Laboratório de Radio e Fotobiologia (DBB/UERJ pela colaboração neste trabalho e na continuação do projeto).

Ao Prof. Alexandre Gabriel Christo pela ajuda na identificação taxonômica das amostras.

À Prof<sup>a</sup>. Marsen Coelho pela colaboração no desenvolvimento da análise fitoquímica e disponibilização da infraestrutura laboratorial do Depto. de Bioquímica da UERJ.

À Professora Dr<sup>a</sup> Suzana Guimarães Leitão e a Dr<sup>a</sup> Aline Castelar do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (Faculdade de Farmácia / UFRJ) e a Danielle C. Fernandes do Departamento de Bioquímica pela dedicação e paciência que teve comigo na etapa final do trabalho. Muito obrigada!

À equipe Labmit, por quem tenho carinho imenso: Marcela, Ana, Joerg, Gabriel, Erica, Leonardo, Danielle, Thiago, Juliana, obrigada por tornar o ambiente do laboratório mais divertido.

A minha amiga Simone ... tudo começou na graduação ... depois bacharel e agora pós-graduação.....que caminhada ..... quanto tempo te aturando hein.....sentirei saudades viu.... principalmente das nossas viagens, das conversas....que tivemos durante esses anos, das risadas, saídas....e claro das idas ao bar “Loreninha” depois trabalho, obrigada por tudo.

À minha amiga Ana Paula ... te adoro viu ... obrigada pelas conversas e conselhos durante a realização desse trabalho.

À minha amiga Leila, meu muito obrigada, pelos momentos divertidíssimos que tivemos, tanto no laboratório quanto nas nossas viagens, agradeço a ajuda nos experimentos e por sempre me incentivar a perseguir meus objetivos, sentirei saudades.

Às estagiárias “anjos”, Liane, Jamine, Viviane e Mariana, pelo companheirismo e dedicação que tiveram ao longo deste trabalho, auxiliando nos experimentos importantes para o término deste trabalho.

À Geórgia e Renata, pelo carinho, paciência e ajuda que sempre estiveram dispostas a me oferecer.

Aos técnicos, alunos e estagiários do Labplan pelo auxílio prestado sempre que necessário.

Ao Antonio, funcionário do HRJ, pela atenção na herborização das amostras.

Ao Gilson, que sempre ajudou nas tarefas do dia-a-dia. Muito obrigada por tudo.

Faça das pedras que são atiradas em você, um caminho sólido e firme para você caminhar.

Desconhecido

## RESUMO

SOARES, Bianka de Oliveira. **Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de *Petiveria alliacea* L.** 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

*Petiveria alliacea* L. é uma planta pertencente à família Phytolaccaceae, conhecida popularmente no país como guiné, erva-de-alho, erva-tipi ou amansa-senhor. Nativa da Região Amazônica tem sido cultivada em muitas áreas tropicais com propósito medicinal ou ritualístico. O objetivo desse trabalho foi (i) o desenvolvimento e a multiplicação de plantas de *P. alliacea* L. através de métodos de cultura de tecidos, e monitoramento fitoquímico das culturas, e (ii) avaliação comparativa das potencialidades genotóxica e antigenotóxica entre plantas coletadas no campo e produzidas *in vitro*. Exemplares de diferentes populações ocorrentes no estado do Rio de Janeiro foram utilizados como matrizes para a cultura. Foi estabelecido um protocolo para multiplicação das plantas em meio MS suplementado com BAP e ANA em diferentes concentrações e combinações, que forneceu como melhor resultado em média 8 plantas por explante na concentração de BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 0,54  $\mu\text{M}$ . A análise fitoquímica foi baseada em métodos cromatográficos de diferentes extratos de plantas de campo e plantas *in vitro* das populações estudadas resultando em diferentes substâncias identificadas nas amostras analisadas por cromatografia em camada delgada. Os extratos foram também avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo identificadas diferentes substâncias, entre as quais o dibenzil dissulfeto, um produto de degradação de tiosulfatos com importantes atividades biológicas na defesa das plantas. Os extratos aquosos das plantas de campo e daquelas estabelecidas *in vitro* foram submetidos à avaliação da potencialidade genotóxica e antigenotóxica, usando-se como modelo o DNA plasmidial pUC 9.1. Os resultados demonstraram que as concentrações utilizadas do extrato aquoso foram capazes de induzir alterações na conformação estrutural do DNA, indicando a ocorrência de quebras simples e duplas nesta molécula. Observou-se também que as lesões aumentaram, proporcionalmente ao aumento da concentração dos extratos, caracterizando-se, assim, um efeito dose-resposta. Os dados também apontaram para um efeito protetor do extrato aquoso, em relação aos danos oxidativos causados pelo cloreto estânico, indicando, também, uma potencialidade antigenotóxica do extrato aquoso.

Palavras-chave: Guiné. Phytolaccaceae. Dibenzil dissulfeto. Cromatografia gasosa. Potencial antigenotóxico. Antioxidante.

## ABSTRACT

*Petiveria alliacea* L. popularly known in Brazil as “Guiné”, “Amansa-senhor” or “Tipi” belongs to the Phytolaccaceae family. Native from the Amazon region, it has been cultivated in many tropical areas for medicinal or ritualistic purposes. The aim of this study was: i) the development and multiplication of plants of *P. alliacea* L. through tissue culture methods as well as monitoring phytochemical cultures; ii) comparative assessment of genotoxic and antigenotoxic potentialities between field collected and in vitro grown plants. Specimens from different populations occurring in the state of Rio de Janeiro were used as matrices for the culture. It was established a protocol for propagation in MS medium supplemented with different BAP + ANA concentrations and combinations whose best result (BAP 4,4  $\mu$ M + ANA 0,54  $\mu$ M) provided 8 plants per explant in average. The phytochemical analysis was based on chromatographic methods of different extracts both of field and in vitro plant populations resulting in different substances identified through the Thin-layer chromatography analyzing samples. The extracts were also assayed by cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas having identified various substances, including the dibenzyl disulfide, a degradation tiosulfinato’s product with important function in plant defense and increasing use by the pharmaceutical industry. Field and in vitro plant aqueous extracts were evaluated for genotoxic and antigenotoxic potentialities using PUC 9.1 plasmid DNA. These results showed changes in the DNA structural conformation indicating the occurrence of single and double strand breaks induced by the extracts in a dose-response way. Finally, data also pointed to a protective effect of aqueous extract against stannous chloride oxidative damage, characterizing an antigenotoxic potentiality of aqueous extract.

Keywords: Guinea. Phytolaccacea. Dibenzyl disulfide. Gas chromatography. Antigenotoxic potential. Antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	<i>Petiveria alliacea</i> L. ....	23
FIGURA 2 -	Aspecto fenotípico das plantas de <i>P. alliacea</i> proveniente de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro. ....	33
FIGURA 3 -	A – Flor bissexuada com simetria actinomórfica e perigônio tetrâmero, B – Fruto, apresentando 4 cerdas apicais. ....	42
FIGURA 4 -	Morfologia foliar de <i>P. alliacea</i> L. coletada em diferente locais. ....	43
FIGURA 5 -	Plantas de <i>P. alliacea</i> L. após estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> a partir de matrizes de diferentes origens. ....	47
FIGURA 6 -	Aclimatização de <i>P. alliacea</i> L. ....	47
FIGURA 7 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Petiveria alliacea</i> , brotos obtidos a partir de explantes apicais cultivados em meio MS suplementado BAP + ANA em diferentes concentrações e combinações. ....	49
FIGURA 8 -	Cromatografia das amostras padrão. ....	50
FIGURA 9 -	Cromatografia do extrato aquoso de <i>Petiveria alliacea</i> em camada delgada (TLC) revelada para flavonóides. ....	51
FIGURA 10 -	Padrão DTS.....	54
FIGURA 11 -	Cromatografia do extrato etanólico de <i>Petiveria alliacea</i> em camada delgada (TLC) revelada com ácido sulfúrico ....	55
FIGURA 12 -	Curva padrão do DTS - dibenzil trissulfeto ....	57
FIGURA 13 -	Cromatogramas de diferentes extratos de folhas de campo (Niterói) de <i>Petiveria alliacea</i> obtidos por GC MS. ....	58
FIGURA 14 -	A – Planta de Campo e B - Planta <i>in vitro</i> . Aliquotas de plasmídeo pUC 9.1 (100 ng) foram incubadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>P. alliacea</i> em presença e ausência do SnCl <sub>2</sub> . ....	60
FIGURA 15 -	Avaliação do efeito genotóxico de plantas de campo de <i>P. alliacea</i> L. coletadas em diferentes regiões do Rio de Janeiro ....	61
FIGURA 16 -	Avaliação do efeito genotóxico de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. alliacea</i> L. oriundas em diferentes regiões do Rio de Janeiro.....	62

FIGURA 17 -	Avaliação do efeito antigenotóxico de plantas de campo de <i>P. alliacea</i> L. coletadas em diferentes regiões do Rio de Janeiro.....	64
FIGURA 18 -	Avaliação do efeito antigenotóxico de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. alliacea</i> L. oriundas em diferentes regiões do Rio de Janeiro.....	65



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Frequência de descontaminação na cultura de segmentos nodais inoculados após os tratamentos com diferentes substâncias antimicrobianas .....	46
TABELA 2 -	Avaliação da regeneração de ápices caulinares de <i>P. alliacea</i> L. e em presença de diferentes combinações de BAP e ANA. ....	48
TABELA 3 -	Avaliação da regeneração de ápices caulinares excisados de plantas coletadas em diferentes locais e inoculados em uma combinação de BAP 13,32 $\mu$ M e ANA 0,54 $\mu$ M. ....	49
TABELA 4 -	Valores de $R_f$ das diferentes amostras de <i>Petiveria alliacea</i> obtidas por TLC .....	52
TABELA 5 -	Dados obtidos do NIST do GC MS .....	56
QUADRO 6 -	Esquema das diferentes formas de lesão ocorridas no plasmídeo .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etila
ANA	ácido naftalenacético
BAP	6-benzilaminopurina
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
DNA	ácido desoxirribonucleico
DCM	diclorometano
DDS	dibenzil dissulfeto
DTS	dibenzil trissulfeto
EAA	esteróides androgênicos anabólicos
ERO	espécie reativa de oxigênio
FcVI	folha campo de Vila Isabel
FiVI	folha <i>in vitro</i> Vila Isabel
FcMH	folha campo Marechal Hermes
FiMH	folha <i>in vitro</i> Marechal Hermes
FcMg	folha campo Magé
FiMg	folha <i>in vitro</i> Magé
FcN	folha campo Niterói
FiN	folha <i>in vitro</i> Niterói
GC MS	gás chromatography – mass spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas)
HgCl <sub>2</sub>	cloreto de mercúrio
MS	meio de cultura Murashige & Skoog
MSO	meio MS sem adição de reguladores de crescimento
NaOCl	hipoclorito de sódio
NP	natural product (Ácido difenilbórico aminoetiléster)
nm	nanômetro
O <sub>2</sub>	gás oxigênio
µL	microlitro
µM	micromolar
PEG	polietileno glicol
R <sub>f</sub>	Fator de relação

TLC	Thin-layer chromatography ou Cromatografia em camada delgada
UV	ultravioleta
UVB	radiação ultravioleta B
RcVI	raiz de campo de Vila Isabel
RiVI	raiz <i>in vitro</i> de Vila Isabel
RcMH	raiz de campo de Marechal Hermes
RcMg	raiz de campo de Magé
RiMg	raiz <i>in vitro</i> de Magé
RcN	raiz de campo de Niterói
RiN	raiz <i>in vitro</i> de Niterói

## **APRESENTAÇÃO**

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (Departamento de Biologia Celular e Departamento de Biologia Vegetal) e do Departamento de Biofísica e Biometria, e em colaboração com o Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e com o Núcleo de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

## SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO .....	18
1.1	<b>Plantas Medicinais</b> .....	19
1.2	<b><i>Petiveria alliacea</i> L.</b> .....	22
1.2.1	<u>Características taxômicas</u> .....	24
1.2.2	<u>Morfo-fisiologia</u> .....	24
1.3	<b>Cultura de Tecidos Vegetais</b> .....	25
1.4	<b>Estudos fitoquímicos</b> .....	26
1.4.1	<u>Diversidade química da espécie</u> .....	27
1.5	<b>Estudos Etnofarmacológicos</b> .....	28
1.5.1	<u>Potencialidade genotóxica/antigenotóxica</u> .....	29
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	31
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	31
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	32
3.1	<b>Material Vegetal</b> .....	32
3.1.1	<u>Origem</u> .....	32
3.1.2	<u>Classificação</u> .....	34
3.2	<b>Cultura de Tecidos Vegetais</b> .....	34
3.2.1	<u>Descontaminação</u> .....	34
3.2.2	<u>Micropropagação</u> .....	35
3.2.3	<u>Aclimatização</u> .....	35
3.3	<b>Análise fitoquímica comparativa</b> .....	36
3.3.1	<u>Preparo dos extratos</u> .....	36
3.3.2	<u>Cromatografia em camada delgada</u> .....	36
3.3.3	<u>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa</u> .....	38
3.4	<b>Avaliação da potencialidade genotóxica/antigenotóxica</b> .....	38
3.4.1	<u>Extração do plasmídeo</u> .....	38
3.4.2	<u>Tratamentos com extrato aquoso</u> .....	39
3.4.2.1	Avaliação do potencial genotóxico .....	39
3.4.2.2	Avaliação do potencial antigenotóxico .....	39
3.4.3	<u>Eletroforese em gel de agarose</u> .....	40

4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	<b>Cultura de tecidos vegetais</b> .....	41
4.1.1	<u>Caracterização botânica</u> .....	41
4.1.2	<u>Micropropagação</u> .....	44
4.2	<b>Análise fitoquímica</b> .....	50
4.2.1	<u>Cromatografia em camada delgada</u> .....	50
4.2.2	<u>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa</u> .....	56
4.3	<b>Avaliação da potencialidade genotóxica dos extratos</b> .....	59
4.4	<b>Avaliação da potencialidade antigenotóxica dos extratos</b> .....	63
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em diversidade biológica, seu território possuindo cinco biomas principais: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga. As regiões do Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica, especificamente, são consideradas como “*hotspots* de biodiversidade”, ou seja, ambientes onde existe grande concentração de espécies endêmicas, que estão desaparecendo devido à perda do seu habitat (MYERS *et al.*, 2000). Essas regiões representam reservatórios importantes de substâncias de origem vegetal (SOUSA *et al.*, 2008). Essas substâncias são sintetizadas em resposta a diferentes estímulos, sejam de natureza física, química ou biológica. Muitos fatores tais como tipo do solo, umidade, intensidade e tipo de radiação luminosa, temperatura e até a poluição atmosférica, podem interferir na composição química dos vegetais. Além disso, ocorrem adaptações coevolutivas complexas, entre plantas, animais e microrganismos presentes em um ecossistema (ALVES, 2001). Essas substâncias são produzidas durante o metabolismo secundário por diferentes vias que originam produtos de baixo peso molecular, em quantidades variáveis, às vezes muito baixas. Além disso, também são sintetizadas substâncias complexas que atuam na defesa das plantas contra seus predadores e patógenos. A grande diversidade química observada entre os metabólitos secundários pode ser explicada, em parte, pela fixação da planta ao solo, impossibilitando que esta evite situações ambientais adversas.

## 1.1 Plantas Medicinais

Os metabólitos secundários se classificam a partir das diferentes vias biossintéticas. A rota da via biossintética que dá origem aos metabólitos primários, essenciais para a vida da planta, fornece moléculas importantes para a síntese das rotas de metabólitos secundários.

Atualmente a classificação mais aceita de metabólitos secundários ou especiais se baseia nas diferentes vias biossintéticas, que se relacionam com as rotas responsáveis pela síntese de metabólitos essenciais, conhecidos como primários, de onde saem os precursores para a síntese de metabólitos secundários. Partindo do metabolismo da glicose, através de alguns intermediários principais, forma-se o ácido chiquímico, precursor de várias substâncias fenólicas e alguns aminoácidos aromáticos que originam alcalóides. Outra via metabólica forma o ácido mevalônico, precursor de ácidos graxos, terpenóides e esteróides. Além dessas, vários aminoácidos serão precursores de substâncias nitrogenadas, incluindo alguns alcalóides que podem ser formados por vias diferentes (CASTRO *et al.*, 2001, SIMÕES *et al.*, 2007).

Os metabólitos secundários também podem ser divididos didaticamente em três grandes grupos: terpenos, substâncias fenólicas e nitrogenadas que englobam moléculas de natureza química diversificada como: ácidos graxos e seus ésteres, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, compostos acetilênicos, flavonóides, cumarinas, alcalóides e outras substâncias nitrogenadas (TAIZ; ZAIGER, 2004).

Terpenos são metabólitos geralmente voláteis, que na planta estão envolvidos com diversas respostas de defesa, principalmente contra estresses bióticos. Assim, os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis que atuam como feromônios para atrair insetos polinizadores; os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, e muitos diterpenos dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenos e seus derivados, que incluem os esteróides, apresentam uma gama de funções em animais e plantas, como, por exemplo, proteção contra herbívoros, na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (PERES, 2010).

Substâncias fenólicas incluem várias substâncias de estrutura simples, como ácido gálico, ou macromoléculas de estrutura complexa, como lignina e tanino. Alguns fenilpropanóides constituem fotorreceptores capazes de desencadear respostas importantes para o desenvolvimento vegetal, como as guias de nectário que fluorescem sob radiação ultravioleta (UV) facilitando o caminho dos insetos polinizadores. Além desses, flavonóides como as antocianinas são pigmentos responsáveis por uma grande variedade de cores nos vegetais, que



vão do vermelho-alaranjado, ao vermelho vivo, roxo e azul. São encontradas na forma de glicosídeos facilmente hidrolisados por aquecimento em meio ácido, resultando em açúcares e agliconas, denominadas antocianidinas. Essas substâncias desempenham um papel importante na proteção das estruturas vegetais contra a radiação UV, reduzindo a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO). Além de antocianinas, as flavonas e flavonóis também atuam na defesa do vegetal contra ação de radiação ultravioleta B (UVB) (SIMÕES, 2007).

Dentre as substâncias nitrogenadas, os glicosinolatos ou tioglicosídeos já foram descritos em 16 famílias de espécies vegetais, existindo, pelo menos, 120 tipos diferentes identificados em plantas. Uma grande parte das espécies que sintetizam estas substâncias pertence aos gêneros Brassicaceae, Caricaceae, Capparaceae e Alliacea (CASTRO; ANJOS, 2008).

Muitos dos benefícios proporcionados à saúde pela cebola e espécies relacionadas são atribuídos aos compostos organosulfurados, os quais chegam a compor de 1-5% do peso seco total de bulbos maduros. A ação da enzima alinase sobre os sulfóxidos de cisteína forma substâncias voláteis como tiosulfatos, tiosulfonatos (mono-, di- e tri-sulfetos). A gama de propriedades funcionais atribuídas aos sulfóxidos de cisteína e seus derivados incluem: propriedades anticarcinogênicas, atividade antiinflamatória e efeitos antibióticos, entre outros (CARVALHO; MACHADO, 2010). Os tioglicosídeos encontrados nessas famílias são compostos com sabor picante característico, muito usados na indústria alimentícia (DAXENBICHLER *et al.*, 1991). No vegetal, essas substâncias ficam armazenadas dentro dos plastos, onde foram sintetizadas, sendo liberadas quando há lesão celular. Nesse processo, entram em contato com enzimas tioglicosidases, normalmente compartimentalizadas em vacúolos. A hidrólise dos tioglicosídeos origina então isotiocianatos, compostos voláteis com ações repelentes, que, por sua vez também sofrem transformações químicas subsequentes, gerando grande variedade de substâncias, que também apresentam atividades biológicas importantes e têm sido implicados em uma variedade de mecanismos anticarcinogênicos (LANCASTER; COLLIN, 1981).

A história da civilização demonstra que, enquanto buscava alimento para sua sobrevivência, a humanidade foi descobrindo as propriedades curativas ou tóxicas das plantas (ALVES, 2001). Esse conhecimento acumulado permitiu o desenvolvimento da farmacologia como ciência.

Atualmente, as possibilidades de isolamento e utilização de metabólitos secundários para fins terapêuticos promoveram as plantas a um importante patamar na medicina mundial. Muitos países já legalizaram essas substâncias e reconhecem seu uso tradicional. A utilização popular de plantas como fitoterápicos é direcionada para o tratamento de várias enfermidades, desde infecções causadas por microrganismos patogênicos até o câncer. Além do uso na medicina popular, as plantas medicinais são importantes na produção de fármacos como emetina, vincristina, colchicina, rutina, e a cada momento, novas moléculas bioativas são incluídas na literatura (FOGLIO *et al.*, 2006).

Nos últimos anos a procura por plantas para utilização como medicamento vem aumentando e as indústrias farmacêuticas motivadas, principalmente pela abundância vegetal e baixo custo, investem mais nas pesquisas de novos fármacos (SOUSA *et al.*, 2008).

A etnofarmacologia é a ciência que procura entender o universo dos recursos naturais utilizados como drogas pelos seres humanos (RODRIGUES *et al.*, 2003). Estudos de etnofarmacologia têm demonstrado que muitas espécies são utilizadas sem nenhum respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Um dos principais problemas na produção de plantas medicinais é a sua contaminação por microrganismos, larvas e ovos de artrópodes, responsáveis pela baixa qualidade fitossanitária dos fitoterápicos comercializados atualmente (MELO *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005). Além disso, muitos destes produtos não são identificados corretamente, sendo comuns os casos de espécies comercializadas com nomes incorretos devido às dificuldades técnicas para identificação taxonômica de materiais coletados no campo (SILVA; PEIXOTO, 2009). Produtores de fitoterápicos têm muitas dificuldades para obter material botânico, identificado corretamente e sem a presença de contaminantes, pois, produtores de mudas certificadas ainda não estão disponíveis, em número suficiente, para atender ao mercado (MURCH; SAXENA, 2001; KNEIFEL *et al.*, 2002).

Outro problema comumente enfrentado por produtores é que plantas de mesma espécie podem produzir compostos químicos diferentes, pois populações distintas estão sujeitas a fatores ambientais variáveis como a sazonalidade ou condições de cultivo, que podem alterar qualitativamente ou quantitativamente a produção de metabólitos secundários (BOURGAUD *et al.*, 2001).

Técnicas biotecnológicas de produção vegetal, baseadas em cultura de tecidos, têm sido propostas e têm permitido a liberação de muitos fármacos novos no mercado (TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; VANISREE *et al.*, 2004). A cultura de tecidos vegetais possibilita a multiplicação de plantas em condições fitossanitárias ideais, disponibilizando matéria-prima para a exploração de metabólitos de forma contínua e homogênea, em estado fisiológico uniforme e independente da influência de fatores ambientais, sazonais e geográficos (VANISREE *et al.*, 2004). A biotecnologia, portanto, aumenta as perspectivas de conservação e exploração econômica dessas espécies com a possibilidade de fornecimento de material botânico para a indústria de fitoterápicos.

## 1.2 *Petiveria alliacea* L.

*Petiveria alliacea* L. é uma planta pertencente à família Phytolaccaceae, conhecida popularmente no país como guiné, erva-de-alho, erva-tipi ou amansa-senhor (MARCHIORETTO, 1989) (Figura 1). Nativa da Região Amazônica tem sido cultivada em muitas áreas tropicais com propósito medicinal ou ritualístico (GIRÓN *et al.*, 1991; PONTE *et al.*, 1996; CANO; VOLPATO, 2004). O nome "amansa-senhor" foi cunhado pelos escravos, que costumavam adicionar as raízes maceradas ao alimento consumido por seus senhores, o que provocava superexcitação, insônia e alucinações, muitas vezes seguidas po

convulsões e morte. Atualmente, as folhas são amplamente empregadas em rituais religiosos, em banhos e na produção de defumadores (CASTELLAR, 2006). Na cidade do Rio de Janeiro é comercializada em mercados e feiras livres, sendo muito utilizada nos cultos afro-brasileiros (AZEVEDO; SILVA, 2006; CHRISTO *et al.*, 2006).



Figura 1 - *Petiveria alliacea* L., aspecto geral da planta com inflorescência terminais.

Foto:<http://www.goldenline.pl/forum/lekoslinny/649050>

A família Phytolaccaceae é considerada a mais antiga da ordem Caryophyllales e se divide em seis subfamílias (CRONQUIST, 1981). Essa família possui 18 gêneros e cerca de 65 espécies distribuídas, principalmente, na região neotropical (UDULUTSCH *et al.*, 2007). No Brasil ocorrem 8 gêneros e 22 espécies (MARCHIORETTO, 2010). Os representantes dessa família, entre os quais se inclui *P. alliacea*, constituem plantas herbáceas e arbustivas, raramente árvores (CRONQUIST, 1988; JOLY, 1998), e desenvolvem-se, preferencialmente, em locais sub-úmidos e sombreados (MARCHIORETTO, 1989).

### 1.2.1 Características taxonômicas

Na família Phytolaccaceae, o gênero *Petiveria* é monotípico, sendo representado por indivíduos de hábito herbáceo a subarbustivo, com forte odor aliáceo. O tipo utilizado na descrição da espécie foi coletado na Jamaica (LINNAEUS, 1753), porém, segundo Marchioretto (2010), pode ser encontrada em estado natural nos estados do Acre, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e em estado subespontâneo em praticamente todo o país.

### 1.2.2. Morfo-fisiologia

*Petiveria alliacea* pode alcançar até um metro de altura (CAD, 2003) e morfológicamente caracteriza-se por seus ramos eretos, folhas lisas, alternas, elípticas e minúsculas flores brancas em inflorescências terminais (JOLY, 1957; CRONQUIST, 1988) (Figura 1). A floração e frutificação ocorrem, principalmente, de dezembro a abril (HATSCHBACH; GUIMARÃES, 1973), sendo a dispersão de sementes realizada pelo vento ou por pássaros (LORENZI, 1992).

Apesar de vários estudos revelarem as propriedades medicinais desta espécie, há poucos trabalhos com informações sobre a organização estrutural da parte aérea (DUARTE; LOPES, 2005). Um estudo anatômico recente foi realizado com objetivo de contribuir com parâmetros para o controle de qualidade do material botânico obtido no campo. Os autores concluíram que a presença de fitólitos com inclusões minerais, na parte aérea da planta, pode ser um parâmetro de avaliação de drogas vegetais que contenham materiais provenientes de folhas e caule de *P. alliacea* (ROCHA *et al.*, 2006).

*P. alliacea* não se encontra em situação de ameaça no campo e também não apresenta dificuldades naturais para sua propagação. Entretanto, muitos fatores, entre os quais as condições ambientais e o período da colheita, podem alterar drasticamente a produção de metabólitos em plantas cultivadas no campo, causando variações na expressão do potencial genético. Além disso, como já analisado anteriormente, observa-se uma procura crescente por plantas com propriedades medicinais e o aumento do extrativismo pode causar diminuição de populações que eventualmente contenham genótipos de maior interesse. O uso de métodos de cultura de tecidos possibilitará a multiplicação de genótipos específicos, sem a influência de fatores ambientais na produção das substâncias bioativas.

### 1.3 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais é definida por um conjunto de técnicas que utilizam um explante (pequeno fragmento isolado da planta) inoculado em meio nutritivo, sendo esse material incubado em condições assépticas, sob condições controladas de luminosidade e temperatura. Dentre essas técnicas, a micropropagação possibilita altas taxas de multiplicação (SOUZA, 2006).

A micropropagação consiste na obtenção e multiplicação de plantas, permitindo a clonagem de várias espécies. Durante o desenvolvimento, ocorre a formação de um grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes, em curto período de tempo. Essa técnica permite a propagação comercial e industrial de plantas, facilitando também o melhoramento genético, o manejo, o intercâmbio e a conservação de germoplasma. Além da micropropagação, culturas de órgãos ou embriões somáticos têm se mostrado sistemas interessantes para a produção específica de metabólitos em algumas espécies (CARVALHO; VIDAL, 2003). Também por meio das técnicas de cultura de tecidos, a obtenção de plantas a partir de meristemas permite a obtenção de material livre de vírus, células isoladas ou massa de tecidos desdiferenciados (calo), facilitando a propagação e seleção *in vitro* de plantas resistentes a condições adversas (CARVALHO; VIDAL, 2003).

A totipotência das células vegetais se expressa através de diferentes vias de regeneração. O processo regenerativo pode ser alcançado por desenvolvimento ou multiplicação de meristemas pré-existentes e a multiplicação pode ser obtida a partir de ápices caulinares, radiculares, ou segmentos nodais (GEORGE, 2008). Os meristemas são tecidos indiferenciados de uma planta jovem, das quais novas células se originam (RAVEN *et al.*, 2001). As outras vias de regeneração são a organogênica e a embriogênica, que podem ocorrer de forma direta, dando origem a órgãos ou a embriões diretamente dos tecidos, ou de forma indireta, passando pela fase de calo, que se caracteriza por um grupo, ou massa de células com crescimento desordenado, que pode apresentar certo grau de diferenciação (CARVALHO; VIDAL, 2003; SOUZA, 2006).

*P. alliacea* L. foi propagada *in vitro*, anteriormente, por meio da cultura de segmentos nodais, gerando plantas com as mesmas características fenotípicas da planta matriz (CASTELLAR, 2006). Os componentes voláteis e óleos essenciais mostraram diferenças qualitativas e quantitativas entre as estruturas vegetais de plantas *in vitro* e *ex vitro*, indicando que as metodologias da cultura *in vitro* afetaram a produção de metabólitos secundários, constituindo uma ferramenta útil para a modulação de substâncias de interesse farmacológico (CASTELLAR, 2006).

Para aprofundar e dar continuidade a esses estudos, este trabalho foi desenvolvido para aumentar a produção de plantas, visando à produção e análise de substâncias bioativas nesses sistemas.

#### 1.4 Estudos fitoquímicos

Vários métodos de análise podem ser utilizados para estudos comparativos do perfil fitoquímico de plantas produzidas em cultura com as matrizes de campo, sendo os mais utilizados são baseados em técnicas cromatográficas. A cromatografia é uma técnica de separação de misturas e identificação de seus componentes. Existem várias técnicas de cromatografia, todas se baseiam em uma fase móvel e uma fase estacionária. A cromatografia em camada fina ou delgada (TLC) é, fundamentalmente, um método físico-químico bastante simples de separação dos componentes de uma mistura, que pode ser aplicado a amostras muito pequenas (1-100 µg), e se realiza por meio da distribuição do material entre duas fases em íntimo contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela estacionária, os componentes do extrato em estudo se distribuem entre elas, de tal forma que cada um dos componentes é retido seletivamente na fase estacionária, de acordo com sua maior ou menor interação, resultando em migrações diferenciadas (DEGANI, 1998).

A cromatografia gasosa ou líquido/gasosa foi introduzida em 1952 por James e Martin (JAMES, 1952; JAMES; MARTIN, 1952 a, b). Na década de 80, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG MS) surge como técnica analítica para a detecção e quantificação de EAA (Esteróides Androgênicos Anabólicos) em programas de controle da dopagem no esporte (VAN DE KERKHOF *et al.*, 2000). Sua operação básica é a volatilização e a transferência das amostras para uma coluna cromatográfica, através de uma interface aquecida chamada de injetor. A coluna cromatográfica também é aquecida de forma

controlada e, para que ocorra a movimentação da amostra dentro da coluna, usa-se um gás inerte (podendo ser o hélio ou nitrogênio), que é chamado de gás de arraste, fazendo o papel da fase móvel (KITSON *et al.*, 1996). A aplicação desta técnica é ampla, contudo sua principal limitação deve-se ao fato de que as amostras devem ser voláteis para as condições de análise.

O método de cromatografia em fase gasosa é rápido e é extremamente sensível, podendo detectar de nanogramas a picogramas das substâncias presentes. O uso dessa técnica requer a disponibilidade de bancos de dados que contenham os valores dos tempos de retenção e/ou os espectros de massa para comparar com os dados obtidos (BROCHINI, 1998).

#### 1.4.1 Diversidade química da espécie

A análise fitoquímica de *Petiveria alliacea* já foi amplamente estudada, o que pode ser constatado pelos inúmeros registros, encontrados na literatura, sobre a variedade química produzida pelo metabolismo secundário dessa espécie. Nas raízes encontram-se substâncias como benzaldeído, dibenzil dissulfeto, cis-e trans-stilbeno, dibenzil trissulfeto e cumarina (KUBEC, 2003; DE SOUZA, 1990), em suas folhas foram identificados flavonóides como 6-C-formil e 6-C-hidroximetil, além de outros compostos como glicosídeos saponínicos, triterpenos, isoarborinol, isoarboriol acetato, isoarborinol cinamato, esteróides, alcalóides e tanino (DE SOUZA, 1990; DELLE-MONACHE, 1992, 1996).

A análise dos componentes voláteis permitiu a identificação de compostos sulfurados, indicados na literatura como responsáveis pelo aroma de alho, característico dessa espécie. As características de sabores e odores, bem como o amplo espectro de atividades terapêuticas do alho, cebola e espécies relacionadas também são atribuídos a compostos sulfurosos (RAMIREZ, 2003). Entre essas substâncias, o dibenzil trissulfeto (DTS) é considerado o principal produto lipofílico da espécie (DE SOUSA, 1990) e apresenta propriedades neurotóxicas e citostáticas (ROSNER *et al.*, 2001). Em um programa de seleção de plantas realizado na Universidade de Illinois em Chicago, avaliando mais de 1.400 extratos de plantas como terapias potencialmente inovadoras para a prevenção e tratamento do câncer, *P. alliacea* foi uma das 34 plantas promissoras identificadas como tendo atividade antineoplásica (Taylor, 2005).



A síntese de DTS e outros produtos relacionados na espécie já foi elucidada como sendo um produto do metabolismo da cisteína. Os tecidos da raiz dessa espécie são particularmente ricos em sulfóxidos de cisteína, denominados petiverinas, e os produtos derivados desses sulfóxidos (por ex., dibenzil sulfetos, benzaldeído, trithiolaniacina, estilbenos, benzil mercaptana, ácido benzóico), não estão presentes nos tecido intactos de *P. alliacea*. De fato, estes compostos são produtos da degradação de tiosulfatos, que surgem pela ação de uma C-S liase em sulfóxidos de cisteína, por substituição no enxofre, após o rompimento tecidual (KUBEC *et al.*, 2002).

Em relação ao mecanismo de ação do DTS isolado de *P. alliacea* L, foi determinado tratar-se de uma proteína quinase, ativada por mitógenos extracelulares, que desencadeia a transdução de sinal e a alteração da expressão gênica. Dibenzil trissulfeto e seus derivados apresentaram atividade citotóxica potente sobre uma vasta gama de linhagens de células cancerosas, impedindo sua proliferação (WILLIAMS *et al.*, 2007).

### 1.5 Estudos etnofarmacológicos

*P. alliacea* L. tem sido tradicionalmente usada na medicina popular devido a diversas atividades farmacológicas, muitas comprovadas cientificamente, nos últimos anos. Foram descritas as seguintes atividades: repelente (JOHNSON *et al.*, 1997), biocida (PÉREZ, 2002); narcótica (ZOGHBI *et al.*, 2002), abortiva (FENG *et al.*, 1964; OLUWOLE & BOLARINWA, 1998), afrodisíaca, depurativa, diurética, expectorante (CLOSA *et al.*, 1997), nematicida (PONTE *et al.*, 1996), acaricida (JOHNSON *et al.*, 1997), antiofídica, antiinflamatória (SERTIE *et al.*, 1995 a e b), anticoagulante (VILLAR *et al.*, 1997), analgésica (DI STASI, 1988; DELIMA *et al.*, 1991; LOPES-MARTINS *et al.*, 2002) e antimitótica (MALLPEZZI *et al.*, 1994). Além dessas, foi também descrito um aumento da atividade de células killer (QUEIROZ *et al.*, 2000) e uma ação específica contra diferentes agentes patogênicos, incluindo *Trypanosoma cruzi* (CÁCERES *et al.*, 1998; BERGER *et al.*, 1998), vírus da diarreia bovina (BVDV) (RUFFA *et al.*, 2002) e *Listeria monocytogenes* (QUADROS *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2000). Entre as atividades específicas, o uso popular com base em pesquisa etnobotânica sugere também uma ação anti-malárica (RUFFA *et al.*, 2002; CARABALLO *et al.*, 2004).

### 1.5.1 Potencialidade genotóxica/antigenotóxica

As pesquisas sobre os efeitos biológicos de *P. alliacea* têm despertado grande interesse pelas substâncias presentes nesta espécie, para uso terapêutico e profilático. Paralelamente, existe uma carência de estudos sobre a ação específica desses materiais ao nível do genoma. Hoyos e colaboradores (1992) relataram uma atividade genotóxica moderada, com base em alterações citogenéticas, utilizando ouriços-do-mar como modelo. Embora estudos recentes descrevam uma atividade antioxidante bem definida para alguns componentes dos extratos (OKADA *et al.*, 2008), não foram encontrados relatos de efeitos antigenotóxicos na literatura consultada.

Apesar de nenhum medicamento produzido a partir dos extratos ou estruturas de *P. alliacea* ter sido liberado até o presente pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CASTELLAR, 2006), o extrato bruto dessa espécie foi incluído no Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (Brasil Ministério da Saúde, 2006). O ensaio clínico objetivando avaliar o efeito analgésico do chá preparado com as raízes, em portadores de osteoartrose, demonstrou que os pacientes apresentaram melhora significativa, após a administração do chá.

O estudo dos efeitos de extratos vegetais requer uma avaliação da toxicidez, ao nível do genoma, e modelos usando DNA plasmidial têm se mostrado muito úteis nas avaliações de efeitos causados no DNA por diversos agentes químicos e físicos. Nessa linha, uma das metodologias disponíveis para avaliar a potencialidade genotóxica dos extratos pode ser através da comparação do perfil eletroforético de amostras de DNA plasmidial tratadas, ou não, com o extrato vegetal em estudo. Neste caso, quando o extrato é capaz de induzir lesões do tipo quebra (simples ou dupla), a conformação estrutural do plasmídeo se altera, resultando em perfil eletroforético diferente daquele produzido pelo DNA íntegro, na forma superhelicoidizada (DE MATTOS *et al.*, 2004).

A facilidade de separação de diferentes conformações estruturais de DNA plasmidial por eletroforese também permite o estudo da potencialidade antigenotóxica (DE MATTOS *et al.*, 2000). Nesse modelo, o DNA plasmidial é previamente tratado com um agente químico capaz de promover danos oxidativos, o que causa lesões mensuráveis. O tratamento concomitante do plasmídeo com extratos vegetais pode promover uma proteção contra as lesões oxidativas causadas pelo agente oxidante. Esses experimentos permitem a determinação da potencialidade antigenotóxica, e indicam, de forma indireta, uma possível atividade antioxidante do extrato em estudo.

Os estudos sobre a potencialidade genotóxica e mutagênica, propostos neste trabalho, poderão constituir um dos pré-requisitos para a liberação de substâncias extraídas dessa espécie para utilização terapêutica. Além disso, esses testes poderão contribuir para o monitoramento de plantas produzidas em cultura de tecidos, como parte dos controles exigidos pelo Ministério da Agricultura para a certificação das mudas, visando o suprimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento e a multiplicação de plantas de *P. alliacea* L. através de métodos de cultura de tecidos, com monitoramento fitoquímico, e avaliação comparativa da potencialidade genotóxica e antígenotóxica de plantas coletadas no campo e produzidas *in vitro*.

Para atingir esse objetivo geral o trabalho foi dividido em etapas, com os seguintes objetivos específicos:

### 2.2 Objetivos específicos

- Estabelecimento e multiplicação das culturas *in vitro* a partir de exemplares das populações estudadas.
- Avaliação fitoquímica comparativa entre as os extratos de plantas de campo e de plantas *in vitro* das populações estudadas.
- Investigação da potencialidade genotóxica e antígenotóxica de extratos de plantas de campo e plantas produzidas *in vitro* das populações estudadas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Material vegetal

##### 3.1.1 Origem

Foram utilizadas plantas matrizes de diferentes origens, de forma a representar a variabilidade genética da espécie. As plantas foram doadas a partir de propriedades particulares localizadas em Magé (GPS: 22°64'32.18"S e 43°12'22.26"O elev 13 m), Marechal Hermes (GPS 22°51'24.46"S e 43°22'13.75"O elev 17 m) e Niterói (GPS: 22°53'55.95"S e 43°05'09.37"O elev 54 m), além de exemplares obtidos no Horto Botânico da UERJ (Vila Isabel - GPS: 22°54'57.57"S e 43°14'18.54"O elev 22m). As plantas foram envasadas e mantidas no telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, sendo utilizadas como doadoras de explantes para a cultura *in vitro* (Figura 2).

Alternativamente, plantas *in vitro*, cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Aparecida Cristina Moura (Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro) (HRJ 10.371) e mantidas sob condições de crescimento ativo por cinco anos, foram utilizadas como doadoras de explantes para os experimentos iniciais e estabelecimento dos padrões.



Figura 2 - Aspecto fenotípico das plantas de *P. alliacea* proveniente de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro.

Legenda: A – Niterói, B – Magé, C – Vila Isabel e D – Marechal Hermes. Barra = 1 cm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares.

### 3.1.2 Classificação:

A identificação foi realizada em colaboração com o Dr. Alexandre Gabriel Christo (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro), com base nas características morfológicas e reprodutivas, utilizando exemplares de cada amostra coletada, que foram depositados no Herbário do Rio de Janeiro (HRJ) sob os registros: Magé (HRJ 11.131), Marechal Hermes (HRJ 11.711), Niterói (HRJ 11.710) e Vila Isabel (HRJ 11.618).

## 3.2 **Cultura de tecidos vegetais**

### 3.2.1 Descontaminação

Inicialmente, visando o estabelecimento das culturas a partir das plantas selecionadas, vários protocolos de descontaminação previamente estabelecidos foram aplicados, utilizando-se diferentes substâncias químicas (NaOCl, HgCl<sub>2</sub>, Benlate<sup>®</sup>, PV Oral, Rifaldin, Agrimicina<sup>®</sup> e Etanol 70 %), variando-se a concentração e o tempo de exposição dos antimicrobianos (Soares, 2010). Foram utilizados explantes de segmentos nodais, independentemente de sua posição na planta matriz. Após a excisão, os explantes foram lavados com detergente 3 vezes e transferidos para soluções contendo NaOCl 0,5 % por 2 minutos, Etanol 70 % por 2 minutos, Benlate<sup>®</sup> a 1% por 15 minutos, sendo então tratados com os diferentes antimicrobianos testados. A seguir, os explantes foram transferidos para o fluxo laminar e lavados 3 vezes com água deionizada estéril, sendo então inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sem reguladores de crescimento (MS0), suplementado com Benlate<sup>®</sup> 0,04 g/L e Agrimicina<sup>®</sup> 300 mg/L (Molina *et al.*, 2005). O pH foi ajustado para 5.8 antes da esterilização, em autoclave (15 minutos a 121°C a 1 atm.). As amostras consistiram de 10 explantes por tratamento e os experimentos foram repetidos três vezes para cada população estudada.

### 3.2.2 Micropropagação

A seguir, para o estabelecimento das culturas primárias, os explantes de segmentos nodais (incluindo os apicais), de cada população estudada, foram inoculados em meio MS sem reguladores de crescimento (MS0). Essas culturas foram incubadas em câmaras de crescimento, à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa média de  $46 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria. Após 30 dias, o crescimento foi avaliado pela frequência de regeneração dos segmentos nodais. O enraizamento dos brotos foi avaliado após a primeira transferência para meio MS0 solidificado com agar a 0,7% e incubação nas condições descritas anteriormente.

Visando aumentar a quantidade de partes aéreas, ápices caulinares de plantas estabelecidas *in vitro* foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ; 13,32  $\mu\text{M}$  e 22,19  $\mu\text{M}$ ) de ANA (0,54  $\mu\text{M}$ ; 1,34  $\mu\text{M}$  e 2,23). Essas culturas foram incubadas nas mesmas condições descritas, sendo avaliadas pelo número de brotos formados por explante.

Os experimentos de multibrotação foram repetidos pelo menos duas vezes, utilizando-se grupos de dez explantes. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação Turkey-Kramer, com o auxílio do programa Graphpad InStat. Foram considerados significativos os valores com  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

### 3.2.3 Aclimatização

Para a aclimatização, as plantas com 8 cm de altura, e apresentando raízes com mais de 1cm de comprimento, foram transferidas das culturas para vasos contendo Plantmax®. Inicialmente, os vasos foram cobertos por filme plástico transparente e a cada 3 dias foram feitas aberturas para permitir a adaptação das plantas à redução da umidade relativa do ar. Os vasos foram mantidos em telado coberto por Sombrite® com redução de 50% da luz solar e a aclimatização foi avaliada por comparação visual com as plantas matrizes, 30 dias após a retirada total da cobertura plástica. Todos os experimentos foram realizados com amostras de dez explantes, em duas repetições.



### 3.3 Análise fitoquímica comparativa

#### 3.3.1 Preparo dos extratos

**Extrato aquoso** → foram preparados com folhas de plantas de campo e plantas *in vitro* através de infusão (aproximadamente 200g/L), após dessecação em estufa (60°C), sendo a concentração determinada com base no peso seco. As folhas rasuradas foram preparadas em água deionizada a 100° C, concentração de 10 mg/ml, e armazenada em erlenmeyer, protegido da luz. A seguir, a infusão foi mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente, sendo então filtrada com auxílio de papel de filtro e funil de vidro e estocada a baixa temperatura (- 18 °C).

**Extrato etanólico** → foi preparado com folhas e raízes de *Petiveria alliacea* L., frescas, de campo e *in vitro*. O material vegetal foi rasurado com auxílio de almofariz e pistilode porcelana e imersas em álcool etílico P.A. (Vetec), mantido em solução por três dias, e, em seguida, foi filtrado com auxílio de papel filtro (Whatman nº 1) e funil de vidro. Na sequência, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com leve aquecimento (até 40°C), e estocados em temperatura ambiente.

Extratos hexânico, etanólico, diclorometânico, metanólico, e acetato de etila → foram preparados com folhas de campo, sendo as folhas imersas nas soluções, em temperatura ambiente, e filtradas após 24 horas com auxílio de papel filtro e funil de vidro e estocadas a baixa temperatura (- 18 °C).

#### 3.3.2 Cromatografia em camada delgada (Thin-layer chromatography - TLC)

##### **Avaliação fitoquímica preliminar das populações:**

Os extratos aquosos das diferentes populações de *P. alliacea* (10 mg/ml) juntamente com os padrões utilizados (rutina, ácido pirogálico, quercetina e ácido clorogênico - Merck S.A., Brasil) foram aplicados em placas de TLC (3 x 8 cm) de Silica gel 60 (Macherey-Nagel, Alemanha), com auxílio de amostradores, a uma distância de 1 cm da margem inferior, marcada a lápis. Foram realizadas duas aplicações no mesmo ponto para fins de concentração da amostra e a placa foi seca à temperatura ambiente.

A cromatografia foi realizada em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente, utilizando como fase móvel a seguinte mistura de solventes: butanol/ etanol/ água/ ácido acético (60:10:20:0,5 v/v). Para verificar a presença de flavonóides, ao final da corrida, a placa foi seca e revelada com o reagente NP:PEG (NP - ácido difenilbórico aminoetiléster – “natural product” e PEG - polietileno glicol 400). A seguir, a placa foi aquecida na estufa (Estufa tipo 294, de Leo & Cia. Ltda., Brasil) por 3 minutos a 105°C e imediatamente revelada com NP:PEG - (NP) 0,5 g% em acetato de etila. Após secar a frio, a placa foi aspergida com (PEG) 5 g% em diclorometano e novamente aquecida por 3 minutos a 105°C. A fluorescência foi observada no comprimento de onda de 365 nm em câmara de UV (365nm e 254nm - Boitton- Pró-Análise, modelo BOIT-GAB01, Brasil) e posteriormente as placas foram fotografadas (Máquina fotográfica digital Sony DSC-H50, Sony, Brasil).

#### **Avaliação fitoquímica comparativa entre extratos etanólicos de plantas de campo e plantas *in vitro*.**

Os extratos etanólicos das diferentes populações de *P. allieacea* foram aplicados em cromatoplasmas de sílica Whatman (10x10 cm), 250 µM, com indicador de fluorescência UV de 254 nm. com auxílio de amostradores, a uma distância de 1 cm da margem inferior, marcada a lápis. Foram realizadas duas aplicações no mesmo ponto para fins de concentração da amostra e a placa foi seca à temperatura ambiente.

A cromatografia, com extratos etanólicos, foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente, utilizando-se inicialmente, como fase móvel, a seguinte proporção na mistura de solventes de eluição: acetato de etila (100); acetato de etila – metanol (1:1); metanol (100).

Em testes posteriores, os extratos etanólicos foram diluídos em 1 ml, aproximadamente, de metanol e utilizados nas seguintes proporções nos sistemas de eluição: metanol (100); diclorometano - metanol (25:75); metanol – acetato de etila (75:25); diclorometano – metanol (50:50); metanol – acetato de etila (1:1); acetato de etila (100); acetato de etila – metanol (75:25) e acetato de etila – acetona – água (25:5:2).

A revelação das cromatoplasmas foi obtida com ácido sulfúrico P.A. sob radiação UV.

### 3.3.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGMS)

Os extratos do material produzido nas culturas foram utilizados para a pesquisa e quantificação de Dibenzil trissulfeto nas amostras, por comparação com o tempo de retenção de DTS comercial (Sigma-Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA) da curva padrão.

A análise foi realizada por cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas (GC MS). Diferentes extratos: etanólico, diclorometânico, hexânico, metanólico, e acetato de etila, foram utilizados para se estabelecer o melhor método para detecção de DTS (Dibenzil trissulfeto). Os componentes voláteis foram submetidos à análise em cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas GC MS-QP2010 (Shimatzu, Japão), equipado com coluna capilar RTX-5ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek, USA). A programação do forno foi iniciada a 80°C com a taxa de 10 °C por minuto até 300 °C permanecendo a esta temperatura por 12 minutos. Empregou-se Hélio como gás de arraste, com vazão constante de 1,52 mL min<sup>-1</sup>, injeção em modo split de 1:10 a 230 °C. A quantificação relativa dos componentes foi determinada por detector de impacto eletrônico calibrado a 0,70 kV a temperatura de 300 °C, modo TIC de aquisição com scan de 0,50 segundos de 40 a 600 m/z.

## 3.4 **Avaliação da potencialidade genotóxica/antigenotóxica**

### 3.4.1 Extração de DNA plasmidial

Culturas de *Escherichia coli* DH5αF'IQ, utilizada como hospedeira do plasmídeo pUC 9.1 foram cedidas pelo Laboratório de Radio e Fotobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Esta cepa bacteriana apresenta genótipo deficiente no gene *rec* e proficiente no gene de resistência à canamicina (Guedes *et al.*, 2006). Além disso, o DNA plasmidial pUC 9.1 possui 2695 pares de bases e apresenta resistência genética também à ampicilina (Sambrook *et al.*, 1989).

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque em glicerol foi semeada, por esgotamento, em meio de cultura Luria Broth (meio LB) sólido, com ampicilina a 50µg/mL e canamicina a 10µg/mL, e incubada overnight, a 37°C, de modo a obter colônias isoladas. Uma dessas colônias foi selecionada e com auxílio de alça de inoculação foi repicada em meio LB líquido, com a mesma concentração de antibióticos existente no meio sólido, incubada a 37°C, por 16-18 horas, sob agitação (160 rpm), a fim de se obter culturas na fase estacionária de crescimento.

O DNA plasmidial pUC 9.1 foi extraído utilizando *kit* para extração plasmidial da Invitex (*Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two*). A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro, sob luz ultravioleta, com leitura em comprimento de onda de 260nm (uma unidade de densidade ótica, em 260nm, corresponde a 50µg/mL DNA). O DNA plasmidial obtido, quando não utilizado era estocado a -20°C, por, no máximo, uma semana.

### 3.4.2 Tratamentos com os extratos aquosos

#### 3.4.2.1 Avaliação do potencial genotóxico

Para avaliar a potencialidade genotóxica dos extratos aquosos de *P. alliacea* L., soluções contendo 100 ng de DNA plasmidial pUC 9.1 foram tratadas com os extratos vegetais das plantas de campo e plantas *in vitro* das populações estudadas, em diferentes concentrações:

Inicialmente foram realizados experimentos preliminares em que o DNA plasmidial foi tratado com extratos de plantas *in vitro*, mantidas há 5 anos sob crescimento ativo. Em seguida, utilizou-se diferentes concentrações (0,048 mg/ml – 0,024 mg/ml – 0,012 mg/ml) de extratos de plantas de campo (Niterói) para comparação dos perfis eletroforéticos e avaliação dos efeitos induzidos.

Posteriormente, alíquotas da solução de DNA plasmidial (100 ng) foram tratadas com concentrações crescentes do extrato aquoso aquoso (1,0 – 5,0 – 10,0 mg/mL) de *P. alliacea* L. *in vitro* ou de campo, provenientes das diferentes populações estudadas.

#### 3.4.2.2 Avaliação do potencial antigenotóxico

A potencialidade antigenotóxica dos extratos aquosos de *P. alliacea* L. foi avaliada, inicialmente, a partir de soluções contendo 100 ng de DNA plasmidial pUC 9.1, tratadas com cloreto estanoso a 1,11 mM (controle positivo), e com diferentes concentrações (0,048 mg/ml – 0,024 mg/ml – 0,012 mg/ml) dos extratos vegetais das plantas de campo (Niterói) e das plantas mantidas *in vitro* por 5 anos, em conjunto com o cloreto estanoso (1,11 mM).

Em ensaios posteriores, para confirmar a potencialidade antigenotóxica do extrato aquoso de *P. alliacea* L., o plasmídeo pUC 9.1 (100 ng) foi tratado com cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>) 1,11 mM e com diferentes concentrações (1,0 – 5,0 – 10,0 mg/ml) dos extratos vegetais de plantas de campo e plantas *in vitro* das populações estudadas.

### 3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Todas as reações foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e, ao final desse tempo, alíquotas de cada amostra (10  $\mu$ L) foram aplicadas em gel de agarose a 0,8%. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal, em tampão TBE 1X, com voltagem de 5,35 V/cm, por aproximadamente 45 minutos, até que ocorresse a separação das bandas.

Os géis foram, então, corados com solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL), e visualizados em sistema de transiluminação (Transiluminador UV LTA/LTB), sendo as imagens dos géis obtidas com o Sistema de Captura de Imagem L-PIX-ST - Loccus Biotecnologia. A seguir, os perfis eletroforéticos das amostras foram comparados visualmente.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cultura de tecidos vegetais

#### 4.1.1. Caracterização botânica

A classificação como *Petiveria alliacea* L. das plantas oriundas das regiões estudadas, realizada previamente (SOARES, 2010), foi confirmada com base nas características morfológicas das folhas, inflorescências, flores e frutos, além do porte herbáceo e odor alíaceo, de acordo com Udultschu (2007).

As características consideradas foram:

Folhas → alternas, estípulas reduzidas e pecioladas, membranáceas, nervação braquidódroma.

Inflorescência → racemosa, terminal ou axilar, ereta ou nutante.

Flores → alvas, bissexuadas, actinomorfas, subsésseis, perigônio tetrâmero, membranáceo, glabro, tépalas fusionadas na base, persistentes e eretas no fruto, estames inseridos em disco carnosos, filetes filiformes desiguais, mais curtos que as tépalas, anteras sagitadas ou cilíndricas, ovário carpelar, lateralmente comprimido, tormentoso, estilete ausente, estigma séssil, penicelado e cerdas apicais (4), subuladas, deflexas (Figura 3A).

Frutos → tipo aquênio, pericarpo coriáceo aderido à semente, sementes eretas, lineares, lateralmente comprimidas, testa membranácea, apresentando 4 cerdas apicais, subuladas, deflexas, utilizadas para a identificação da variedade nesse trabalho, caracterizando a variedade *alliacea*. (Figura 3B)

Apesar de não serem identificadas como variedade distinta, as plantas de Magé foram avaliadas em relação às mesmas características e apresentaram uma morfologia foliar variante em relação às demais, pois as folhas eram visivelmente mais finas, variegadas e com a bainha levemente ondulada (Figura 4D)



Figura 3 - A – Flor bissexuada com simetria actinomórfica e perigônio tetrâmero (X 23), B – Fruto, (seta) apresentando 4 cerdas apicais (9X 15).  
Foto: Bianka de Oliveira Soares.

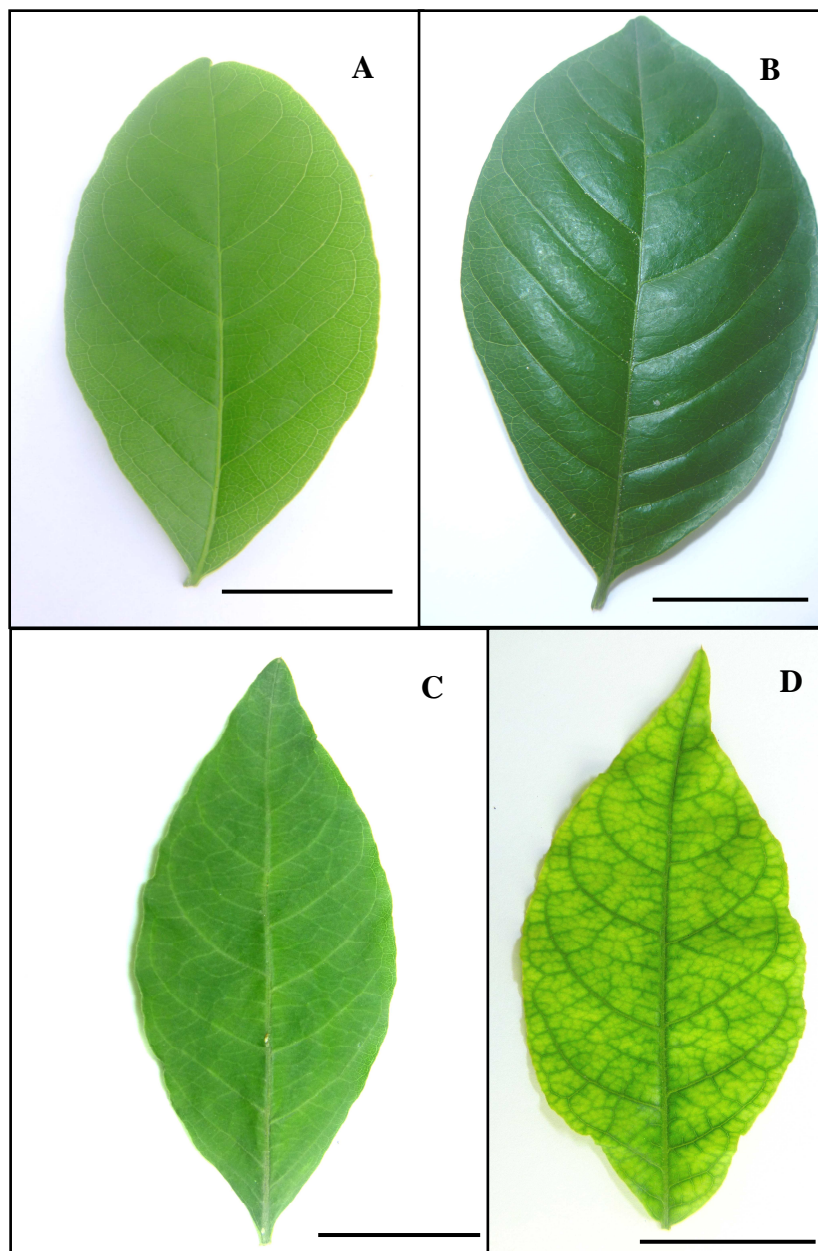


Figura 4 - Morfologia foliar de *P. alliacea* L. coletada em diferentes locais.

Legenda: A – Marechal Hermes (oblonga), B – Niterói e C – Vila Isabel (elíptica com borda lisa) e D – Magé (Elíptica com borda ondulada e coloração variegada). Barra = 1 cm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares



#### 4.1.2 Micropropagação

A primeira etapa no estabelecimento da cultura foi a descontaminação dos explantes (segmentos nodais) e o protocolo com o maior percentual de sobrevivência foi determinado após tratamento com etanol 70% por 2 minutos, NaOCl 0.5% por 5 minutos, Benlate<sup>®</sup> 1%, agrimicina 1%, durante 15 minutos, tendo sido obtida uma taxa de 60% de descontaminação Tabela 1.

Os segmentos nodais foram inoculados em meio MS0 suplementado com Benlate<sup>®</sup> 0,04 g/L e agrimicina 300 mg/L, durante uma semana, em seguida os explantes foram transferidos para meio MS0 sem antimicrobianos, dando origem a brotos livres de patógenos, três semanas após o início da cultura (Figura 5). Os segmentos nodais cultivados em MS0 desenvolveram a parte aérea a partir das gemas axilares. Nesse meio, o enraizamento dos brotos foi obtido com frequência de 70%, após seis semanas (Figura 6 A), caracterizando as culturas primárias. As plantas in vitro originárias da região de Marechal Hermes apresentaram dificuldades no desenvolvimento radicular, mesmo em presença de fitorreguladores.

A partir desse material, foram realizadas subculturas mensais utilizando-se como explante os segmentos nodais das plantas das culturas primárias, independentemente de sua posição na planta. Exceto por contaminação eventual, esses explantes apresentaram frequências de regeneração de 90-100%, por desenvolvimento meristemático, em todas as populações estudadas. Todavia, as plantas apresentaram um desenvolvimento lento atingindo de 5-6 cm de altura e apresentando cerca de 3-4 segmentos a cada intervalo de 30 dias. Dessa forma, cada planta primária, obtida in vitro pode originar, potencialmente 3-4 novas plantas perfazendo um total de 39 plantas ao final de três ciclos de cultura. As plantas aclimatizadas apresentaram taxa de sobrevivência de 80% e com características morfológicas semelhantes às das plantas de campo (Figura 6B).

Visando o preparo dos extratos para estudos fitoquímicos e farmacológicos, que exigem quantidades determinadas de material, tornou-se necessário aumentar a produção de partes aéreas. Por essa razão, foi também estabelecido um protocolo com base na combinação de citocinina (BAP) com auxina (ANA).

Os experimentos preliminares utilizando ápices caulinares de plantas *in vitro* mantidas em crescimento ativo há cinco anos, que foram inoculados em diferentes concentrações e combinações desses fitorreguladores, produziram brotos múltiplos em frequências variáveis em todas as condições testadas. Entretanto, a melhor resposta foi obtida na concentração de BAP 13,32  $\mu\text{M}$  + 0,54  $\mu\text{M}$  ANA com  $8,5 \pm 2,3$  brotos por explante (Figura 7A), aumentando significativamente a quantidade de plantas *in vitro* (Tabela 2).

A melhor condição definida nesses experimentos foi utilizada com explantes das culturas estabelecidas a partir de matrizes oriundas de diferentes locais do RJ (Magé, Niterói, Mal.Hermes e Vila Isabel). Entretanto a frequência obtida na multibrotação foi significativamente mais baixa. Estes experimentos foram repetidos para avaliação da resposta frente às concentrações e combinações utilizadas anteriormente e as frequências se mantiveram baixas (Tabela 3).

Tabela 1 - Frequência de descontaminação na cultura de segmentos nodais inoculados após os tratamentos com diferentes substâncias antimicrobianas

Substâncias antimicrobianas	Tempo (minutos)	Frequência (%)
Rifaldin (20 µl – 20 ml)	2	0
	5	0
	10	0
	15	5
Rifaldin (1 ml – 100 ml)	5	0
	10	10
	15	20
PV Oral (1 ml – 100 ml)	5	0
	10	0
	15	0
HgCl <sub>2</sub> 0,05 %	5	0
	10	0
	15	0
HgCl <sub>2</sub> 1 %	5	0
	10	5
	15	15
Agrimicina <sup>®</sup> 1%	5	10
	10	40
	15	60

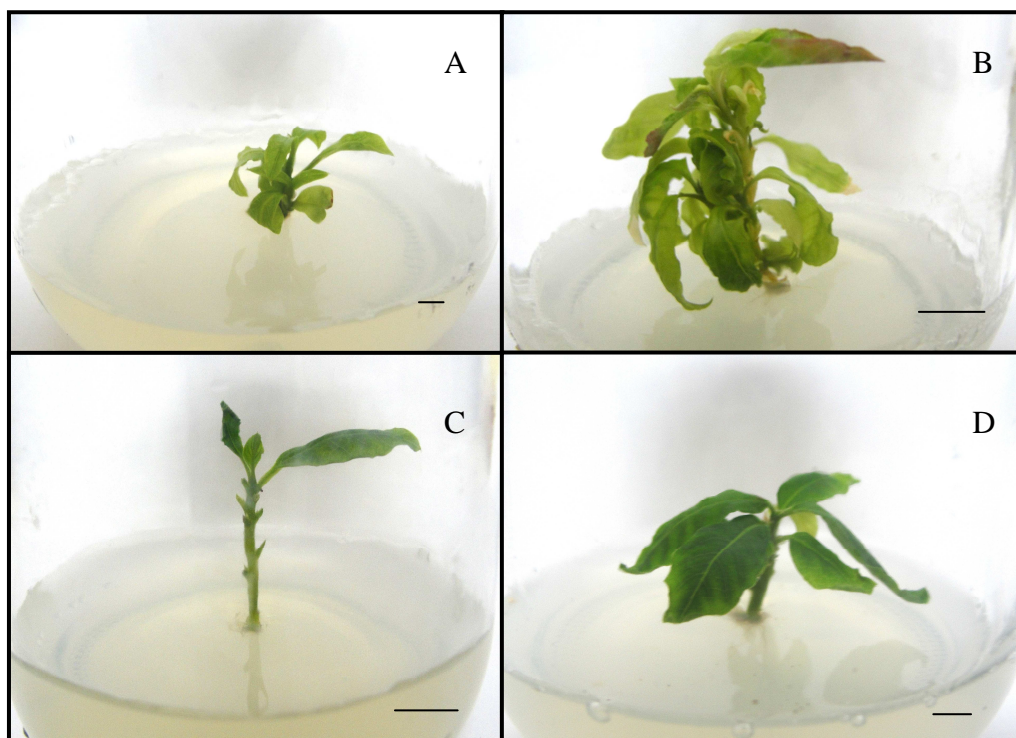


Figura 5 - Plantas de *P. alliaceae* L. após estabelecimento da cultura *in vitro* a partir de matrizes de diferentes origens.

Legenda: A- Marechal Hermes, B- Magé, C- Niterói e D- Vila Isabel.  
Barra = 1 cm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

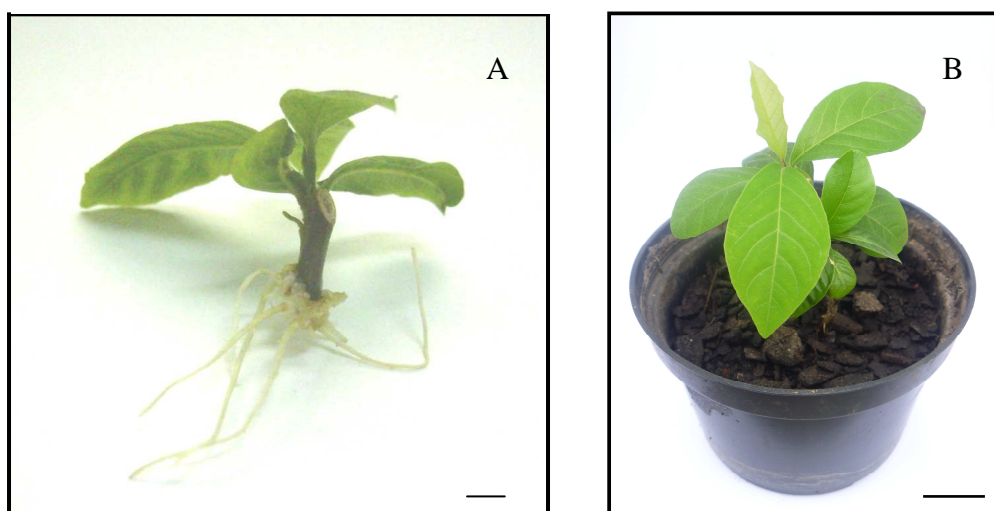


Figura 6 - Aclimatização de *P. alliaceae* L.

Legenda: A - Planta enraizada *in vitro*. B- Planta aclimatizada após 60 dias no telado. Barra = 1 cm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

Tabela 2 - Avaliação da regeneração de ápices caulinares de *P. alliacea* L. e em presença de diferentes combinações de BAP e ANA

BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Nº. de brotos/explante*	Tamanho dos brotos (cm)*	Nº. de Folhas*
4,4	-	5,8 $\pm$ 0,7 <sup>a,b,c</sup>	0,7 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
13,32	-	6,7 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0	3,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
22,19	-	3,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0	3,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
-	0,54	1 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
-	1,34	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,9 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
-	2,23	1 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0,9 $\pm$ 0	4,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
	0,54	6,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0	2,6 $\pm$ 0,1 <sup>a, b</sup>
4,4	1,34	2,8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,3 <sup>a, b</sup>
	2,23	1,9 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	0,8 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	0,54	8,5 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0	3,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
13,32	1,34	4,1 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,2 <sup>a,b</sup>
	2,23	2,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	0,54	6,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,2 <sup>a, b</sup>
22,19	1,34	4,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	2,23	2,1 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>

\*Os valores correspondem á média  $\pm$  desvio padrão de 30 determinações. Médias seguidas pela mesma letra indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores nas colunas.

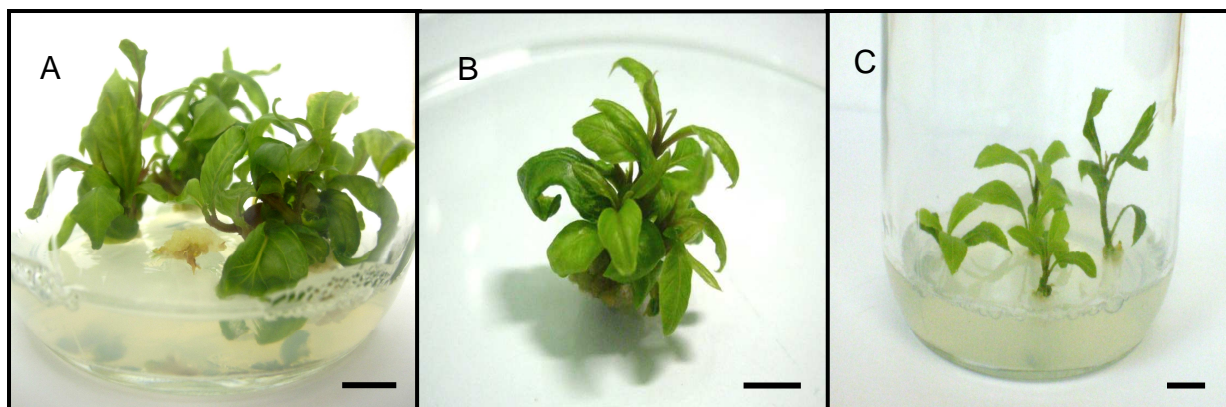


Figura 7 – Multiplicação *in vitro* de *Petiveria alliacea* L, brotos obtidos a partir e explantes apicais cultivados em meio MS suplementado com A - BAP 13,32  $\mu$ M + ANA 0,54  $\mu$ M; B - BAP 13,32  $\mu$ M + ANA 1,34  $\mu$ M; C - ANA 0,54  $\mu$ M. Barra = 1 cm.

Foto: Bianka de Oliveira Soares

Tabela 3 - Avaliação da regeneração de ápices caulinares excisados de plantas coletadas em diferentes locais e inoculados em uma combinação de BAP 13,32  $\mu$ M e ANA 0,54  $\mu$ M.

Origem das plantas	Frequência de regeneração (%)	Nº. de brotos/explante	Tamanho dos brotos (cm)	Nº. de folhas
Marechal Hermes	100	5,5	0,6	3,4
Vila Isabel	100	3,0	0,83	4,0
Niterói	100	3,5	0,51	3,8
Magé	100	2,2	0,33	3,9

## 4.2 Análise fitoquímica

### 4.2.1 Cromatografia em camada delgada

Avaliação fitoquímica das populações de campo:

Os padrões utilizados na avaliação cromatográfica por TLC (rutina, ácido pirogálico, quercetina e ácido clorogênico) forneceram os perfis apresentados na figura 8.

A reação com os extratos aquosos de *P. allieacea* analisados mostrou que na fase móvel butano/etanol/água/ácido acético (60:10:20:0,5 v/v), a separação foi eficiente com formação de bandas amarelas, o que, segundo Wagner e Bladt (1995), sugere a presença de flavonóides (Figura 9).

Na tabela 4 estão representados os fatores de relação ( $R_f$ ) das bandas reveladas nas placas. Define-se  $R_f$ , como a razão entre a distância percorrida na placa pela substância e a distância percorrida pelo solvente. Contudo, para fins de identificação de uma substância o solvente escolhido para eluição deve carrear o composto a um  $R_f$  sempre entre zero e um. Além disso, como substâncias diversas podem ter o mesmo valor de  $R_f$ , métodos adicionais devem ser utilizados para identificação das substâncias (Degani et al, 1998).

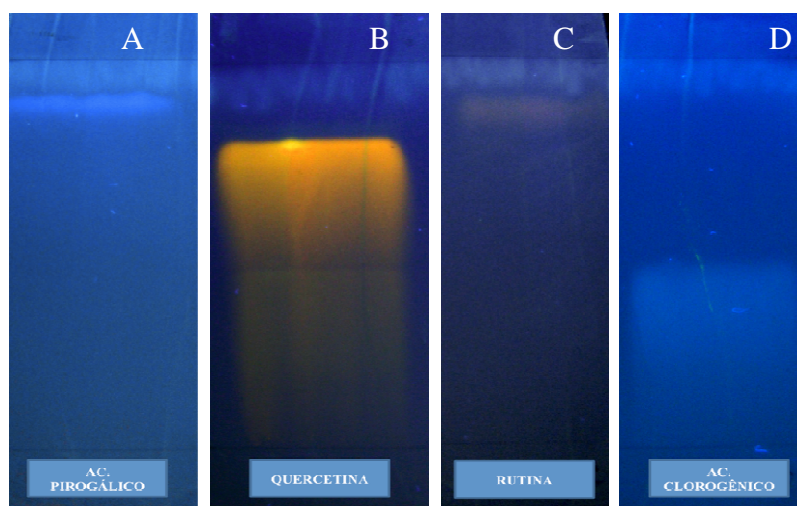


Figura 8 – Cromatografia das amostras padrão

Legenda: (A) ácido pirogálico, (B) quercetina, (C) rutina e (D) ácido clorogênico. Placa de TLC em sílica gel 60 com 3 x 8 cm, utilizando como solvente a fase móvel: butanol/ etanol/ água/ ácido acético (60:10:20:0,5 v/v).

Nota: Cromatogramas revelados com NP:PEG e visualizados sob luz UV a 365 nm.

Foto: Daniele Corrêa Fernandes.



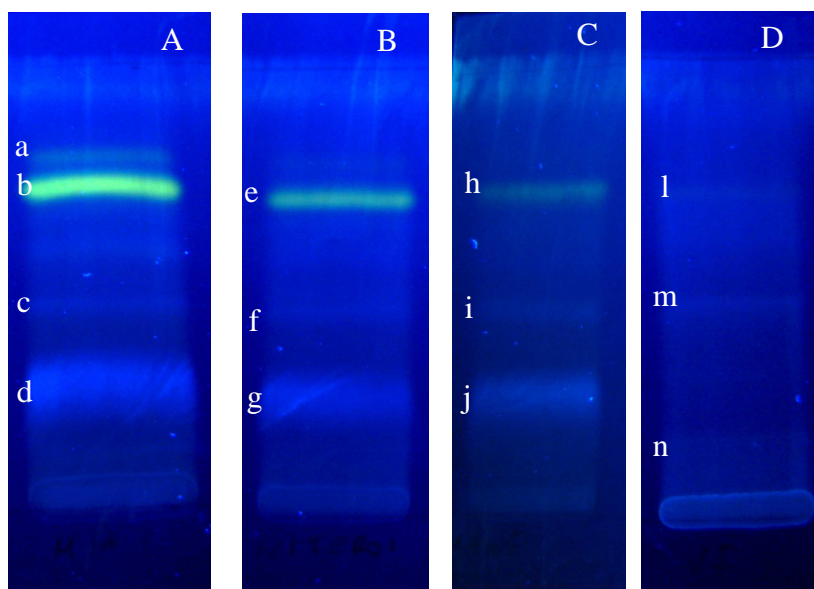


Figura 9 - Cromatografia do extrato aquoso de *Petiveria alliacea* L. em camada delgada (TLC) revelada para flavonóides.

Legenda: (A) Marechal Hermes; (B) Niterói; (C) Magé e (D) Vila Isabel. Cromatogramas revelados com NP:PEG e visualizados sob luz UV a 365 nm.

Nota: Todas as cromatografias realizadas em placas de sílica gel 60 de 3x8 cm e fase móvel: butanol/ etanol/ água/ ácido acético (60:10:20:0,5 v/v).

Foto: Daniele Corrêa Fernandes.

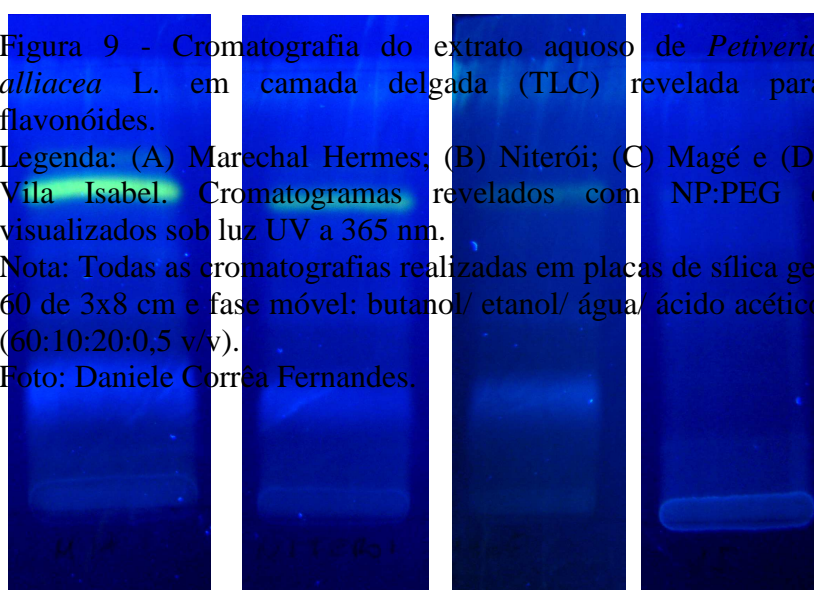




Tabela 4 - Valores de R<sub>f</sub> das diferentes amostras de *Petiveria alliacea* obtidas por TLC

Bandas	Rf (cm)
Ácido pirogálico	0,90
Quercetina	0,94
Rutina	0,85
Ácido clorogênico	0,58
a	0,76
b	0,75
c	0,64
d	0,25
e	0,70
f	0,50
g	0,25
h	0,71
i	0,51
j	0,23
l	0,70
m	0,41
n	0,11

***Avaliação fitoquímica comparativa entre extratos etanólicos de plantas de campo e plantas in vitro:***

Foram utilizados extratos etanólicos das folhas e raízes de plantas de campo e *in vitro* de todas as populações. Extratos de raízes apresentaram cor amarelada e odor vináceo, enquanto os extratos das partes aéreas de plantas de campo e *in vitro* apresentaram coloração verde escura e verde clara, respectivamente. Diferentes sistemas de eluição foram testados para análise por TLC. Os três primeiros sistemas testados para os extratos etanólicos não permitiram a separação nítida das bandas, sendo então crucial a secagem total do material vegetal e a eluição com metanol como sugerido por Castellar (2006).

Os sistemas que apresentaram os melhores resultados, quanto à separação das substâncias foram: acetato de etila (100) e o acetato de etila:acetona:água (25:8:2). O padrão DTS foi utilizado nos diferentes sistemas de eluição, não sendo possível a sua visualização (Figura 10 A e B)

Apos a corrida com os eluentes selecionados, diversas substâncias foram visualizadas em câmara UV, apresentando as colorações: laranja, vermelho, lilás, amarelo, castanho, azul fluorescente, verde limão e roxo, demonstrando a grande diversidade química presente na espécie. A cor amarelada foi a que mais se destacou, sugerindo a presença de carotenóides (dados não mostrados).

Apos a revelação com ácido sulfúrico P.A, algumas cores, visualizadas anteriormente sob UV, não foram reveladas, indicando a necessidade de se otimizar o método de revelação. Após a revelação, a cor amarela, observada sob UV, tornou-se roxa, sugerindo a presença de terpenos nas amostras testadas. No sistema de eluição acetato de etila (100) o roxo tornou-se amarelo – alaranjado, sugerindo a presença de flavonóides nas amostras: folha *in vitro* de Vila Isabel, raiz campo Vila Isabel, raiz campo Marechal Hermes, folha *in vitro* de Magé, raiz campo de Magé e raiz *in vitro* de Magé (figura 11 A).

Além disso, o sistema de eluição acetato de etila (100) permitiu a visualização de terpenos (banda roxa correspondendo ao Rf 0,25). Essa banda foi observada em todas as amostras exceto nos extratos de folhas e raízes das plantas de campo e *in vitro* oriundas de Niterói, extratos de raízes *in vitro* das plantas oriundas de Magé e extratos de raízes de plantas de campo e *in vitro* oriundas de Vila Isabel (Figura 11 A).

Quando o sistema acetato de etila: acetona: água (25:8:2) foi utilizado, a mesma substância roxa observada no sistema de eluição anterior, agora em Rf 0,6. A diferença nos Rf's ocorre devido à diferença de polaridade dos sistemas de eluição. Este sistema de eluição (acetato de etila: acetona: água) permitiu uma separação melhor das substâncias, reproduzindo as bandas vistas anteriormente e aquelas que não haviam sido visualizadas: extratos de folhas (campo e *in vitro*) e raízes (campo) de Niterói, extrato de raízes (campo) de Vila Isabel. Esses resultados foram uniformes entre as amostras de campo e *in vitro* de cada região estudada (figura 11 B). Além dessas foram visualizadas outras substâncias não identificadas, com Rf mais baixo (verde limão) quando visualizado com UV.

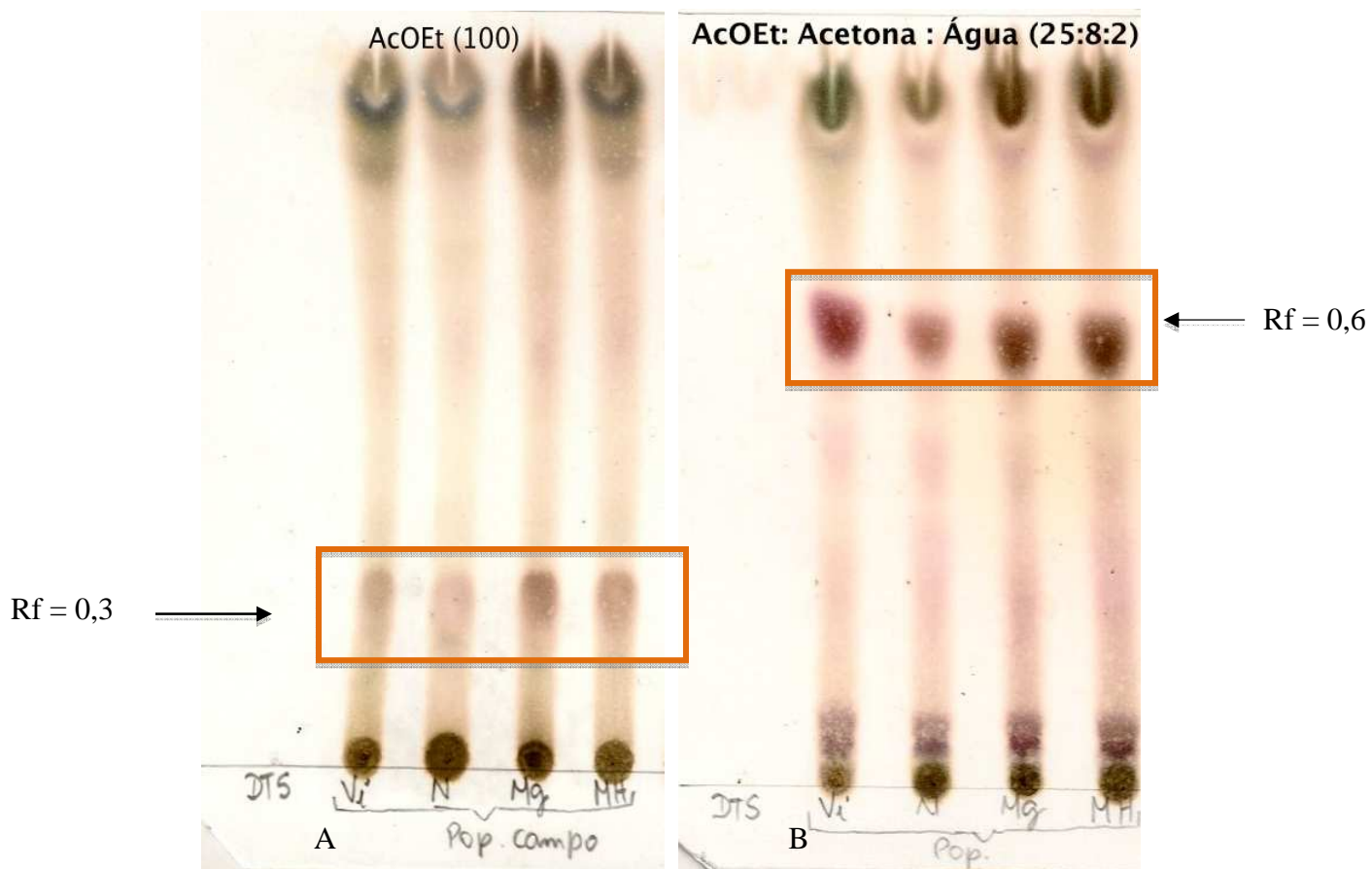


Figura 10 - Padrão DTS e extrato etanólico de plantas de campo. Fase móvel em (A) Acetato de Etila (100) e (B) Acetato de Etila: Acetona: Água (25:8:2). DTS (Dibenzil dissulfeto); Vi (Vila Isabel); N (Niterói); Mg (Magé) e MH ( Marechal Hermes).

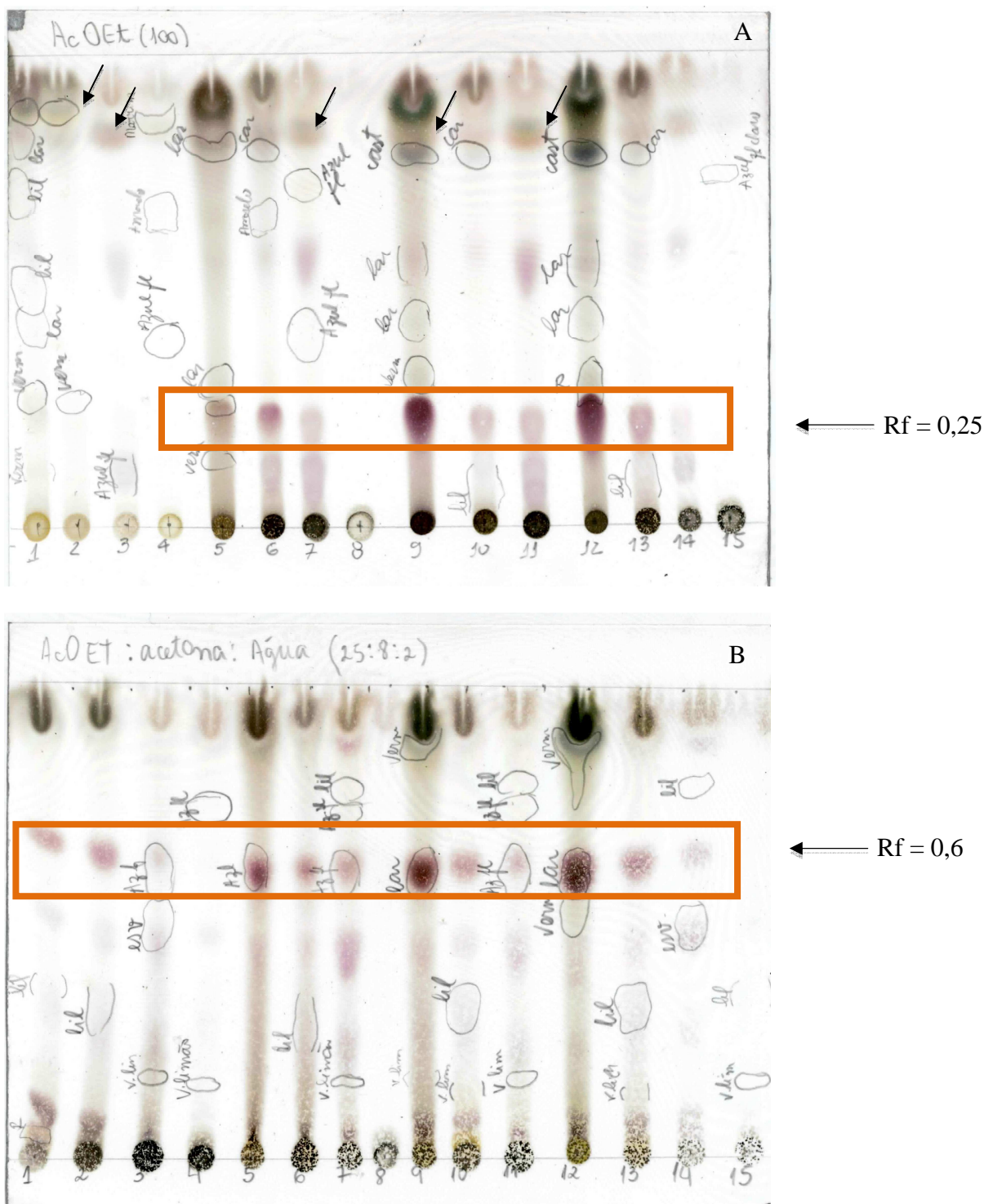


Figura 11 - Cromatografia do extrato etanólico de *Petiveria alliacea* em camada delgada (TLC) revelada com ácido sulfúrico.

Nota: Todas as cromatografias realizadas em placas de sílica Whatman (10x10) e fase móvel: A - Acetato de etila (100) e B - Acetato de etila/acetona/ água (25:8:2).

Legenda: 1- FcVI; 2- FiVI; 3- RcVI; 4- RiVI; 5- FcMH; 6- FiMH; 7- RcMH; 8- FcMg; 9- FiMg; 10- RcMg; 11- RiMg; 12- FcN; 13- FiN; 14- RcN; 15- RiN.

#### 4.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC MS)

Como mostrado na Tabela 5, através da comparação com o banco de dados NIST do GC MS foi possível sugerir a presença de fitol e vitamina E em todos os extratos de folhas de *P. alliacea* oriundas de Niterói (campo). Dibenzil trissulfeto (DTS) não foi detectado em nenhum dos materiais pesquisados, quando comparados ao padrão (Figura 12). Entretanto o dibenzil dissulfeto (DDS), foi identificado em todos os extratos, exceto em diclorometano (DCM) (figura 13 D). A substância, trans-esqualeno, foi identificada em todos os extratos, exceto metanol (Tabela 5). O solvente mais eficiente para a extração de compostos voláteis, distribuídos entre os tempos de retenção de 3 e 27 min, foi o metanol (figura 13 A).

Tabela 5- Dados obtidos do NIST do GC MS

Metanol	Etanol	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila
23 min	28 min	23 min	24 min	28 min
3,340	10,161	4,976	10,159	13,154 *
4,998	13,155 *	13,152 *	12,797	13,363 ▲
5,973	13,363 ▲	13,361 ▲	13,361 ▲	15,171
9,364	16,715	19,036 †	13,976	19,038 †
11,903	19,038 †	19,938	16,467	19,437
13,157 *	20,808	21,335 ▲	19,036 †	20,807
13,264	21,331 ▲	22,812	19,958	21,331 ▲
13,364 ▲	23,312		20,187	22,814
13,620	23,454		21,339 ▲	23,313
16,714	24,004		22,812	23,453
16,808	26,105		23,309	24,004
18,102			23,452	26,105
18,161			24,001	
18,258				
21,329 ▲				
22,813				
23,313				
23,453				
24,003				
26,109				

Nota: \*Dibenzil dissulfeto; ▲ fitol; ▲ vitamina E; † trans-esqualeno

Nos cromatogramas obtidos, a extração em metanol (Figura 13 A), assim como em hexano (Figura 13 C), permitiram a identificação dos picos de retenção correspondentes ao DDS, que se apresentaram com maior intensidade em relação aos demais solventes utilizados (Figura 13 B e E). Não foi possível detectar a presença de DDS na extração com diclorometano (Figura 13 D).

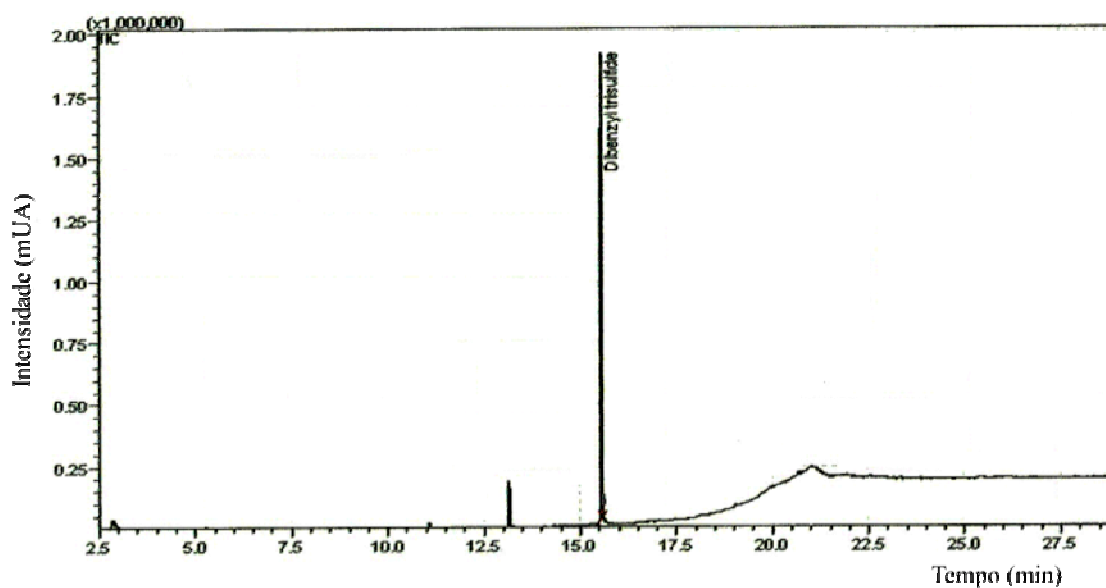


Figura 12 - Curva padrão do DTS - dibenzil trissulfeto.

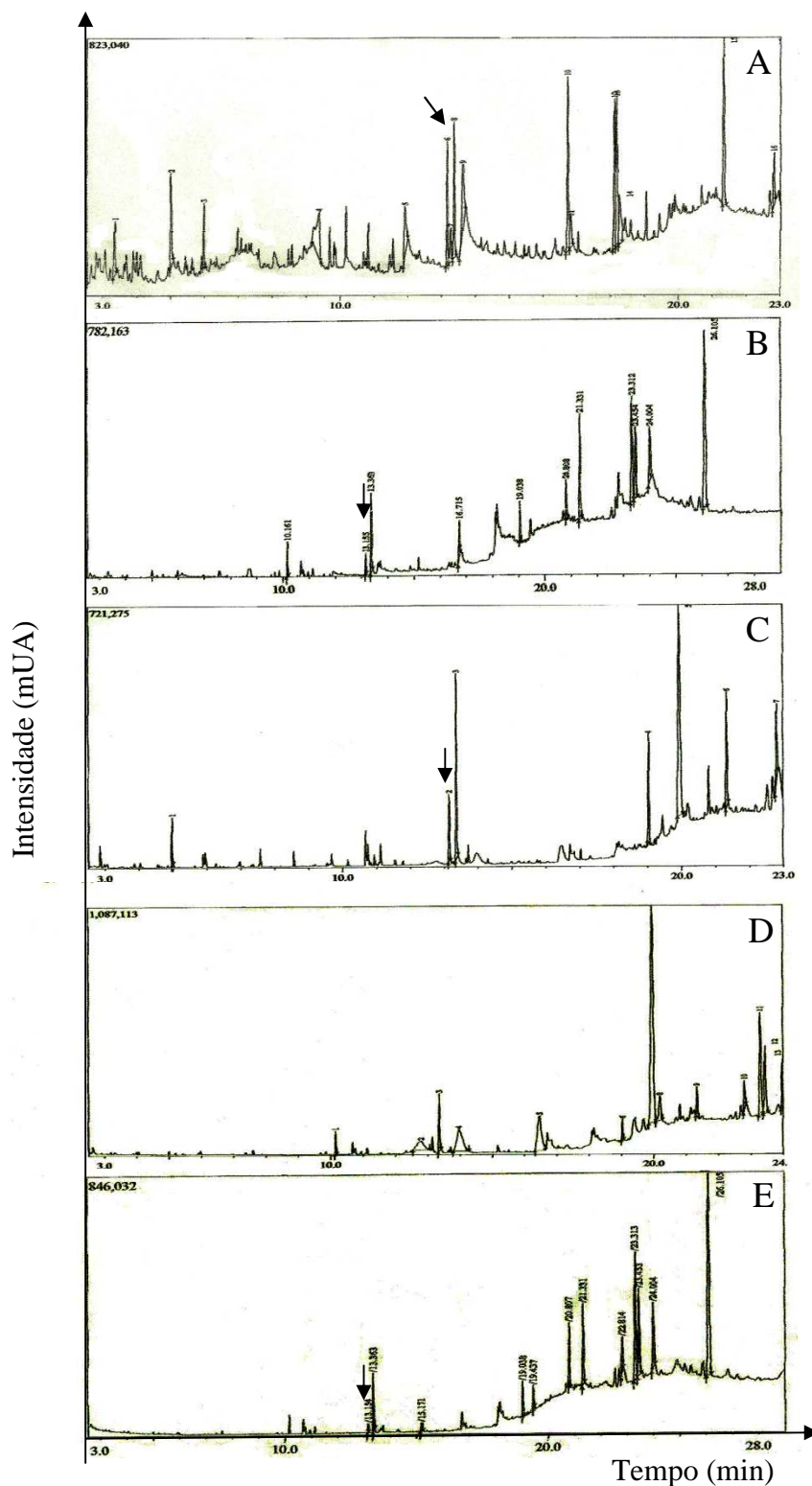


Figura 13 - Cromatogramas de diferentes extratos de folhas de campo (Niterói) de *Petiveria alliacea* obtidos por GC MS.

Legenda: A) metanol; B) etanol; C) n-hexano; D) diclorometano; E) acetato de etila. Foi utilizada uma coluna capilar Rester RTX – 5MS (30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25  $\mu$ m d.f.) e Hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,52 ml/min. Aplicados 5  $\mu$ l de cada amostra (0,05 mg/ml). As setas indicam os TR do DDS.

### 4.3 Avaliação da potencialidade genotóxica dos extratos

Os experimentos preliminares foram iniciados com o extrato aquoso de plantas de campo oriundas de Niterói e plantas *in vitro* mantidas em cultura há cinco anos, para padronizar a técnica.

Foi observado que após os tratamentos com os extratos, as moléculas de DNA plasmidial apresentaram conformações estruturais diversas, representadas pelos padrões característicos de bandas (superhelicoidizado, circular ou linear) (Figura 14). O uso do extrato aquoso de plantas de campo causou alterações na topologia do plasmídeo em todas as concentrações testadas inicialmente (maior concentração correspondendo ao maior número de lesões). Com o extrato aquoso de plantas *in vitro* (Figura 14 B) foi observado um perfil eletroforético semelhante, quando se considera a ação das diferentes concentrações do extrato, isto é, quanto maior a concentração do extrato, maior foi a quantidade de quebras produzidas.

A seguir, foram realizados experimentos com extratos de plantas de outras populações. Os resultados obtidos apontaram para variações dos perfis eletroforéticos, em função da região de coleta das plantas. O tratamento da solução plasmidial com extrato aquoso de plantas de campo promoveu lesões tipo quebra no DNA e levou à conversão do DNA íntegro (superhelicoidizado), caracterizado como Forma I, em DNA circular, caracterizado como Forma II e em DNA linear, caracterizado como Forma III (Quadro 6), entretanto esse efeito foi variável e dependente da concentração testada e da população utilizada.

Neste trabalho, embora o uso do extrato aquoso de plantas de campo (Niterói, Marechal Hermes e Magé), em concentrações mais elevadas, tenha causado alterações na topologia do plasmídeo, foi observado que nos extratos de plantas oriundas de Magé e Marechal Hermes não ocorreram lesões no DNA nas concentrações mais baixas (Figura 15 B e C). Por outro lado, nas concentrações mais elevadas continuou-se observando o aumento da resposta, em função da dose utilizada. Entretanto, nos extratos de plantas coletadas no Horto Botânico da UERJ (Vila Isabel) o efeito genotóxico não foi observado em nenhuma das concentrações testadas (Figura 15 D)



Adicionalmente, esses experimentos foram realizados com extratos das plantas *in vitro* de todas as origens (Figura 16) e todas as amostras testadas apresentaram ação genotóxica, inclusive os extratos das plantas *in vitro* oriundas do Horto Botânico da UERJ, reforçando a hipótese de que fatores genotípicos e/ou ambientais teriam influência na manifestação do efeito.

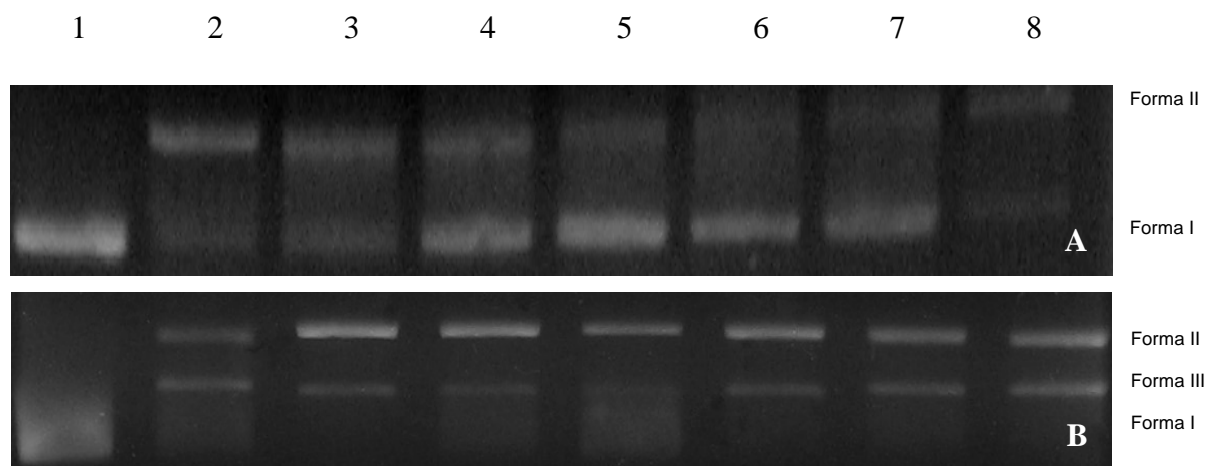


Figura 14 - A – Planta de Campo e B – planta *in vitro*. Alíquotas de plasmídeo pUC 9.1 (100 ng) foram incubadas por 60 min em temperatura ambiente, com diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. alliacea* em presença e ausência do  $\text{SnCl}_2$ .

Legenda: raia 1: controle (pUC 9.1); raia 2:  $\text{SnCl}_2$  (1.11 $\mu\text{M}$ ); raia 3: *P. alliacea* 0.048 mg/ml; raia 4: *P. alliacea* 0.024 mg/ml; raia 5: *P. alliacea* 0.012 mg/ml; raia 6: *P. alliacea* 0.048 mg/ml +  $\text{SnCl}_2$ ; raia 7: *P. alliacea* 0.024 mg/ml +  $\text{SnCl}_2$ ; raia 8: *P. alliacea* 0.012 mg/ml +  $\text{SnCl}_2$ .

Quadro 6 - Esquema das diferentes formas de lesão ocorrido no plasmídeo

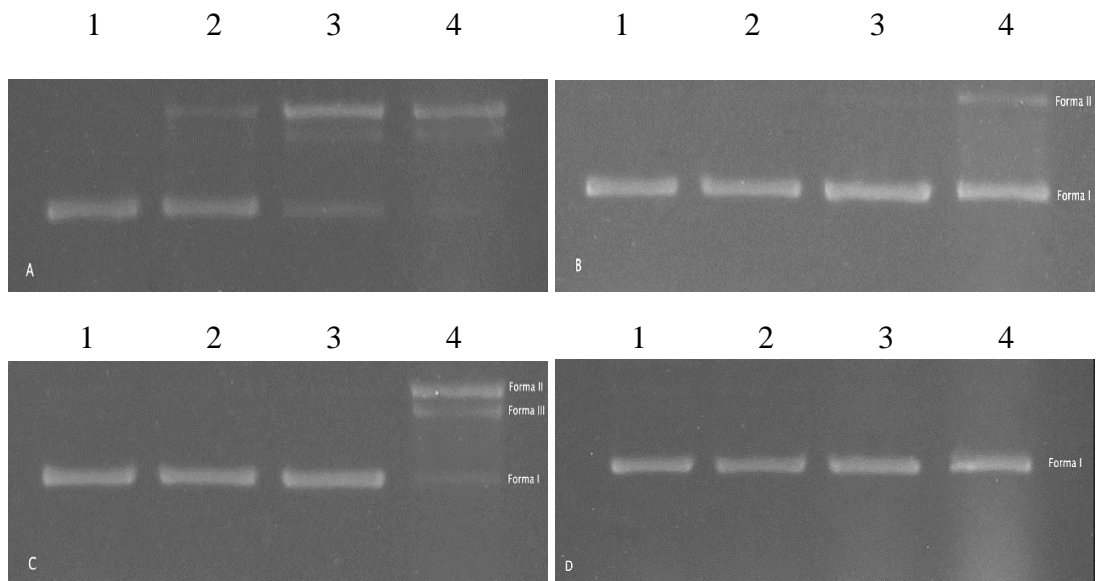
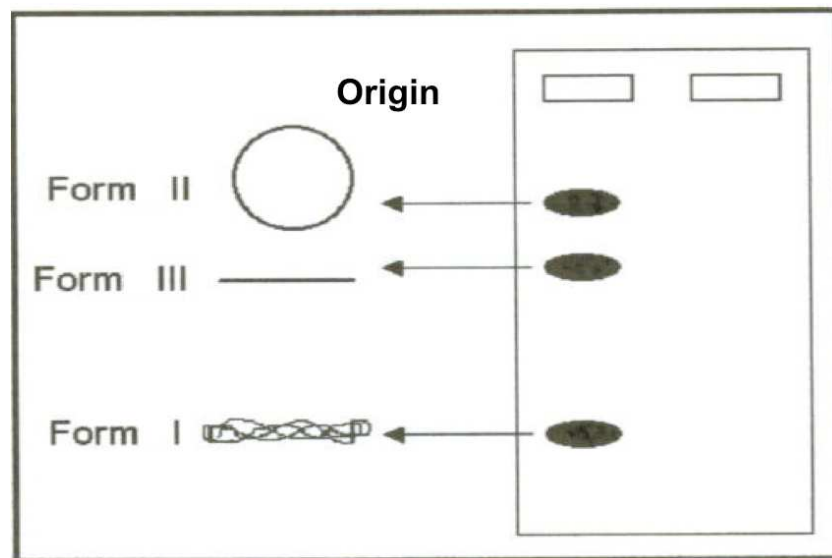


Figura 15 - Avaliação do efeito genotóxico de plantas de campo de *P. alliacea* L. coletadas em diferentes regiões do Rio de Janeiro.

Legenda: A – Niterói; B – Magé; C – Marechal Hermes e D - Vila Isabel.

Nota: Bandas correspondem a alíquotas da solução de DNA plasmidial (PUC 9.1 a 100 ng) tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas (0 – 1,0 – 5,0 – 10 mg/ml).

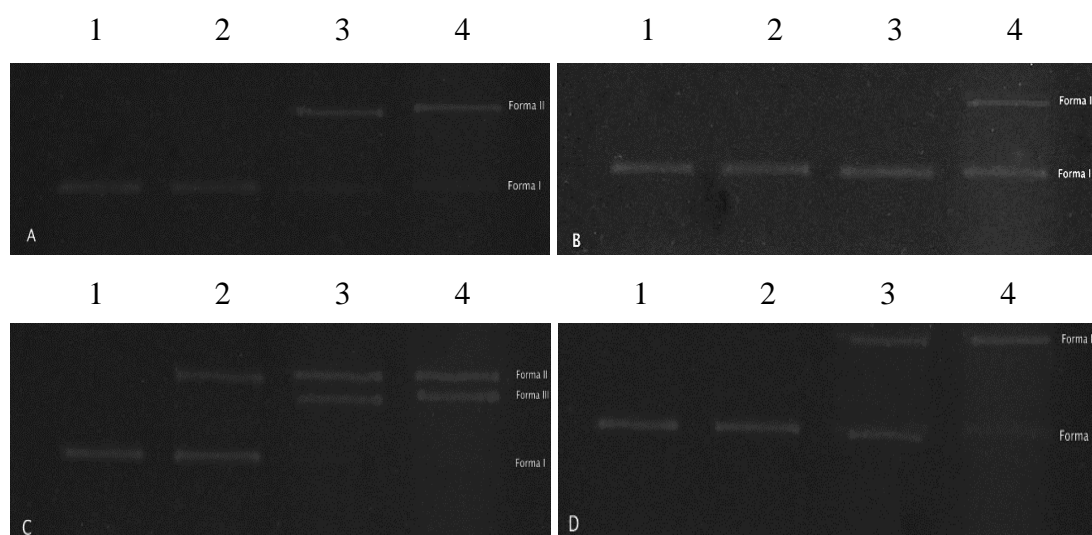


Figura 16 - Avaliação do efeito genotóxico de plantas *in vitro* de *P. alliacea* L. oriundas em diferentes regiões do Rio de Janeiro.

Legenda: A – Niterói; B – Magé; C – Marechal Hermes e D - Vila Isabel. Bandas correspondem a alíquotas da solução de DNA plasmidial (PUC 9.1 a 100 ng) tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas (0 – 1,0 – 5,0 – 10 mg/ml).

#### 4.4 Avaliação da potencialidade antigenotóxica dos extratos

A comparação dos perfis eletroforéticos também foi utilizada para fornecer indicações da potencialidade antigenotóxica, quando o DNA plasmidial foi tratado com o  $\text{SnCl}_2$ , concomitantemente, ao tratamento com o extrato em diferentes concentrações.

Neste modelo, o tratamento do plasmídeo pUC 9.1 com cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ), agente que promove lesões do tipo quebra no DNA, levou à conversão do DNA íntegro (superhelicoidizado), caracterizado como Forma I, em DNA circular, caracterizado como Forma II, sendo este padrão usado como controle positivo para essa forma de lesão, em uma determinada faixa de concentrações (Figura 17).

A proteção do DNA contra os efeitos lesivos do  $\text{SnCl}_2$  foi determinada por comparação dos perfis eletroforéticos. Quando os extratos de plantas coletadas em Niterói foram associados ao estanho, verificou-se um efeito protetor, diretamente proporcional à concentração utilizada de extrato (Figura 13 A). Como alterações da conformação plasmidial fornecem indicações seguras a respeito da integridade da molécula de DNA a modificação na posição da banda obtida, em relação ao DNA lesado pelo cloreto estanoso, indicou um efeito protetor do extrato. Esses resultados são sugestivos de um efeito antigenotóxico dose-dependente do extrato aquoso de planta de campo de *P.alliacea*.

Quando os extratos de plantas *in vitro*, mantidas há cinco anos em cultura, foram incubados com o cloreto estanoso, também se verificou o efeito antigenotóxico do extrato promovendo uma maior proteção quanto maior a concentração de extrato utilizada (Figura 13 B).

Embora a repetição dos experimentos com amostras de plantas de campo, utilizando-se concentrações mais elevadas dos extratos ainda não tenha possibilitado reprodução desse efeito, devido a problemas técnicos, os géis estão sendo refeitos para confirmação (Figura 17).

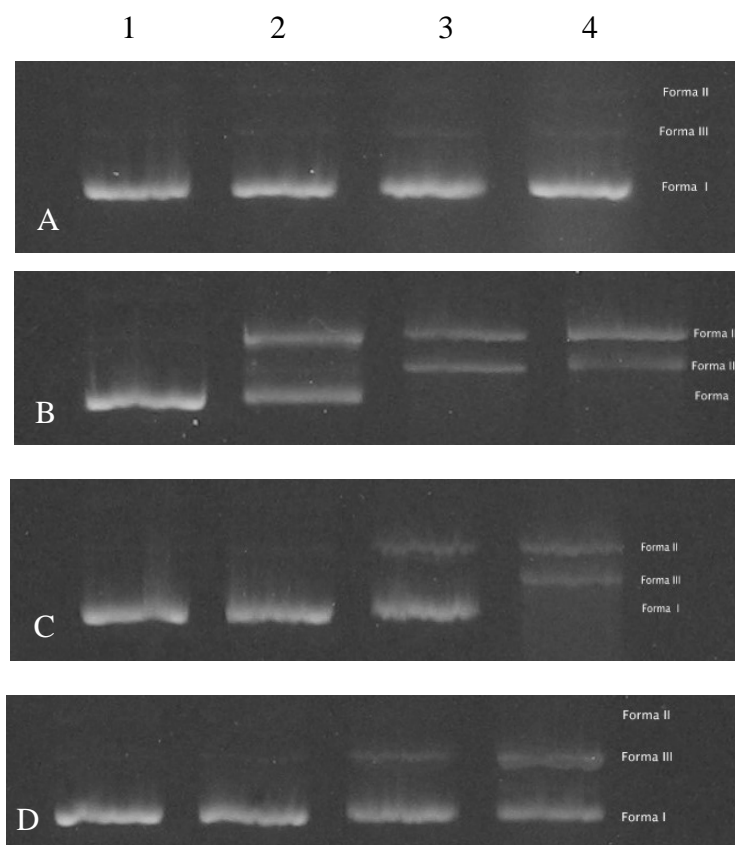


Figura 17 - Avaliação do efeito antígeno-tóxico de plantas de campo de *P. alliacea* L. coletadas em diferentes regiões do Rio de Janeiro.

Legenda: A – Vila Isabel; B – Niterói; C – Marechal Hermes e D - Vila Isabel.

Nota: Bandas correspondem a alíquotas da solução de DNA plasmidial (PUC 9.1 a 100 ng) tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas (0 – 1,0 – 5,0 – 10 mg/ml).

Foto: Bianka de Oliveira Soares

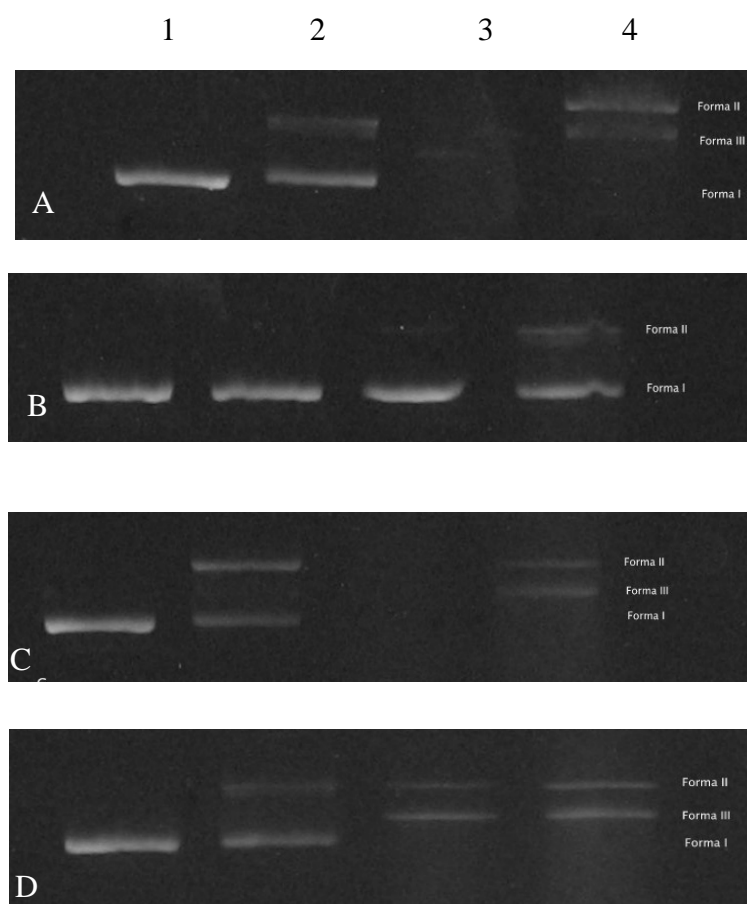


Figura 18 - Avaliação do efeito antigenotóxico de plantas *in vitro* de *P. alliacea* L. oriundas em diferentes regiões do Rio de Janeiro

Legenda: A – Niterói; B – Magé; C – Marechal Hermes e D - Vila Isabel.

Nota: Bandas correspondem a alíquotas da solução de DNA plasmidial (PUC 9.1 a 100 ng) tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas (0 – 1,0 – 5,0 – 10 mg/ml).

Foto: Bianka de Oliveira Soares

## 5 DISCUSSÃO

### Cultura de tecidos vegetais

Como constatado neste trabalho, muitas plantas possuem semelhanças ou diferenças morfológicas que só podem ser distinguidas por especialistas. A identificação taxonômica das plantas de diferentes origens utilizadas neste trabalho confirmou a identificação popular das amostras de todas as populações estudadas como guiné (*P. alliacea* L.). As controvérsias vigentes quanto à existência de táxons infra-específicos em *P. alliacea*, uma vez que alguns taxonomistas reconhecem duas ou mais variedades (UDULUTSCH *et al.*, 2007, MOBOT, 2010) e outros consideram a inexistência desses táxons (MARCHIORETTO, 2010), foram analisadas em trabalho anterior (SOARES, 2010). A caracterização taxonômica mostrou que apenas algumas características morfológicas são consideradas para essa distinção, como foi observado nesse trabalho em relação à morfologia foliar entre amostras de diferentes origens, não reconhecidas como variedades.

As amostras estudadas apresentaram várias diferenças morfológicas observadas sobretudo nas folhas das plantas oriundas de Magé. Essa constatação reforçou a necessidade de aprofundamento de estudos fitoquímicos e biológicos nas plantas matrizes para a cultura *in vitro*, de forma a identificar amostras com maior diversidade química para estabelecimento da cultura e permitir o desenvolvimento de métodos de monitoramento das plantas produzidas.

Em relação ao cultivo *in vitro*, a primeira etapa foi a descontaminação, fundamental para se iniciar a cultura de tecidos. A adição de Agrimicina® (300 mg/l) ao meio de cultura foi considerada fundamental para a obtenção de uma taxa significativa e reprodutível de descontaminação, confirmando trabalhos anteriores (SOARES, 2010). Vale ressaltar que esse antimicrobiano constitui uma combinação de várias substâncias utilizadas na agricultura, específicas contra microrganismos do solo e fitopatógenos, o que pode explicar o sucesso na descontaminação de diferentes espécies vegetais, nos últimos anos (HANDA *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2006; BOBROFF *et al.*, 2009).

A etapa da micropropagação através do estabelecimento das culturas primárias via amplificação meristemática foi obtida com sucesso a partir de segmentos nodais das plantas de campo, em concordância com muitos relatos que descrevem esse processo em diferentes espécies vegetais (GAGLIARDI et al., 2000; RANI et al., 2006). A multiplicação das células meristemáticas presentes nesse explante origina partes aéreas com maior garantia de fidelidade clonal nas plantas micropropagadas (AGNIHOTRI et al., 2009; SHARMA et al., 2009). Estes explantes também foram utilizados para a manutenção das plantas através das subculturas, a exemplo do que vem sendo feito com outras espécies (LIN et al., 1998; GAGLIARDI et al., 2002). O alongamento dos explantes nodais após o cultivo em MS0, gerando uma planta para cada explante inoculado, permitiu o estabelecimento das culturas, entretanto, essa produção, embora adequada a protocolos de conservação *in vitro*, mostrou-se insuficiente para atingir o objetivo geral do trabalho de estabelecer as culturas para futuros estudos fitoquímicos e farmacológicos. Esses estudos exigem quantidades relativamente elevadas de material e, por essa razão foi necessário aumentar a produção de partes aéreas. Entretanto, os experimentos de multibrotação realizados com as plantas oriundas das populações estabelecidas *in vitro* não reproduziram as altas frequências obtidas a partir das plantas mantidas há 5 anos em cultivo *in vitro*. Essa diferença nas taxas de multibrotação poderiam ser atribuídas a diferenças genótípicas ou diferenças na expressão gênica causadas por diferentes pressões ambientais nas matrizes utilizadas como doadoras de explantes. Pode-se esperar que, com a manutenção dessas culturas sob crescimento ativo, ao longo do tempo, as plantas desenvolvam adaptações às condições *in vitro*, que tornem os explantes mais responsivos, a exemplo do que já ocorreu anteriormente.

O enraizamento dos brotos obtidos nesse trabalho (70%) resultou na produção de plantas completas após seis semanas, nas amostras oriundas de todas as populações, exceto aquelas oriundas de Marechal Hermes, que apresentaram dificuldades na regeneração de raízes, necessitando ainda de otimização do protocolo. Embora, Castellar (2006) tenha obtido uma taxa de enraizamento mais elevada (100%) em presença de AIA 0,6  $\mu\text{M}$ , essa suplementação não resultou em raízes na população de Marechal Hermes. A rizogênese em MS0, proposta neste trabalho foi considerada adequada para definir um protocolo de produção e conservação, aplicável à maioria das populações, uma vez que dispensa o uso de fitorreguladores, minimizando as condições de estresse na produção das mudas.



## Avaliação Fitoquímica

O extrato vegetal bruto contém centenas ou milhares de metabólitos de estruturas complexas, que diferem consideravelmente em seus parâmetros físico-químicos e espectroscópicos. Por isso, uma eficiente detecção e rápida caracterização têm papel fundamental na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos. A identificação das substâncias presentes nos extratos é fundamental, pois fornece numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a cromatografia em camada delgada tem sido a técnica predominantemente escolhida para separação dos componentes de extratos vegetais.

Além das diferenças morfológicas, esse trabalho também confirmou o outro problema, comumente enfrentado por produtores de plantas medicinais, representado pela variabilidade metabólica em função dos locais de ocorrência natural ou local de cultivo e períodos de coleta (BOURGAUD *et al.*, 2001, LIMA *et al.*, 2010). Com base na utilização popular da planta sob a forma de chá (infusão em água), a análise das plantas de campo foi realizada com o extrato aquoso do material botânico. A análise realizada inicialmente, por meio de TLC, visando caracterizar diferenças entre as populações estudadas, identificou algumas diferenças na produção de flavonóides confirmando a diversidade química nesse grupo, relatada para essa espécie (DE SOUZA, 1990; DELLE-MONACHE, 1992, 1996). Os perfis fitoquímicos dos extratos aquosos das plantas recém-coletadas em Magé e Vila Isabel apresentaram diferenças em relação aos extratos de plantas coletadas nas outras áreas.

Os polifenóis compreendem um grande grupo de substâncias incluindo taninos, flavonóides e antranóides (FALKENBERG *et al.*, 2000), às quais tem sido atribuídas atividades antioxidantes (SERTIE *et al.*, 1995 a e b). Entre os diferentes grupos de antioxidantes que ocorrem naturalmente em plantas, carotenóides e polifenóis (tocoferol) são os mais importantes (LARSON, 1997; SHAHRZAD *et al.*, 2002). Nossos resultados reforçam a hipótese de que algumas atividades biológicas observadas na espécie poderiam ser atribuídas à presença de flavonóides uma vez que a análise dos extratos de *P. alliacea* através da TLC sugeriu a presença dessas substâncias nas plantas oriundas de todas as populações estudadas.

Entretanto, na comparação dos extratos etanólicos das plantas de campo com as plantas *in vitro* correspondentes, a heterogeneidade na produção de flavonóides não se confirmou. Esse fato pode ser explicado pela diferença do processo de extração, ou ainda pelo fato das plantas de todas as origens terem sido mantidas em telado, após a coleta, por

aproximadamente um ano e meio, antes da avaliação comparativa com as plantas *in vitro*, o que poderia ter uniformizado a síntese desse grupo de metabólitos. Além disso, os resultados da TLC também sugeriram a presença de terpenos nos extratos etanólicos das plantas de campo e plantas *in vitro*, avaliados por essa técnica, o que também era esperado para a espécie, com base em registros anteriores (DELLE-MONACHE, 1996).

O extratos foram posteriormente avaliados por GC MS e algumas substâncias do grupo dos terpenos foram identificadas sendo esse resultado discutido adiante.

A cromatografia em camada delgada possibilitou também a confirmação de diferenças metabólicas entre os diferentes órgãos vegetais uma vez que extratos de raízes e de folhas mostraram perfil diferente tanto a partir de plantas de campo como de plantas *in vitro*. A literatura disponibiliza vários exemplos de diferenças entre a produção de metabólitos *in vitro* e *ex vitro*, em diferentes sistemas de cultura (BOURGAUD *et al.*, 2001; TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; VANISREE *et al.*, 2004; CASTELLAR, A. 2006; MARASCHIN; VERPOORTE, 2010). Entretanto, petiverinas não foram detectadas por essa técnica, sabe-se que estão presentes em todas as partes da planta mas seu conteúdo total é muito baixo nos tecidos da parte aérea, sendo mais abundante nas raízes (KUBEC; MUSAH, 2001).

Apesar dos resultados obtidos, as técnicas de cromatografia delgada são especialmente úteis no caso de substâncias pouco voláteis, para as quais a cromatografia em fase gasosa (GC MS) é inadequada (DEGANI *et al.*, 1998).

Uma vez que uma das principais substâncias sintetizadas durante o metabolismo secundário de *P. alliacea* é o dibenzil trissulfeto (DTS), organosulfurado volátil, produzido com a degradação de petiverinas (DE SOUSA, 1990), foram realizados testes por meio de GC MS (MACKU; SHIBAMOTO, 1991) para a pesquisa desse produto, que nos permitiram identificar substâncias e monitorar os sistemas de cultura. Dentre as substâncias identificadas nesses ensaios, a Vitamina E (tocoferol) é uma substância lipossolúvel que previne o dano celular ao inibir a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, e o trans-esqualeno que é um triterpeno com 30 átomos de carbono, comumente encontrado em plantas superiores. Essa substância participa como intermediário na biosíntese dos esteróides, ocorrendo naturalmente em duas formas isoméricas (cis e trans). Fitol é outro terpenóide identificado, muito comum em extratos vegetais, ocorrendo em todos os tecidos clorofilados.

Dentre os polissulfetos de interesse, foi identificado apenas dibenzil dissulfeto (DDS), que compõe o grupo químico dos aryl polissulfetos juntamente com DTS e outros derivados, já determinados como novos produtos naturais, sintetizados por *P. alliacea* (DE SOUSA 1990; KINGHORN *et al.*, 1998). Embora o DTS seja considerado o principal metabólito produzido

por essa espécie, devido a suas atividades anticancerígena e imunomodulatória comprovadas (ROSNER *et al.*, 2001), o dibenzil dissulfeto, naturalmente produzido em maiores quantidades, foi identificado nos perfis dos extratos de plantas de campo coletadas em Niterói. Esse produto já é bem conhecido na área de engenharia devido a sua implicação no processo de corrosão do cobre, presente em vários equipamentos de grande porte (transformadores, reatores etc), onde se forma a partir da reação do enxofre presente em óleos minerais lubrificantes e o cobre dos cabeamentos e revestimentos. Normalmente dibenzil dissulfeto é monitorado através de análise físico-química já normatizada (N.T. 10.1.029/ABNT), para avaliar a quantidade de enxofre nos equipamentos e, conseqüentemente, os riscos de corrosão (SIEMENS, 2005). Todavia, em relação aos tecidos vivos, suas atividades não estão bem esclarecidas. Testes de avaliação de atividade do DTS e compostos relacionados, em cultura de células nervosas, mostraram que DDS apresentou efeito antiinflamatório significativo, mas ainda assim menor que DTS (ROSNER *et al.*, 2001). Não foi detectado efeito inibitório contra células neoplásicas (AN *et al.*, 2006). Entretanto, foi determinado, para esse produto, um potente efeito antifúngico (superior ao da nistatina, antifúngico usado como referência internacional), levando os autores a sugerir que o DDS possa ser responsável pelo efeito antifúngico observado no extrato bruto da planta (BENEVIDES *et al.*, 2001). Além desses efeitos, estudos recentes descrevem uma atividade antioxidante nos extratos de *P.alliacea*, bem caracterizada, a partir de S-benzil fenilmetanotiosulfinato (BPT), um produto do metabolismo de DDS (OKADA *et al.*, 2008).

Apesar disso, o interesse maior da indústria química e farmacêutica tem sido a obtenção de DTS, o que se reflete na quantidade de trabalhos químicos e biológicos dedicados a essa molécula. A síntese química de DTS a partir de precursores já foi estabelecida, mas resulta em uma mistura de di-/tri-/tetrassulfetos em quantidades variáveis, sendo o DTS obtido em taxas relativamente muito baixas nesses processos (NA *et al.*, 2006). A possibilidade de transformações e interconversões químicas têm sido bastante exploradas e vários produtos sintéticos derivados de DTS foram obtidos com sucesso. Os novos produtos obtidos apresentaram uma ampliação das atividades biológicas descritas, sendo já comercializados como agroquímicos ou quimioterápicos (WILLIAMS *et al.* 2003; NA *et al.*, 2006; BAO *et al.*, 2008).

A literatura indica a possibilidade de obtenção de DTS e DDS a partir de raízes e folhas de plantas de campo (KUBEC, MUSAH, 2001;2005), abrindo a perspectiva de modulação da produção dessas substâncias em cultura de tecidos vegetais. Entretanto, os sistemas de raízes de campo e raízes *in vitro*, não foram avaliados nesse trabalho, devido a problemas técnicos que ocorreram com o cromatógrafo, sendo necessário a continuação dos experimentos. Por outro lado, a identificação de DDS a partir das folhas de plantas de campo sugere a possibilidade de utilização de polissulfetos como marcadores biossintéticos de plantas de *P. alliacea* produzidas em cultura.

### **Avaliação da potencialidade genotóxica/antigenotóxica**

Neste trabalho, a avaliação de potencialidade genotóxica/antigenotóxica comparativa entre os extratos de plantas de campo e *in vitro* foi utilizada para determinar a atividade biológica dos extratos. A avaliação da potencialidade genotóxica, além de fornecer informações importantes acerca da toxidez de substâncias utilizadas pela população, constitui pré-requisito fundamental para produção de fitofármacos a partir dessas substâncias. Além disso, pode ser utilizada como indicativo da qualidade dos materiais produzidos *in vitro* e monitorar a qualidade biotecnológica das plantas produzidas na cultura, para fins farmacológicos.

Nesse trabalho, embora o efeito genotóxico não tenha sido observado nos extratos de todas as populações de campo estudadas, observou-se um perfil eletroforético semelhante para os extratos de plantas *in vitro* de todas as origens, ou seja, a quantidade de quebras produzidas no DNA plasmidial foi diretamente proporcional à concentração dos extratos utilizados nos tratamentos. Embora as plantas de campo, estejam sujeitas tanto às intempéries quanto a predadores naturais, justificando a alta diversidade química geralmente observada (substâncias de defesa para a planta), as plantas *in vitro* também estão sujeitas a vários tipos de estresse, representados pelo ambiente artificial da cultura, reconhecidamente indutor de respostas adaptativas específicas (SMULDERS; KLERK, 2010). Essas respostas, muitas vezes se traduzem pela síntese aumentada de determinadas substâncias ou mesmo pela síntese de novas substâncias, não detectadas nas plantas de campo (ALVES, 2001; CÂMARA *et al.*, 2002; VANISREE *et al.*, 2004).

Uma das principais características de metabólitos secundários é que a sua síntese é altamente induzida. Portanto, o potencial de plantas para a produção não pode ser determinado apenas pela quantificação no extrato, porque é sempre possível que o metabolismo correspondente tenha sido reprimido ou ativado antes da quantificação (BOURGAUD *et al.*, 2001). Atualmente é possível manipular as vias metabólicas em cultura de tecidos, através da indução de alterações epigenéticas, como a seleção de linhagens celulares de maior potencial produtivo, otimização do meio de cultura, manipulação de fatores ambientais (intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), a adição de inibidores ou precursores ao meio de cultura, o balanço hormonal, e a eliciação, ou ainda, através da promoção de alterações genéticas via mutagênese ou transformação (TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; VANISREE *et al.*, 2004).

Em relação aos efeitos genotóxicos das substâncias presentes nos extratos da espécie estudada, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram, por um lado, que os extratos aquosos, dependendo da concentração utilizada, possuem componentes em níveis capazes de induzir lesões do tipo quebra na molécula do DNA. Estas lesões, além de poderem acarretar inativações celulares, também possuem potencialidade mutagênica (FRIEDBERG *et al.*, 2006), justificando a necessidade de aprofundamento destes estudos em outros modelos experimentais, como, por exemplo, em bactérias e células eucarióticas.

Por outro lado, muitos estudos, atualmente, estão focados na investigação comparativa das atividades antioxidantes das plantas medicinais (KUMAR *et al.*, 2010). A maioria dos compostos antioxidantes ativos são fenóis, flavonóides, isoflavonas, flavonas e antocianinas e uma relação direta entre atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais tem sido relatada por muitos pesquisadores (SHARIFIFAR *et al.*, 2009; GOLLUCKE *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2009; CONFORTI *et al.*, 2009; CHIRINOS *et al.*, 2008). A capacidade de diferentes extratos vegetais de protegerem DNA plasmidial superhelicoidizado contra os efeitos deletérios de agentes químicos que induzem quebrar nessa molécula, pode ser avaliada por um teste que detecta e revela alterações da conformação estrutural de plasmídeos. Esse teste tem sido muito empregado, com diversas modificações, para avaliar a potencialidade antigenotóxica de inúmeras espécies vegetais (DANTAS *et al.*, 1999; DE MATTOS *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2010). A adição de um oxidante na mistura da reação pode resultar na formação de radicais hidroxil (OH) que atacam/reagem com a fita dupla do DNA produzindo as lesões de quebra simples e duplas (Formas II e III). É possível acompanhar a ocorrência e o tipo da lesão (quebra simples ou dupla) pela intensidade e posição das bandas produzidas no gel. Dessa forma a banda relativa ao DNA superhelicoidizado torna-se menos intensa quando o DNA foi quebrado as bandas características dessa forma de lesão ficam mais intensas.

Na avaliação da potencialidade antigenotóxica, embora os experimentos comparativos com os extratos de plantas de diferentes origens não tenham sido conclusivos, os géis serão refeitos tão logo o fornecimento de SnCl<sub>2</sub> seja normalizado. Entretanto, na primeira etapa deste trabalho, a alteração na posição da banda obtida, em relação ao DNA lesado pelo cloreto estano, demonstrou um efeito protetor do extrato. Esses experimentos, além de fornecerem informações sobre a potencialidade antigenotóxica, também indicaram que, com relação ao agente lesivo utilizado (SnCl<sub>2</sub>), reconhecidamente indutor de lesões oxidativas, os extratos em estudo apresentam um potencial antioxidante.

Os antioxidantes ajudam o organismo a combater o estresse oxidativo, evitando os danos causados pelos radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Esse mecanismo, presente em muitas espécies vegetais, tem sido bem aproveitado pela civilização de modo a reduzir o risco de doenças crônicas e prevenir a sua progressão, promovendo uma melhoria natural nas defesas antioxidantes do corpo ou complementando a dieta com antioxidantes (STANNER *et al.*, 2004).

Nesse contexto, a quimioprevenção contra o câncer usando abordagens antioxidantes tem sido estimulada por oferecer um potencial de importantes benefícios para a saúde pública, e tem sido considerada, por muitos pesquisadores, como uma estratégia fundamental para inibir, retardar ou até mesmo reverter o processo de carcinogênese (SHUREIQI *et al.*, 2000.; TSAO *et al.*, 2004). Em *P. alliacea*, a atividade antineoplásica, já constatada devido à presença de polissulfetos (ROSNER *et al.*, 2001, MATA-GREENWOOD *et al.*, 2001, RUFFA *et al.*, 2002), poderia ser potencializada por derivados do DDS (OKADA *et al.*, 2008), e também devido à presença de diferentes substâncias do grupo dos flavonóides como constatado neste trabalho.

Os extratos de ervas medicinais são os antioxidantes naturais mais estudados (YANISHLIEVA *et al.*, 2006) e a literatura revela uma relação direta entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais, mas nem sempre a presença de polifenóis assegura a atividade antioxidante de um extrato. Por definição, um antioxidante deve satisfazer duas condições básicas (HALLIWELL, 1990): (i) quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato a ser oxidado podem atrasar, retardar ou impedir a autooxidação mediada por radicais livres, (ii) os radicais formados após a primeira etapa devem ser estáveis através de ligação com hidrogênio intramolecular, em oxidação adicional (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Em geral, a eliminação de radicais livres é uma atividade antioxidante dos compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos) e depende principalmente do número e posição dos hidrogênios a serem doados, no extrato. Acredita-se que milhares desses compostos ocorram em plantas medicinais. Por exemplo, mais de 4.000 tipos de flavonóides e centenas de cumarinas e lignanas já foram relatadas como compostos de ocorrência natural (IWASHINA, 2000; XIAO *et al.*, 2000).

Finalmente, neste trabalho, além dos estudos comparativos acerca dos perfis fitoquímicos e potencialidades genotóxica/antigenotóxica foi evidenciada a importância de se integrar as etapas de estabelecimento da produção biotecnológica de plantas medicinais, desde a coleta e identificação, com a caracterização botânica, fitoquímica, farmacológica e molecular. A caracterização das matrizes e a possibilidade de aplicação de diferentes métodos de monitoramento do material produzido na cultura, poderão garantir a produção in vitro desse material, de forma segura, visando aplicação na indústria farmacêutica.



## 6 CONCLUSÕES

➤ A análise fitoquímica evidenciou diferenças na produção de flavonóides entre as plantas oriundas de diferentes regiões do Rio de Janeiro, sendo que as plantas oriundas de Niterói e Marechal Hermes apresentaram a maior diversidade química nesse grupo. Apesar das variações morfológicas e fitoquímicas observadas, todas as amostras foram identificadas como *Petiveria alliacea* L.

➤ As amostras de *P. alliacea* coletadas no campo (Magé, Niterói, Mal. Hermes e Vila Isabel) foram introduzidas na cultura constituindo diferentes linhagens *in vitro* e vêm sendo mantidas através de subculturas mensais.

➤ Foi estabelecido um protocolo eficiente para multiplicação, a partir de explantes de ápices caulinares, cultivados em presença de BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 0,54  $\mu\text{M}$ , que possibilitou a obtenção, em média, de 8 brotos por explante.

➤ A avaliação fitoquímica das plantas em cultura por TLC evidenciou que dependendo da fase móvel utilizada, diferentes substâncias são identificadas

➤ A técnica de CG MS permitiu a identificação de várias substâncias em extratos de plantas de campo (tocoferol, fitol e trans-esqualeno), inclusive dibenzil-dissulfeto, produto do metabolismo de petiverinas, de ocorrência exclusiva na espécie estudada.

➤ A avaliação do potencial genotóxico de extratos aquosos de plantas de campo, de diferentes origens, demonstrou a ocorrência de alterações na topologia do plasmídeo, variando diretamente em função da concentração, do genótipo e do ambiente.

➤ A avaliação do potencial genotóxico de extratos de plantas *in vitro* demonstrou que todas as amostras testadas causaram alterações na topologia do plasmídeo, variando apenas em função da concentração.

➤ A avaliação do potencial antígenotóxico do extrato aquoso de plantas de campo e plantas *in vitro* demonstrou um efeito protetor, diretamente proporcional à concentração utilizada de extrato.

## PERSPECTIVAS

- Otimização da micropropagação das plantas provenientes das regiões estudadas;
- Estabelecimento de metodologias para conservação *in vitro* do germoplasma de *P. alliacea* L.;
- Estabelecimento de metodologias para o monitoramento genético das plantas produzidas e/ou conservadas *in vitro*;
- Complementação da análise fitoquímica dos extratos de plantas produzidas na cultura;
- Complementação da avaliação comparativa da potencialidade antígenotóxica;
- Estudos acerca da potencialidade mutagênica detectada nos extratos aquosos;

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, R.K.; MISHRA, J.; NANDI, S.K. Improved *in vitro* shoot multiplication and rooting of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro: production of genetically uniform plants and field evaluation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.31, n. 5, p. 961-967, 2009.
- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fontes de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 10 - 15, 2001.
- AN H.; ZHU J., WANG X.; XU X. Synthesis and anti-tumor evaluation of new trisulfide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4826–4829, 2006.
- AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.20, n.1, p.185-194, 2006.
- BAO Y.; HE Y.; XU X.; MO X.; XU X.; WANG X.; AN H. Quantitative determination of anti-tumor agent bis(4-fluorobenzyl) trisulfide, fluorapacin and its pharmaceutical preparation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 206–210, 2008.
- BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N.F.; BOLZANI, V. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. **Phytochemistry**, v. 57, p. 743–747, 2001.
- BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CÁCERES, A.; HERNADEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KUBELKA, W. G. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemala plants against *Trypanosoma cruzi*. **Journal Ethnopharmacology**, v.62, p. 107-115, 1998.
- BOBROFF, R.L.; LENZA, J.B.; PEREIRA, G.A.; ZANUZO, M.R.; RODRIGUES, A.B.C. Avaliação de diferentes concentrações de agrimicina para micropropagação de bananeira IAC 2001. **UNICiências**, v.13, p. 171-180, 2009.
- 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. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

- BROCHINI, C.B.; NÚÑEZ, C.V.; MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F. Identificação de compostos de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. **Química Nova**, v.22, n.1, p. 37-40, 1998.
- CÁCERES, A.; LOPES, B.; GONZALES, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and *American trypanosomes* of 13 naive plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 195-202, 1998.
- CAD – Colômbia Alternative Development. Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas. Cultivo: Plantas Medicinales y Aromáticas (Extraído de PERSUAP, Dic/03) **Fundación Chemonics Colômbia**, 2003.
- CANO, J.H.; VOLPATO G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p.293-316, 2004.
- CARABALLO A.; CARABALLO B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.2, p. 186-188, 2004.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 116)  
URL/URI: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/16668/1/DOC116.PDF>
- CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M. Características nutricionais e funcionais EMBRAPA – Hortaliças e Sistemas de Produção. Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/caracteristicas\\_nutricionais.htm](http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/caracteristicas_nutricionais.htm)>. Acesso em: 28 set. 2010.
- CASTELLAR, A. **Cultura de tecidos e Perfil fitoquímico de *Petiveria alliacea* L.** 2006. 120 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- \_\_\_\_\_; GAGLIARDI, R.F.; MANSUR, E. *In vitro* propagation and establishment of callus and cell suspension cultures of *Petiveria alliacea* L., a valuable medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, 2010. (Aceito).
- CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; DA SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos Secundários. Suprema. Viçosa, Minas Gerais, 104p., 2001.
- CASTRO, I. M.; ANJOS, M.R. Determinação de isotiocianato de benzila em *Carica papaya* utilizando cromatografia gasosa com detectores seletivos. **Química Nova**, v.31, n.8, p. 1953-1959, 2008.
- CHIRINOS, R.; CAMPOS, D.; WARNIER, M.; PEDRESCHI, R.; REES, J.; LARONDELLE, Y. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. **Food Chemistry**, v.111, p. 98-105, 2008.

CHRISTO, A. G.; GUEDES-BRUNI, R.R.; FONSECA-KRUEL, V.S. Uso de recursos vegetais em comunidades limítrofes à Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, RJ: estudo de caso na Gleba Aldeia Velha. **Rodriguesia**, v. 5, n.3, p. 519-542, 2006.

CLOSA D.; TORRES M.; HOTTER G.; BIOKE G.; LEON O.S.; GELPI E.; ROSELLO-CATAFFAU J. Prostaglandins Leukot essent Fatty Acids, v. 56, p. 331-334, 1997.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. **Food. Chemistry**, v.112, p. 587-594, 2009.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York; **Columbia University**, p.1262, 1981.

\_\_\_\_\_. The evolution and classification of flowering plants. Bronx: New York, **Botanical Garden**, 1988.

CUNHA, J.F.; PICOLI, E.A.T.; ALFENAS, A.C.; GONÇALVES, R.C. Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao Eucalyptus spp. **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.871-876, 2006.

DANTAS, F.J.S.; MORAES, M.O.; DE MATTOS, J.C.P.; BEZZERA, R.J.A.C.; CARVALHO, E.F.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicology Letters**, v.110, p.129-136, 1999.

DAXENBICHLER, M.E.; SPENCER, G.F.; CARLSON, D.G.; ROSE, B.G.; BRINKER, A. M.; POWELL, R.G. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p. 2623-2638, 1991.

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

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; MORAES, M.O. Agarose gel electrophoresis in the classroom. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 4, p. 254-257, 2004.

DE SOUSA, J.R.; DEMUNER, A.J.; PINHEIRO, J.A.; BRETMAIR, E.; CASSELS, B.K. Dibenzyl Trisulphyde and Trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3653-3655, 1990.

DEGANI, A.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia – um breve ensaio. **Química nova na escola**, n. 7, 1998.

DELIMA, T.C.M.; MORATO, G.S.; TAKAHASHI, R.N. Evolution of the antinociceptive effects of *Petiveria alliacea* (guiné) in animals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 153-158, 1991.

DELLE-MONACHE, F.; SUAREZ, L.E.C. 6-c-formil and 6-c-hydroxymethyl flavanones from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v.31, p. 2481-2482, 1992.

\_\_\_\_\_; MENICHINI, F.; SUAREZ, L.E.C. Substances from *Petiveria alliacea*: II further flavanonoides and triterpenes. **Gazzeta Chimica Italiana**, v.126, p. 275-278, 1996.

DI STASI, L.C.; COSTA, M.; MENDACOLLI, L.J.; KIRIZAWA, M.; GOMES, C.; TROLIN, G.J. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **Ethnopharmacology**, v. 2, n.3, p. 205-208, 1998.

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

DU, M.; LI, M.; MA, F.; LIANG, D. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in Actinidia fruits. **Food Chemistry**, v.113, p. 557-562, 2009.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.J.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Local: Porto Alegre/Florianópolis Ed. Brasil, 2000. p. 163-179.

FENG, P.C.; HAYNES, L.J.; MAGNUS, K.E.; PLIMMER, J.R. Further pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.16, p. 115, 1964.

FOGLIO, M. A; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: um Modelo Multidisciplinar. **Contruindo a História dos Produtos Naturais**, v.7, p. 1-8, 2006.

GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.; COCULILO, S.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus Arachis, Section Extranervosae). **Biodiversity and Conservation**, v.9, p. 943-951, 2000.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Germplasm preservation of wild Arachis species through culture of shoot apices and axillary buds from *in vitro* plants. **Biologia Plantarum**, v.45, n.3, p. 353-357, 2002.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: \_\_\_\_\_; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Springer, The Netherlands, 2008. V. 1, p. 1-28.

GIRÓN, L.M.; FREIRE V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34 p.173-187, 1991

GOLLUCKE; BOIAGO, A.P.; SOUZA C.J.; QUEIROZ T.D. (+)-Catechin and (-)-epicatechin levels of concentrated and ready to drink through storage. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.43, p. 1855-1859, 2008.

GUEDES, A.P.; CARDOSO, V.N.; MATTOS, J.C. P. ; DANTAS, F. J. S.; DE MATOS, V.C.; SILVA, J.C.F.; BEZERRA, R.J.A.C., CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. **Nuclear Medicine and Biology**. v.33, p.915-921, 2006.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free. Rad. Res. Comm.**, v. 9, n. 1, p. 1-32, 1990.

HANDA, L.P.T.B.; SAMPAIO, R.C.; QUISEN. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke). **Acta Amazônica**, v. 35, n.1, p. 29-33, 2005.

HATSCHBACH, G.; GUIMARÃES, O. Fitolacáceas do Estado do Paraná, Passeio Público Curitiba. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, v. 8, 1973.

HOYOS, L.S.; AU, W.W.; HEO, M.Y.; MORRIS, D.L.; LEGATOR, M.S. Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamu). **Mutation Research**, v. 280, p. 29-34, 1992.

IWASHINA, T. The structure and distribution of flavonoids in plants. **Journal Plant Res.**, v.113, p. 287-299, 2000.

JAMES A. T. Gas-liquid partition chromatography: the separation of volatile aliphatic amines and of the homologues of pyridine. **Biochem. J.**, v. 52, p. 242-247, 1952.

\_\_\_\_\_; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochem. J.**, v. 50, p. 679-690, 1952a.

JAMES A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of ammonia and the methylamines. **Biochem. J.**, v. 52, p. 238-242, 1952b.

JOHNSON, L.; WILLIAMS, L.A.D.; ROBERTS, E.V. An insecticidal and acaricidal polysulfide metabolite from the roots of *Petiveria alliacea*. **Pesticide Science**, v.50, p.228-232, 1997.

JOHNSON, V.J.; HE,Q.; OSUCHOWSKI, M.F.; SHARMA, RP.. Physiological responses of a natural antioxidante flavonoid misture, silymarin, in Balb/c mice: xii. Silymarin inhibits T lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. **Planta Medica.**, v.69, p. 44-49, 2003.

JOLY, A. **Botânica**. ed. São Paulo Nacional, 1998.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 8 ed. São Paulo: editora Biblioteca Universitária, p.258-259. 1957.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; McEWEN, C. N., Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. **Academic Press**, San Diego, CA., 1996.

KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KOPP, B. Microbial contamination of medicinal plants – A review. **Planta Medica.**, v.68, p. 5 –15, 2002.

KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R.A. The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea* **Phytochemistry**, v. 63, p. 37-40. 2003.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. S-Substitued cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea* – Part II. **Phytochemistry**, v. 61, p. 675-680,. 2002.

KUMAR A.; KAUR R.; ARORA S. Free radical scavenging potential of some Indian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 4(19), p. 2034-2042, 2010.

LANCASTER, J.E.; COLLIN, H.A. Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulfoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). **Plant Science Letters**, v. 22, n 2, p. 169-176, 1981.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics.**, v. 60, p.197-214, 1981.

LARSON, P. Money for your life. *Positively Aware.*, v. 8, n. 5, p. 48-52, 1997.

LEE, J.; KIM, H.; KIM, J.; JANG, Y. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. **J. Agric.Food. Chem.**, v.50, p. 6490-6496, 2002.

LIMA, S. S.; DAVYSON DE LIMA MOREIRA, D. L.; AFFONSO, V. R. HENRIQUES, A. B.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; LEITÃO, G. G.; LAGE, C. L. S. Micropropagation of *Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* (Mart.) Meisn, and seasonal variation of tannins in acclimatized plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 7, p. 573-578, 2010.

LIN, H.S.; DE JEU, M.J.; JACOBSEN, E. Formation of shoots from leaf axils of *Alstromeria*. The effect of the position on the stein. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 52, p.165-169, 1998.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum**, v.1, p.342. 1753.

LOPES-MARTINS, R.A.B.; PEGORARO, D.H.; WOISKY, R.; PENNA, S.C.; SERTIÈ, J.A.A. The antinflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (*Phytoccalaceae*). **Phytomedicine**, v. 9, p.245-248. 2002.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, p. 351, 1992.



MALLPEZZI, E.L.A.; DAVINO, S.C.; COSTA, L.V.; FREITAS, J.C.; GIESBRECHT A.M.; ROQUE N.F. **Brazilian Journal Medicinal Biological Research**, v. 27, p.749-754, 1994.

MARCHIORETTO, M.S. Phytolaccaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB024174>> Acesso em: 13 out. 2010.

\_\_\_\_\_. **A família Phytolaccaceae no Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. Instituto Anchieta de Pesquisas São Leopoldo, v. 39, 1989.

MATA-GREENWOOD, E.; ITO, A.; WESTENBURG, H.; CUI, B.L.; MEHTA, R.G.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.N. Discover of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. **Anticancer Research**, v. 21, p. 1763, 2001.

MELO J.G.; NASCIMENTO V.T; AMORIM E.L.C.; LIMA C.S.A.; ALBUQUERQUE U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p.111-120, 2004.

MOBOT © 2010 MISSOURI BOTANIC GARDEN. Science and Comnservation Tropicos ®. <Disponível em [http:// www. Tropicos. Org](http://www.Tropicos.Org)>. Acesso em: dia 21 de out. 2010.

MOLINA D.E.V.; SANTOS A.; GUZMÁN K.A.L.; MUÑIZ O.S.; MÉNDEZ M.V.; ROSALES R.; LLAVEN M.A.O.; DENDOOVEN L.; GUTIÉRREZ-MICELI F.A.. Sugar cane buds as an efficient explant for plantlet regeneration. **Biologia Plantarum**, v.49, n.4, p. 481-485, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium × hortorum* Bailey. **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 269–275, 2001.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-845, 2000.

NASCIMENTO V.T.; LACERDA E.U.; MELO J.G.; LIMA C.S.A.; AMORIM E.L.C.; ALBUQUERQUE U.P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p.56-64, 2005.

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

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO E.; OKAJIMA, H. Antioxidant activity of the new thiosulfinate derivative, S-benzyl phenylmethanesulfinate from *Petiveria alliacea* L. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p.1097–1102, 2008.

PERES L.E.P. Metabolismo secundário. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>> Acesso em : 26 out. 2010.

PÉREZ, D. Etnobotánica Medicinal y Biocidas para Malaria en la Región Ucayali. **Folia Amazônica**, v.13, p. 1-2, 2002.

PONTE, J.J.; FRANCO, A.; SILVEIRA-FILHO, J. Preliminary investigation on the nematocide potentiality of Guine's Plants (*Petiveria alliacea*). **Phytopatology Venezuela**, v. 9, p. 14-15, 1996.

QUADROS, M.R.; SOUZA-BRITO, A. R.M.; QUEIROZ, M.L. S *Petiveria alliacea* L. extracts protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 21, p. 109-124, 1999.

QUEIROZ, M.L.S.; QUADROS, M.R.; SANTOS, L.M.B. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 22, p. 501-518, 2000.

RAMIREZ, E.C. Alliinases. **Food Science and Technology**, v. 122, p. 143 – 150, 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6.ed.: Local: Guanabara Koogan, 2001. 811 p.

RANI, G.; TALWAR, D.; NAGPAL A.; VIRK, G.S. Micropropagation of *Coleus blumei* from nodal segments and shoot. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 4, p. 496-500, 2006.

ROCHA, L.D.; MARANHO, L.T.; PREUSSLER, K.H. Organização estrutural do caule e lâmina foliar de *Petiveria alliacea* L., Phytolaccaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 3, p. 98-101, 2006.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E.L.A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, n.2, p. 80-87, 2003.

ROSNER, H.; WILLIAMS, L.A.D.; JUNG. A.; KRAUS W. Biochimica et Biophysia. **Acta Molecular Cell Research**, 1540, p.166-177, 2001.

RUFFA, M.J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.335–339, 2002.

SACALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073 – 2085, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SERTIE, J.A.A.; GERMANO, D.H.P.; SUDO, L.S.; HANADA, S. *Petiveria alliacea* – analgesic effect and preclinical toxicity. **Journal of dental Research**, v.74, p. 793-793, 1995 a.

\_\_\_\_\_; HANADA, S.; SUDO, L.S.; GERMANO, D.H.P. *Petiveria alliacea* –anti-inflammatory effect and gastric mucous protection. **Journal of Dental Research**, v. 74, p. 793-793, 1995 b.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D.; HONG, C. Phenolic compounds in foods and their effects on health. ACS Symposium Series 506, **Am. Chem. Soc.**, pp. 214-222, 1992.

SHAHRZAD, S.; CADENAS, E.; SEVANI, A.; PACKER, L. Impact of water-dispersible beadlets as a vehicle for the delivery of carotenoids to cultured cells. **Biofactor**, v. 16, p. 83 – 91, 2002.

SHARIFIFAR, F.; DEHGHAN-NUDEH, G.; MIRTAJALDINI, M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. **Food. Chem.**, v.112, p. 885-888, 2009.

SHARMA, M.; RAI, S.K.; PURSHOTTAM, D.K.; JAIN, M.; CHAKRABARTY, D.; AWASTHI, A., NAIR, K.N.; SHARMA, A.K. *In vitro* clonal propagation of *Clerodendrum serratum* (Linn.) Moon (barangi): a rare and threatened medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 379-383, 2009.

SHUREIQI, I.; REDDY, P.; BANNER, D.E. Chemoprevention: General perspective. **Crit. Rev. Oncol./Hematol.**, v.33, p. 157-167, 2000.

SILVA I.M.; PEIXOTO A.L. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato-Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p. 325-332, 2009.

SIEMENS. Corrosive Sulphur: its origin detection and prevention corrosive sulphur. Work Shop at Abinee/São Paulo. 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFSC, 2007.

SMULDERS, M.J.M.; KLERK, G.J. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, The Netherlands, n. 2, v. 63, p. 137-146 Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d27413044p156622/>>. Acesso em: 8 out. 2010.

SOARES, B.O. Caracterização botânica de plantas de *Petiveria alliacea* L. ocorrentes no Rio de Janeiro e estabelecimento do cultivo *in vitro*. Monografia de Bacharelado. DBV/IBRAG/UERJ. 2010.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITO, M.C.; FELIZ, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; FILHO, J.M.B.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas – Cruz das Almas**: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

STANNER, S.A.; HUGHES, J.; KELLY, C.N.; BUTTRESS, J.Á. Review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. **Pub. Health. Nutr.**, v.7, p. 407-422, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. **Artmed**, 2004, 3ª. Edição.

TAYLOR, L. **The healing power of rainforest herbs, 2005**. Disponível em: < <http://www.rain-tree.com/paudarco.htm> > Acesso em: 10 set. 2010.

TRIPATHI L.; TRIPATHI J.N. Role of biotechnology in medicinal plants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n.2, p. 243-253, 2003.

TSAO, A.S.; KIM, E.S.; HONG, W.K. Chemoprevention of cancer. **Cancer. J. Clin.**, v.54, p. 150-180, 2004.

UDULUTSCH, R.G.; PINHEIRO, M.H.O.; TANNUS, J.L.S.; DIAS, P.; FURLAN, A. Phytolaccaceae. In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G. J.; Melhem, T. S. & Giuliatti, A. M. (Orgs.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Instituto de Botânica / FAPESP, 2007. 494 p. V.5

VAN DE KERKHOFF, D. H.; DE BOER, D.; THIJSSSEN, J. H. H.; MAES, R. A. A. Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.24, p. 102-115, 2000.

VANISREE M.; LEE C-Y.; LO S-F.; NALAWADE S.M.; LIN C.Y.; TSAY H-S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p.1-22, 2004.

VILLAR R.; CALLEJA J.M.; MORALES C.; CACERES A. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. **Phytotherapy Resesearch**, v. 11, p. 441-445. 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis, A Thin-Layer Chromatography Atlas*. Springer Ed., Berlin, 1995.

WILLIAMS, L.A.D.; ROSNER, H.; LEVY, H.G.; BARTON, E.N. A Critical Review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). **West Indian Medicinal Journal**, v. 56, p. 17-21, 2007.

XIAO, C.H.; YANG, S.S.; HONG, X.K. *Chemistry of traditional Chinese medicines*. **Shanghai Science and Technology Publishing House**, Shanghai, China. 2000.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.**, v. 108, p. 776-793, 2006.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Volatile constituents from *Adenocalymma alliaceum* Miers and *Petiveria alliacea* L. Two medicinal herbs of the Amazon. **Flavour Fragrance Journal**, v.17, p. 133-135, 2002.