



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”

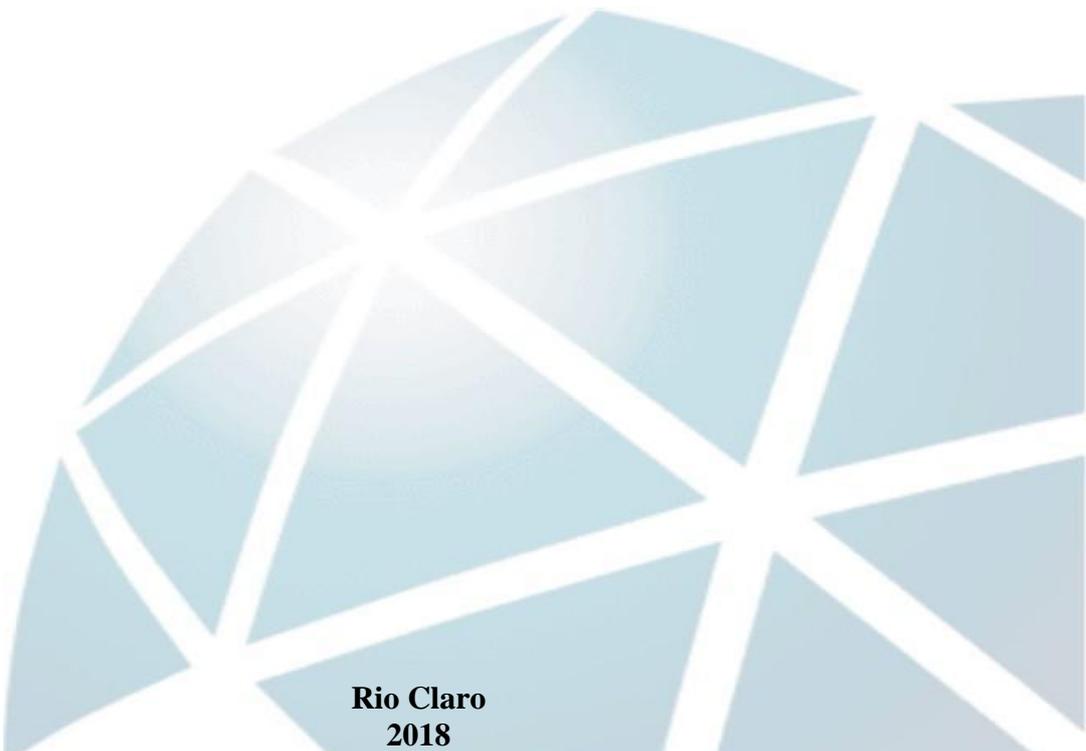
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS- RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E
ANTIGENOTÓXICO DE *Lycium barbarum* (Goji Berry),
NUTRACÊUTICO USADO COMO CITOPROTETOR E
ANTIOXIDANTE**

LETÍCIA CRISTINA GONÇALVES



**Rio Claro
2018**

**Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de
Lycium barbarum (Goji Berry), nutracêutico usado como
citoprotetor e antioxidante**

LETÍCIA CRISTINA GONÇALVES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista,
Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro - SP
2018

574.87 Gonçalves, Leticia Cristina
G635a Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *Lycium barbarum* (goji berry), nutracêutico usado como citoprotetor e antioxidante / Leticia Cristina Gonçalves. - Rio Claro, 2018
150 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales
Coorientadora: Maria Tereza Pamplona da Silva

1. Citologia. 2. *Allium cepa*. 3. Cultura de células. 4. Antigenotoxicidade. 5. Antimutagenicidade. 6. Goji berry. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO E ANTIMUTAGÊNICO DE *Lycium barbarum* (Goji Berry), NUTRACÊUTICO USADO COMO CITOPROTETOR E ANTIOXIDANTE

AUTORA: LETÍCIA CRISTINA GONÇALVES

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. DANIELA MORAIS LEME
Departamento de Genética / Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO
Departamento de Fonoaudiologia / FFC Marília

Rio Claro, 23 de fevereiro de 2018

Título alterado para: "Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *Lycium barbarum* (Goji Berry), nutraceutico usado como citoprotetor e antioxidante"

Dedico esse trabalho a Deus e aos
meus grandes incentivadores, meus
pais Carmem e Sergio e minha irmã

Priscila

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para vencer os obstáculos e colocar sempre pessoas iluminadas no meu caminho. Por ser meu refúgio, coragem e porto seguro.

Aos meus queridos pais, Sergio e Carmem, pelo apoio, confiança, amor, carinho, companheirismo e, principalmente, acreditarem em mim quando muitas vezes nem eu mesma acreditava. Vocês são os grandes responsáveis por essa conquista e tantas outras na minha vida. Obrigada por muitas vezes abdicarem de seus sonhos para ajudar nos meus.

A minha irmã Priscila, por todos os cuidados, conversas, apoio, amizade e acima de tudo ser uma segunda mãe para mim nessa vida. Obrigada por me apoiar, impulsionar e acreditar que tudo isso iria acontecer.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por me aceitar como integrante do seu grupo de pesquisa. Sou eternamente grata pela oportunidade. Obrigada pela paciência, todos os ensinamentos sempre com muito carinho e dedicação, os conselhos e acima de tudo amizade.

A minha coordenadora Maria Tereza, popularmente conhecida como Mary. Primeiramente, por ter aceitado a coorientação, me ensinado e acompanhado todos os experimentos pessoalmente. Por todos os finais de semana, feriados e noites em que passamos trabalhando porque além de coorientadora foi amiga, conselheira e companheira.

A todos os meus amigos e colegas mutagênicos: Maria Tereza, Nádia, Laís, Michele, Bairral, Camila, Cleiton, Franco, Jaque pira (Pedro), Jorge, Leticia Gigeck, Leticia, Bulas, Márcia (Julinha), Matheus, William, Samatha, Mileni, pelo convívio mais que especial.

As minhas companheiras de estágio docência Samantha, Mileni, Letícia Gigeck e Laís por me auxiliaram nas aulas e me fazer aprender diariamente com vocês.

Especialmente, por algumas pessoas que se tornam minhas conselheiras oficiais do bem, Raquel, Laís e Nádia. Obrigada pelos conselhos, pelos desabafos, vocês se tornaram grandes amigas que eu levarei no meu coração para sempre.

À amiga de toda vida, Heddelyn por sempre me ouvir, apoiar e acreditar em mim não só academicamente como na vida pessoal.

À amiga Michele, por todas as inúmeras ajudas no inglês e nas traduções. Muito obrigada pela sua amizade e parceria de mestrado.

Ao amigo Franco, por me proporcionar estar onde estou hoje uma vez que, foi meu primeiro coorientador.

À técnica e amiga Adriana, por toda ajuda durante este trabalho, almoços juntos e inúmeras risadas.

À Fernanda Flores por todo auxílio nas análises fitoquímicas, estresse oxidativo e todas as risadas proporcionadas.

À UNIARARAS, por permitir o desenvolvimento dos experimentos fitoquímicos e por fornecer os materiais utilizados.

À Capes, pelo apoio financeiro.

A todos os professores do departamento de biologia, área biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante o mestrado.

Aos técnicos do departamento de Biologia (Gerson, Roberta) e a secretária Cristiane obrigada pela ajuda nesse trabalho.

A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

**A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização
deste trabalho! MUITO OBRIGADA!**

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos
deixam sós. Deixam um pouco de si, levam
um pouco de nós”*

(O pequeno príncipe- Antonie Saint- Exupéry)

RESUMO

O *L. barbarum*, popularmente conhecido goji berry, tem despertado o interesse da comunidade científica ocidental, devido a sua riqueza nutritiva e a ação antioxidante que promovem efeitos benéficos para a saúde humana. Entretanto, há poucos relatos na literatura sobre sua possível ação tóxica ou comprovação do seu potencial protetor. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos (pelo MMT), genotóxicos e antígenotóxicos (pelo ensaio do cometa), mutagênicos, e antimutagênicos (pelo teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese – MN), de estresse oxidativo (pela quantificação dos níveis de GSH e TBARS e pela atividade das enzimas SOD e GST), de potencial antioxidante, do teor de polifenóis totais e da fitoquímica qualitativa de 3 diferentes concentrações recomendadas para o uso diário do extrato de *L. barbarum* (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), por meio de ensaios realizados com sistemas-teste *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foram utilizados o organismo teste *Allium cepa* e culturas de duas linhagens celulares: células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Para *A. cepa*, foram aplicados os testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas e dos micronúcleos em células F1. As análises de antigenotoxicidade e antimutagenicidade realizada com esse organismo seguiram protocolos convencionais de pré-tratamento, pós-tratamento e tratamento simultâneo simples. Os resultados destes testes mostraram que o *L. barbarum* não apresentou potencial genotóxico ou mutagênico para *A. cepa*, mas apresentou respostas positivas para ações antígenotóxica e antimutagênica. Pela aplicação da fórmula de porcentagem de redução dos danos, pode-se verificar que a taxa de redução, promovida pelo *L. barbarum* variou significativamente (41,7% a 64% para as células meristemáticas e de 65% a 100% para as células F1). Assim, inferimos que o extrato de *L. barbarum* apresentou um efeito protetor sobre as células de *A. cepa*. Em relação ao teste do MTT, realizado com cultura celulares das linhagens HepG2 e MCF-7, foi possível observar que o *L. barbarum* não foi citotóxico para nenhuma das linhagens testadas. As avaliações realizadas pelo ensaio do cometa, nas mesmas linhagens celulares, mostraram que o extrato não foi genotóxico para HepG2, mas foi genotóxico para a todas as concentrações testadas (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), para MCF-7. No entanto, na avaliação de genotoxicidade, por meio do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, foi possível observar uma diminuição significativa na frequência de brotos, pontes e MN para as três concentrações testadas (0,2; 0,4 e 0,6 g/L) na linhagem MCF-7, indicando um possível reparo dos danos genotóxicos observados para o ensaio do cometa. Já no teste do MN (avaliação de mutagenicidade), não foram observadas mutagenicidade para nenhuma das linhagens testadas. As avaliações de antigenotoxicidade e antimutagenicidade do *L. barbarum* foram realizadas apenas com a linhagem HepG2, devido a ausência de potencial genotóxico e mutagênico registrado para essas células. Nesta avaliação foram seguidos os protocolos de pré-tratamento, pós-tratamento, tratamento simultâneo e tratamento simultâneo com incubação. Na avaliação de antigenotoxicidade e antimutagenicidade, os protocolos de pré e pós-tratamento com as concentrações 0,4 g/L e 0,6 g/L se mostraram mais eficazes, para essas ações, o que permite inferir que o extrato estudado age tanto por desmutagênese como bioantimutagênese. Pela análise de porcentagem de redução dos danos, verificamos que a taxa de redução, promovida pelo *L. barbarum*, teve uma eficácia de 100%, para todos os pré-tratamentos e para os pós-

tratamentos nas concentrações 0,4 g/L e 0,6 g/L, enquanto que para a concentração 0,2 g/L, a eficiência variou de 40% a 70%. Foi observado ainda que, todos os tratamentos simultâneos induziram morte celular, indicando uma possível interação entre o MMS (substância utilizada como controle positivo) com algum composto do extrato de *L. barbarum*, como as quinonas. Os efeitos protetivos do *L. barbarum* observados no sistema teste *A. cepa* e nas células HepG2 podem estar associados à presença de flavonóides, saponinas e alcalóides presentes em todas as concentrações testadas (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), conforme verificado nas análises fitoquímicas qualitativas. Este efeito protetivo também pode ser associado ao teor de polifenóis totais, quantificados em 6,03 mg equivalente (eq.) de ác. gálico/mL, e a maior atividade antioxidante, dada pela concentração 0,6 g/L de *L. barbarum*, determinada pelo método do DPPH. Por fim, foi avaliado a capacidade do *L. barbarum* induzir alterações no equilíbrio redox em ambas as linhagens celulares (HepG2 e MCF-7). Foram quantificados os níveis de GSH, TBARS e a atividade das enzimas SOD, GST. Foi possível observar um aumento significativo apenas para os níveis de GSH na linhagem HepG2, o que confirma a proteção do material genético sugerida, anteriormente, nas demais análises realizadas com esta linhagem. Já para as células MCF-7, não foram observadas alterações significativas para nenhuma das análises realizadas, indicando ausência de indução de estresse oxidativo. Os resultados desta pesquisa sugerem que o *L. barbarum* pode apresentar efeitos protetivos sobre a molécula do DNA, pois mostrou ter ação antígeno-tóxica e antimutagênica, além de promissores potenciais de redução de danos, tanto em testes *in vivo* como *in vitro*.

Palavra-chave: *Allium cepa*; cultura de células; antígeno-toxicidade; antimutagênica; estresse oxidativo; goji berry

ABSTRACT

The *L. barbarum*, popularly known as goji berry, has aroused the interest of the Western scientific community because of its nutritional richness and antioxidant action that promote beneficial effects on human health. However, there are few reports in the literature about its possible toxic action or proof of its protective potential. The present work aimed to evaluate the cytotoxic (by MMT test), genotoxic and antigenotoxic (by comet assay), mutagenic and antimutagenic effects (by micronucleus test with cytokinesis-block - MN), oxidative stress (quantification of GSH and TBARS levels and the activity of SOD and GST enzymes), antioxidant potential, total polyphenol content and qualitative phytochemical of 3 different concentrations recommended for daily use of *L. barbarum* extract (0.2; 0.4 and 0.6 g / L) by assays performed with *in vitro* and *in vivo* test systems. In this study, the test organism *Allium cepa* and cultures of two cell lines were used: human hepatocarcinoma cells (HepG2) and human breast adenocarcinoma (MCF-7). For *A. cepa*, the chromosomal aberrations and micronucleus tests were applied in meristematic cells and the micronuclei in F1 cells. The antigenotoxicity and antimutagenicity analyzes performed with this organism followed conventional protocols for pretreatment, post-treatment and simple simultaneous treatment. The results of these tests showed that *L. barbarum* did not present genotoxic or mutagenic potential for *A. cepa*, but presented positive responses to antigenotoxic and antimutagenic actions. By applying the harm reduction percentage formula, it can be seen that the rate of reduction promoted by *L. barbarum* varied significantly (41.7% to 64% for meristematic cells and 65% to 100% for the cells F1). Thus, we infer that *L. barbarum* extract had a protective effect on *A. cepa* cells. In relation to the MTT test, carried out with HepG2 and MCF-7 lines cell culture, it was possible to observe that *L. barbarum* was not cytotoxic to any of the tested strains. Evaluations carried out by the comet assay in the same cell lines showed that the extract was not genotoxic for HepG2 but genotoxic at all concentrations (0.2, 0.4 and 0.6 g / L), for MCF-7. However, in the genotoxicity evaluation, by the micronucleus test with cytokinesis-block, it was possible to observe a significant decrease in the frequency of nuclear buds, nucleoplasmatic bridges and MN for the three tested concentrations (0.2, 0.4 and 0.6 g / L) in the MCF-7 line, indicating a possible repair of the genotoxic damages observed for the comet assay. In the MN test (mutagenicity evaluation), no mutagenic effect was observed for any of the tested cell lines. The antigenotoxicity and antimutagenicity evaluations of *L. barbarum* were performed only with the HepG2 lineage, due to the absence of genotoxic and mutagenic potential registered for these cells. In this evaluation the protocols of pre-treatment, post-treatment, simultaneous treatment and simultaneous treatment with incubation were followed. In the evaluation of antigenotoxicity and antimutagenicity, the pre and post treatment protocols with concentrations of 0.4 g / L and 0.6 g / L were more effective for these actions, which allows to infer that the studied extract acts both as demutagenesis as bioantimutagenesis. By the analysis of percentage of reduction of damages, we verified that the reduction rate, promoted by *L. barbarum*, had an efficacy of 100%, for all pre-treatments and for post-treatments in concentrations of 0.4 g / L and 0.6 g / L, while for the concentration 0.2 g / L, the efficiency ranged from 40% to 70%. It was also observed that all the simultaneous treatments induced cell death, indicating a possible interaction between the MMS (substance used as positive control) and some compound of *L. barbarum* extract, such as quinones. The protective effects of *L. barbarum* observed in the *A. cepa* test system and HepG2 cells may be associated with the presence of flavonoids, saponins and alkaloids present in all tested concentrations (0.2, 0.4 and 0.6 g / L), as verified in qualitative phytochemical analyzes. This protective effect can also be associated with the total polyphenol content, measured in 6.03 mg equivalent (eq.) of aq. gallic acid / mL, and the highest antioxidant activity, given by the concentration 0.6 g / L of *L. barbarum*, determined by the DPPH method.

Finally, the ability of *L. barbarum* to induce changes in the redox balance in both cell lines (HepG2 and MCF-7) was evaluated. The levels of GSH, TBARS and the activity of the enzymes SOD, GST were quantified. It was possible to observe a significant increase only for the GSH levels in the HepG2 line, which confirms the protection of the genetic material previously suggested in the other analyzes performed with this lineage. As for MCF-7 cells, no significant changes were observed in any of the analyzes performed, indicating absence of oxidative stress induction. The results of this research suggest that *L. barbarum* may have protective effects on the DNA molecule, as it showed antigenotoxic and antimutagenic action, as well as promising harm reduction potentials, both in vivo and in vitro.

Keywords: *Allium cepa*; cell culture; antigenotoxicity; antimutagenicity; oxidative stress; goji berry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% RD	Porcentagem de redução de danos
%Δ	Varição da absorbância
Abs	Absorbância
AC	Aberrações Cromossômicas
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DNTB	5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)
DPPH	2,2 difenil- 2-picril-hidrazil
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HepG2	Células de Hematoma Humano
IDC	Índice de Divisão Celular
IM	Índice Mitótico
IPBC	Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese
LMP	Low Melting Point ou LMP
MCF-7	Células de Adenocarcinoma de mama humano
MDA	Malondialdeído
MEM	<i>Meio Mínimo Essencial Eagle</i>
MMS	metilmetano sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline ou tampão fosfato
PÓS	Pós- tratamento
PRÉ	Pré- tratamento
PT	Polifenóis totais
SBF	Soro Bovino Fetal
SIM	Tratamento simultâneo
SIM I	Tratamento simultâneo com incubação
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
UNEP	United Nations Environmental Program
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Fitoterapia	16
2.2 Um breve histórico da fitoterapia	17
2.3 Lycium barbarum.....	18
2.3.1. Aspectos gerais	18
2.3.1 Principais compostos bioativos do Lycium barbarum.....	19
2.3.2 Estudos clínicos e farmacológicos com Lycium barbarum	20
2.4 Antimutagênese	23
2.5 Sistema testes in vitro e in vivo	24
2.5.1 Allium cepa	24
2.5.2 Cultura de células	25
2.6 Biomarcadores	27
2.6.1 Teste de aberrações cromossômicas (AC).....	27
2.6.2 Teste de citotoxicidade – MTT.....	29
2.6.3 Ensaio do cometa.....	30
2.6.4 Teste do MN.....	31
2.6.5 Estresse oxidativo	32
2.6.6 Análises fitoquímicas	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Material estudado	38
4.2 Material biológico.....	38
4.2.1 Sistema teste Allium cepa.....	38
4.2.2 Manutenção da linhagem celular HepG2	38
4.2.3 Manutenção da linhagem celular MCF-7	38
4.3 Bioensaios realizados.....	39
5 RESULTADOS	40
Artigo 1: Avaliação da ação genotóxica e antigenotóxica de extrato de Lycium barbarum	41
Artigo 2: Avaliação dos efeitos toxicogénicos e antitoxicogénicos de extrato de Lycium barbarum em culturas de células hepáticas humanas	67

Artigo 3: Análise do potencial genotóxico, mutagênico e indutor de estresse oxidativo do extrato de <i>Lycium barbarum</i> , sobre as células de adenocarcinoma de mama humano	100
6 CONCLUSÕES GERAIS	126
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, tem sido observado um aumento no consumo de produtos naturais ricos em nutrientes e compostos bioativos, devido aos efeitos positivos que eles promovem na saúde humana. Estes produtos são considerados fontes ricas de alguns micronutrientes essenciais e fibras dietéticas, por apresentarem uma grande variedade de fitoquímicos que, individualmente ou em combinação, podem beneficiar a saúde (HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2011; VIEIRA, 2016).

De modo geral, os produtos naturais têm sido usados como uma boa alternativa para a prevenção de doenças. Devido a isto, surgiu o termo “superalimentos”, para designar alimentos com alto valor nutritivo e elevado potencial biológico. Para um alimento ser considerado um superalimento ele precisa conter uma riqueza de nutrientes como de vitaminas, minerais, fibras, proteínas, ácidos essenciais e fonte de antioxidantes (CONNELL; MARANAN, 2014).

Um dos alimentos que vem despertando interesse de consumo como superalimento é o goji berry, cientificamente conhecido como *Lycium barbarum*. Esta planta é popularmente referenciada no ocidente como “super fruta”, devido ao seu grande poder antioxidante, conferido pelos flavanóides, compostos fenólicos, β -carotenos e polissacáridos (BALLARÍN, 2011). Além da capacidade antioxidante, a medicina chinesa sugere que o uso do goji berry confere ainda outras atividades benéficas à saúde humana, como proteção da visão (CAVAZIM; FREITAS, 2018) prevenção do reumatismo (AMAGASE et al., 2009), melhora na ativação do sistema imune (VIDAL et al., 2012), além de propriedades imunomoduladoras, que inibem o crescimento tumoral (TANG et al., 2012). Diversas pesquisas estão sendo realizadas para avaliar os efeitos benéficos dos componentes químicos do goji berry e, conseqüentemente, das suas propriedades farmacológicas (POTTERAT, 2010; VIEIRA, 2016). Dentre os testes desenvolvidos para esta avaliação, os ensaios com culturas de células têm se mostrado uma ferramenta eficaz e sensível para verificar os mecanismos pelos quais extratos de plantas exercem suas atividades (MUNARI et al., 2010; JACOCIUNAS et al., 2013).

Os testes *in vitro* são considerados suficientemente informativos, particularmente para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, assim como para análise de alvos farmacológicos (MIGITA, 2012). Além disso, estudos com culturas celulares são considerados mais rápidos que os realizados com sistema *in vivo*, sensíveis e reprodutíveis, e podem utilizar vários tipos celulares, inclusive células humanas (ROGERO et al., 2003; BEDNARCZUK et al., 2010).

Um dos ensaios *in vivo* indicado como muito eficiente para avaliação toxicidade de compostos químicos é o ensaio do *Allium cepa*. Este ensaio permite avaliar mecanismos de ação e determinar efeitos biológicos de substâncias químicas (BIANCHI et al., 2011; MAZZEO et al., 2011; NUNES et al., 2011; HERRERO et al., 2012; BIANCHI et al., 2016; VENTURA-CAMARGO et al., 2016). Dentre os vegetais superiores, esta espécie tem sido considerada um teste fácil de ser aplicado, interpretado e de características citogenéticas favoráveis para avaliação de aberrações cromossômicas (KURAS et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Diversos testes são utilizados para a avaliação dos efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos, assim como protetores, antígenotóxico e antimutagênico de substâncias químicas. Dentre eles, pode-se citar o ensaio do cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE), e do teste do micronúcleo, por serem considerados simples, eficazes e de rápida aplicação e obtenção de resultados (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013).

A associação do ensaio do cometa com o teste do MN é muito utilizada para investigar e estabelecer uma correlação entre a quantidade de quebras no DNA, avaliada pelo ensaio do cometa, e a frequência de MN encontrados em células individuais (VAN GORTHEM et al., 1997). Vários estudos utilizam esta combinação com a mesma linhagem celular e também entre linhagens celulares diferentes, incluindo células animais e humanas (VAN GOETHEM et al., 1997; HARTMANN et al. 2001; MAZZEO et al. 2013; BIANCHI et al., 2015; GAJSKI et al. 2016).

Os xenobióticos podem induzir um desequilíbrio redox entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante, o que, conseqüentemente, gera um desequilíbrio redox que pode causar danos nas estruturas e constituintes celulares, principalmente nas macromoléculas, como os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (POLI et al., 2004). Sendo assim, outra análise importante é a avaliação do estresse oxidativo, uma vez que há evidências científicas de que o estresse oxidativo desempenha importante papel na etiologia de enfermidades como a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (KEANEY et al., 2003; MAYNE, 2003; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; GALILI et al., 2007; MAIESE; MORHAN; CHONG, 2007; SILVA; JASIULIONIS, 2014).

O presente trabalho avaliou a citotoxicidade e o potencial genotóxico protetor do *L. barbarum*, um nutracêutico amplamente utilizado pela população para a prevenção de doenças, para dietas de emagrecimento e anti-envelhecimento. O *L. barbarum* possui poucos estudos sobre seu potencial protetor ou danoso para a molécula de DNA, sendo, até o momento,

desconhecido seu mecanismo de ação sobre o material genético. A falta de conhecimento sobre os potenciais efeitos do *L. barbarum* sobre a molécula de DNA, somado ao consumo exacerbado deste nutracêutico pela sociedade, fica clara a necessidade de estudos que avaliem tanto as potencialidades desse material botânico ser usado em formulações fitoterápicas como para alertar a população e os órgãos fiscalizadores sanitários, sobre os efeitos desse extrato para a saúde humana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fitoterapia

A fitoterapia é uma terapêutica popular milenar, que se baseia em um conjunto de conhecimentos compartilhados por diversos praticantes e usuários (CARRARA; 1995; ELDIN; DUNFORD, 2001; ALEXANDRE; 2004; SENS, 2005; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Essa prática, que consiste no uso interno ou externo de espécies de origem vegetal, tanto “*in natura*” quanto sob a forma de medicamentos para o tratamento de enfermidades (CASTELLANO, 1981; NOGUEIRA 1984; ALVES, 2003; TEIXEIRA et al., 2012; BORGES, 2015), compõe a cultura popular de diversos países, que tem sido difundida há gerações, especialmente pela transmissão oral do saber (TEIXEIRA et al., 2012).

A base desta medicina popular envolve plantas medicinais e fitoterápicos, sendo estes dois conceitos constantemente utilizados de forma equivocada pela população, devido as suas estreitas diferenças. Segundo a OMS (1998), plantas medicinais são “(...) todo e qualquer vegetal que possui um ou mais órgãos ou substâncias que possam ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2005; SILVA, 2014; SOUZA, et al. 2016). Já os fitoterápicos são plantas medicinais processadas. Segundo a legislação sanitária, são medicamentos produzidos, exclusivamente, de matérias primas vegetais ativas, como, extratos, tinturas, óleos e ceras, que possuem eficácia e riscos de uso conhecidos (CARVALHO et al, 2007; KRATZ et al., 2008; GUILHERMINO; QUENTAL; BOMTEMPO, 2015; PIMENTEL et al., 2015).

A Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico de Saúde (Abifisa) (2014), afirma que o mercado de fitoterápicos se desenvolveu gradativamente junto ao crescimento da indústria farmacêutica. Como consequência, em 2013, atingiu 7% do mercado farmacêutico total, o que corresponde, aproximadamente, a R\$ 4 bilhões em faturamento e 202 milhões de unidades comercializadas (GUIA DA FARMÁCIA, 2013).

Diante do aumento da comercialização mundial de fitoterápicos, fica evidente o crescimento do uso de plantas como formas alternativas de tratamentos ou terapia paralela à medicina convencional. A busca por hábitos saudáveis, a fim de melhorar a qualidade de vida, aumentou consideravelmente a valorização mundial do uso de plantas medicinais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; ANDRIÃO et al., 2010; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010; ETHUR et al., 2011; OLIVEIRA, GILBERT E BÔAS, 2013; CORRÊA JR., 2014). Entretanto, para Simões et al. (1998), este aumento do interesse popular acerca dos fitoterápicos está também associado a crise econômica, ao alto custo dos medicamentos industrializados e a

falta de acesso a assistência médica e farmacêutica (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; MATSUCHITA, MATSUCHITA, 2015). Além disso, o fácil acesso, devido ao amplo comércio em locais públicos, farmácias, supermercados e outros estabelecimentos, juntamente com a crença do “natural não faz mal”, contribuem diretamente para este aumento (SIMÕES et al., 1998; COSTA, 2013, SILVA, 2014). Esta crença pode ser atribuída à influência dos meios de comunicação, com propagandas e divulgação destes medicamentos como um recurso terapêutico alternativo, isento de efeitos colaterais, desprovido de toxicidade e de contra indicações (SILVA; RITTER, 2002; BARBOSA, 2013; COSTA, 2013).

As plantas medicinais, de forma geral, possuem várias classes de fitonutrientes que apresentam propriedades anticarcinogênicas, antimutagênicas, antioxidantes e imunomoduladoras (PUNTUREE et al., 2007; BESSA, 2010; VALE, 2012). Tais compostos podem atuar como agentes protetores para a carcinogênese humana, inibindo estágios de iniciação, promoção ou progressão tumoral, além da possibilidade de atuar como bloqueadores de mutágenos, evitando que estes agentes causem lesões no DNA (BATISTA; BARATA, 2010; SLOCZYNSKA et al., 2014; SANTANA, 2016). No entanto, alguns compostos como metabólitos secundários presentes em plantas podem apresentar tanto efeitos benéficos como também efeitos adversos a saúde e/ou tóxicos (TUROLLA et al., 2006; BALBINO, 2010; LIMA-SARAIVA et al., 2015).

Como não há evidências suficientes acerca dos efeitos colaterais, para comprovação da eficácia e, conseqüentemente, da utilização segura destas plantas medicinais como forma de medicamentos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; FERRO, 2008; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2014; SILVA, 2015), torna-se evidente a necessidade de estudos que investiguem melhor as propriedades desses fitoterápicos, para que estes não promovam efeitos adversos à saúde do consumidor.

2.2 Um breve histórico da fitoterapia

O conhecimento sobre plantas medicinais, historicamente descrito em diversos culturas, está associado à sobrevivência humana, uma vez que os vegetais foram os primeiros recursos utilizados com fins terapêuticos e, algumas vezes, os únicos recursos disponíveis (ANDRADE, 2014; NASCIMENTO, 2014; GUTIERREZ, 2015). Dessa forma, acredita-se que o descobrimento das propriedades terapêuticas das plantas foi empiricamente ou seja, meramente intuitivo, baseado na busca de melhores condições e adaptações do homem no meio em que vivia (ANDRADE, 2014; NETO et al., 2014; THEISEN, 2015).

Os primeiros relatos sobre o uso de plantas medicinais foram encontrados acerca de 3000 a.C. na China, onde a população nativa se dedicava ao cultivo de ervas medicinais, a serem utilizadas para curar ou aliviar enfermidades. Sendo assim, a medicina tradicional chinesa se tornou uma das precursoras na utilização de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2010; NARDI, BONAPARTE, 2014). Entretanto, o desenvolvimento da fitoterapia não ocorreu apenas na China, mas em outros países como Egito, Grécia e países árabes.

Durante a idade média, a fitoterapia ficou estagnada por um longo período, devido a interferência igreja católica que manteve os conhecimentos sobre plantas medicinais em seu poder nas bibliotecas de mosteiros. Além disso, as pessoas que tentavam manter a prática de cura por meio de plantas eram consideradas feiticeiros ou bruxas pela igreja católica. Ou seja, a igreja católica condenava o pensamento científico, pois acreditava que as doenças eram uma forma de castigo (COSTA, 2010; DEVEZA, 2014; MARANHÃO, 2014). Como consequência, o desenvolvimento da fitoterapia restringiu-se aos persas e árabes (OLIVEIRA, 2013; BORGES, 2015).

Com o passar do tempo, durante a idade moderna, a botânica recebeu destaque, devido a vários estudos desenvolvidos em isolamento e determinação da estrutura química dos constituintes de plantas e sobre as propriedades medicinais dos vegetais (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2013; GADELHA et al., 2013

Desde o século XIX até os dias atuais, a maioria dos estudos acerca de fitoterápicos estão voltados para o isolamento e identificação de substâncias (SOUZA, 2013; PIRES, 2014; CORREIA, 2015), que são de fundamental importância para a o desenvolvimento e avanço da fitoterapia, uma vez que essas informações podem ser utilizadas para estudos de toxicidade, estabilidade nas condições de uso, dosagem, efeitos fisiológicos e genéticos (BRAZ FILHO, 2010; DUARTE, 2013).

2.3 *Lycium barbarum*

2.3.1. Aspectos gerais

O *Lycium barbarum*, popularmente conhecido como goji berry, é uma espécie arbustiva decídua e frutífera, pertencente à família da *Solenáceas*, comumente encontrada em zonas áridas e semiáridas, devido a sua tolerância a seca e ao sal. (XU et al., 2002; ZHENG et al., 2010).

Os arbustos do *L. barbarum*, que podem chegar até 3 metros de altura, possuem folhas lanceoladas verdes e cinzas, caule ascendente ou ereto de coloração marrom acinzentado pálido,

com poucos espinhos, cálice e pistilos fusionados, além de acorola em forma de funil, com coloração violeta ou roxo claro. Estes produzem frutos fusiformes de coloração vermelho-alaranjado, com aproximadamente 1-2 cm de comprimento, 3 a 8 mm de diâmetro, com alto teor de suco (BENSKY & GAMBLE, 1993; BRYAN et al., 2008; CHANG & BUT, 2001; ZHU, 1998; ZHONG; SHAHIDI; NACZK, 2012), que são amplamente utilizados nos países asiáticos como uma planta tradicional da medicina herbal chinesa e como alimento funcional nos países ocidentais. Os frutos podem ser ingeridos frescos, secos, embebidos em álcool, na forma de licor, ou como condimento usado no cozimento do arroz. Porém, a forma de fruto seco é a mais conhecida e utilizada tradicionalmente em países asiáticos como China, Coreia, Japão, Vietnã, Tailândia e Tibet, há mais de 4500 anos (BENSKY & GAMBLE, 1993; CHANG & BUT, 2001; WANG, 2010; ZHU, 1998).

O *L. barbarum* cresce naturalmente na Ásia, mais especificadamente no noroeste da China, em Qinghai, Gansu, Ningxia, Mongólia, Tibete e Xinjiang. A região de destaque, na qual esta planta é extensivamente cultivada, é a província de Ningxia, uma pequena região autônoma anteriormente parte do Gansu na China (BENSKY & GAMBLE, 1993; WU, 2005; ZHU, 1998). Nestas regiões, as frutas são recolhidas no verão e no outono, secas na sombra até, murcharem, e expostas ao sol para que a camada externa se torne seca e dura, e a polpa macia (ZHU, 1998). Entretanto, a origem do *L. barbarum* ainda é desconhecida, possuindo apenas alguns relatos referentes a sua utilização na China, onde os frutos são popularmente conhecidos como goji berry ou wolfberries (AMAGASE & FARNSWORTH, 2011).

2.3.1 Principais compostos bioativos do *Lycium barbarum*

Os compostos bioativos são substâncias químicas responsáveis pelas propriedades funcionais dos alimentos, que desempenham diversas atividades biológicas importantes à saúde humana (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Há na literatura vários estudos envolvendo a investigação e identificação dos constituintes de *L. barbarum*, utilizando principalmente o fruto tanto seco quanto *in natura* (POTTERAT, 2010).

Donno et al. (2014) identificaram cerca de 17 compostos bioativos em extratos de *L. barbarum*, sendo os ácidos orgânicos (76,82%), polifenóis (16,20%), monoterpenos (6,13%) e vitaminas (0,84%), os compostos mais abundantes. Já Benlloch et al. (2015) identificaram 18 aminoácidos no *L. barbarum* sendo 8 deles essenciais como a isoleucina e triptofano, 21 oligoelementos, incluindo o zinco, o ferro, o selênio e germânio, além de alto teor de proteína e carotenoides antioxidantes, como β -caroteno, zeaxantina, luteína, licopeno, criptoxantina e xantofilas.

Pelos componentes que possuem, os frutos de *L. barbarum* são considerados os mais ricos em macro e micronutrientes (DONG et al., 2012). Esses frutos possuem a maior concentração de vitamina C, (500 vezes mais vitamina C do que a laranja), além das vitaminas B1, B2, B6, fitonutrientes, ácidos graxos essenciais e uma grande quantidade em fibra (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010). Foram identificados em extratos de *L. barbarum* saponificado e não saponificado, por Inbaraj et al. (2008), 11 carotenóides livres e 7 ésteres de carotenóides, sendo a zeaxantina a mais abundante desta classe química. Inbaraj et al. (2010) também identificaram em extrato de *L. barbarum* quercetina-rhamno-di-hexossídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, isômeros de ácido dicaffeoilquinico, ácido clorogênico, quercetina-di-(rhamnohexósido), quercetina-di (rhamno)-hexósido, kaempferol-3-O-rutinosídeo, isorhamnetin-3-O-rutinosídeo, ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido vanílico.

O *L. barbarum* também apresenta outros componentes em menores quantidades, como a glutamina; asparagina; estigmasterol; campesterol; colestanol; 28-isofucosterol; 24-metilcolsta-5,24-dienol; 24-etilcolsta-5,24-dienol; 31-norcicloartanol; 31 norcycloartenol; cicloeucalenol; obtusifoliol; 4a, 14a, 24-trimetilcolsta-8'24-dienol; 4a-metilcolest-8-enol; 4-metil-colesterol-7-enol; 24-etilofenol; 4,24 -metilofenol; gramisterol; citrostadienol; 4a-metil-24- etilcolsta-7,24-dienol; lanost-8-enol; cicloartanol; lanosterol; bamyryn; lupeol; 24-metilenelanost-8-enol; 24-metilenecicloartanol; taurina e ácido gama-aminobutanóico. K, Ca, Zn, Co, Mn assim outros minerais nas formas inorgânicas (NHI, 2007).

Atualmente, em função dos benefícios proporcionados pelos compostos bioativos e outros componentes do fruto de *L. barbarum*, vem sendo desenvolvidos muitos estudos de identificação e confirmação das propriedades farmacológicas desse material botânico. A maioria dessas pesquisas comprovam atividades biológicas para os componentes de *L. barbarum* (BRYAN et al., 2008).

2.3.2 Estudos clínicos e farmacológicos com *Lycium barbarum*

Estudos recentes sugerem que o *L. barbarum* possui atividades benéficas a saúde humana. Estudos clínicos, realizados por Amagase et al. (2008), com adultos saudáveis (faixa etária de 55 a 72 anos), mostraram que o tratamento por 30 dias com polissacarídeos de extrato de *L. barbarum* aumentaram, significativamente, os níveis de superóxido dismutase (SOD) em 8,4%, e glutathione peroxidase, em 9,9%, e conseqüentemente, diminuíram a concentração de malondialdeído, em 8,7%. Diante disto, os pesquisadores sugeriram que os polissacarídeos do extrato de *L. barbarum* podem ser usados para estimular fatores endógenos que protegem as células humanas contra danos de radicais oxidativos.

Outro estudo clínico foi realizado com 75 pacientes, portadores de vários tipos de cânceres em estado avançado. Os pacientes foram divididos em dois grupos distintos, no qual um deles recebia a combinação da terapia com IL-2/ativação de linfocinas (LAK) e polissacarídeos de *L. barbarum* e outro apenas a terapia com IL-2/LAK. Os resultados demonstraram taxas de resposta significativamente maiores para o tratamento com a associação de *L. barbarum* e maiores taxas de remissão da doença, que a terapia sem os polissacarídeos. Entretanto, as informações fornecidas sobre o design experimental do estudo e os suplementos de *L. barbarum* incluídos na dieta são insuficientes para avaliar a total relevância dos dados (CAO; YANG; DU, 1994). Apesar da insuficiência de dados da pesquisa de Cao; Yang; Du (1994), outros estudos (LI et al., 2009) demonstraram que o extrato aquoso de *L. barbarum* inibiu o crescimento da linhagem celular MCF-7 (câncer de mama humano positivo ao receptor de estrogênio). O resultado foi atribuído a alteração do metabolismo celular do estradiol, sendo este sugerido como o principal mecanismo de ação do extrato.

Gong et al., (2005) destacou as propriedades hematopoiéticas do *L. barbarum* como um potencial a ser usado como adjuvante na terapia do câncer. Ratos mielosuprimidos induzidos por irradiação ou quimioterapia foram tratados (injeção subcutânea) com solução de *L. barbarum*. Os resultados mostraram que houve um abrandamento na diminuição de células da série vermelha e branca do sangue, o que os autores atribuíram à indução de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), para produzir fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF).

As propriedades imunomoduladoras de *L. barbarum* vem atraindo atenção da comunidade científica para o desenvolvimento de um coadjuvante na imunoterapia contra câncer. Há evidências de que os polissacarídeos do *L. barbarum* atuam na expressão aprimorada de várias citocinas e fatores de transcrição, como o complexo proteína-polissacarídeo LbGp4, o qual estimula a expressão do fator nuclear κB (NF κB) e o ativador da proteína 1 (AP-1) (PENG et al., 2001). Outro polissacarídeo, o LBP3, aumentou a expressão da interleucina-2 (IL-2), do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e proteína de culturas de células de sangue periférico humano (GAN et al., 2003).

Gan et al., (2004) apontam que as atividades imunoestimuladoras do *L. barbarum* provavelmente sejam decorrentes de mecanismos de ação das propriedades antitumorais. Estes pesquisadores verificaram que o polissacarídeo LBP3p foi capaz de inibir significativamente o crescimento do sarcoma S180 transplantado em camundongos, pela estimulação da proliferação linfocitária no baço, aumento a atividade das células T citotóxicas e da fagocitose nos

macrófagos. O polissacarídeo LBP3p também aumentou o nível de expressão do RNAm para o hormônio leucocitotrófico IL-2 e os anticorpos secretados pelas células esplênicas.

Zhang et al. (2005) demonstraram, em linhagem celular de hepatoma humano, que os polissacarídeos presentes em extratos de *L. barbarum* podem inibir a proliferação celular, promovendo a parada do ciclo celular na fase S e levando a morte celular por apoptose. De forma similar, Liu et al. (2000) também relataram a inibição da proliferação de células da linhagem celular de câncer de próstata PC3, que os autores atribuíram a ação da escopoletina, um componente presente em *L. barbarum*.

O *L. barbarum* também está associado com a proteção celular, como descritos nos estudos de Bian, She, Wang (1996). Os autores observaram, após a administração de *L. barbarum* por perfusão estomacal em ratos, por sete dias, uma inibição de danos no retículo endoplasmático, conferido pelo aumento da síntese de proteínas de desintoxicação. Essas proteínas ocasionaram, a restauração da função normal de células hepáticas e, conseqüentemente, a regeneração do tecido. Estudos desenvolvidos por Wu, Guo, Zhao (2006) e Li (2007) também mostraram efeitos protetivos dos componentes do goji bery para os constituintes celulares. Nesses estudos, foram observados que a administração oral de extrato de *L. barbarum*, em ratos diabéticos, induziu proteção ao estresse oxidativo induzido por estreptozotocina.

Estudo desenvolvidos com linhagens celulares testiculares (XIN et al., 2012) e neurais (CHEN, et al. 2014) confirmam o efeito protetor dos componentes de *L. barbarum*. Xin et al., (2012), verificaram um efeito protetor dos polissacarídeos do *L. barbarum* contra a toxicidade induzida por doxorubicina em testículos de ratos. Em estudo semelhante, Chen et al. (2014) constataram evidências de efeitos neuroprotetores dos polissacarídeos do *L. barbarum*, contra estresse oxidativo induzido pela droga escopolamina. Além disso, os autores demonstraram a reversão da razão Bax/Bcl-2, o que indica uma ação protetora contra déficits cognitivos e de memória.

Estudos *in vitro*, realizados com diferentes linhagens celulares, HeLa (ZHU & ZHANG, 2013); SW480 e Caco-2 (MAO et al., 2011) e células de câncer de fígado humano SMMC-7721 (ZHANG et al., 2013) indicaram possíveis efeitos antiproliferativos promovidos pelo *L. barbarum*. Zhu e Zhang (2013), confirmaram que os componentes do *L. barbarum* tem ação antiproliferativa para estas células.

Zhu e Zhang (2013) verificaram um efeito inibidor de proliferação celular, conferido pelos polissacarídeos do *L. barbarum* sobre células HeLa, da ordem de 35%. Esses dados foram confirmados pelo acúmulo significativo de células na fase S (46,9% -59,4%) e sub-G₁ (3,1% -

5,0%), o que os autores consideraram como indicativo de mecanismo de apoptose. As linhagens celulares SW480 e Caco-2, também tiveram sua proliferação inibida de forma dose dependente de *L. barbarum*, para concentrações testadas de 100 a 1000 mg/L. Ambas as linhagens celulares de câncer colorretal estacionaram na fase G₀/G₁, confirmada pela diminuição na fase S, devido a alterações na via de modulação dos reguladores críticos do ciclo celular (MAO et al., 2011). Já a linhagem celular de câncer de fígado humano SMMC-7721, submetida a tratamento com diferentes frações de *L. barbarum*, às doses de 50 a 400 mg/L apresentou efeitos distintos sobre a proliferação, distribuição do ciclo celular e indução de apoptose, após 2 dias, 4 dias e 6 dias de exposição (ZHANG et al., 2013)

Os dados aqui apresentados sobre os efeitos benéficos do *L. barbarum*, corroboram com os conhecimentos populares da medicina chinesa milenar, transmitida por gerações. Entretanto, apesar dos diversos estudos realizados com este fitoterápico, ainda há uma necessidade eminente de mais ensaios clínicos, que possam comprovar a eficácia deste nutracêutico para humanos, bem como para uma melhor compreensão de sua farmacocinética, dos seus mecanismos de ação e possíveis efeitos colaterais.

2.4 Antimutagênese

Atualmente, o ser humano está exposto a várias substâncias, tanto naturais como sintéticas, que podem causar riscos à sua saúde humana. Dentre elas, estão os agentes genotóxicos e/ou mutagênicos, que podem induzir alterações no DNA e favorecer o desenvolvimento de tumores. Contudo, embora muitas substâncias apresentem potencial deletério para as células, existem outras que são capazes de proteger as células de eventuais efeitos danosos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

A quimioproteção é o processo pelo qual um agente químico reduz danos no meio biológico, causados por agentes tóxicos. Dentre os quimioprotetores, estão os agentes antimutagênicos, que são compostos cuja ação reduz a frequência de mutações induzidas tanto de forma espontâneas como por xenobióticos (WATERS et al., 1990; ODIN, 1997).

O potencial antimutagênico de um composto pode ser avaliado por meio de ensaios desenvolvidos em diversos sistemas biológicos, que podem ser até os mesmos utilizados para estudos de identificação de agentes mutagênicos. Os testes com mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem tanto ensaios realizados *in vitro* quanto *in vivo* (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Os estudos com agentes antimutagênicos se iniciaram na década de cinquenta, porém, só recentemente ganharam destaque nas pesquisas. Dentre as avaliações realizadas atualmente

por ensaios de antimutagenicidade, muitos são com plantas ou compostos naturais que apresentam propriedades medicinais, como a cúrcuma (ANTUNES et al., 2000), a própolis verde (ROBERTO, 2009), *Aloe vera* (STURBELLE et al., 2010), *Costus spicatus* (SAITO et al., 2016), *Salacia crassifolia* (CARNEIRO et al., 2017). Estes estudos têm o objetivo, além de avaliar as possíveis propriedades antígenotóxicas e/ou antimutagênicas de agentes naturais, que possam prevenir, controlar ou inibir efeitos adversos à molécula de DNA, avaliar os efeitos que esses compostos considerados antimutagênicos possam desencadear nos organismos que se expõe a eles e comprovar os reais efeitos benéficos dos mesmos (RHEE; PARK, 2001).

2.5 Sistema testes *in vitro* e *in vivo*

2.5.1 *Allium cepa*

O sistema teste *Allium cepa* é um excelente bioindicador para avaliar efeitos citotoxicogénéticos de diversos agentes químicos, devido as características possui, como cinética de proliferação rápida, alto crescimento de suas raízes e grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n = 16$) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; RANK; NIELSEN, 1997; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, este sistema possui baixo custo e confiabilidade/equivalência com os mais conceituados testes de citogenotoxicidade. O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) validaram o sistema teste *A. cepa* como um instrumento de extrema eficiência para o monitoramento, *in situ*, da genotoxicidade de substâncias químicas (FACHINETTO et al, 2007). Sendo assim, a espécie *A. cepa* se tornou a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982).

De uma forma geral, o sistema teste *A. cepa* é considerado um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da citogenotoxicidade de plantas medicinais, devido a sua sensibilidade e exatidão. Consequentemente, há uma crescente utilização de ensaios com este organismo, para avaliar os efeitos de substâncias consideradas, pelo conhecimento popular, curativas e não nocivas à saúde, mas que podem causar danos a saúde (BAGATINI et al, 2007).

As análises referentes a citogenotoxicidade e mutagenicidade de uma substância pode ser estimada por meio da avaliação do índice mitótico (razão entre as células em divisão celular/número de células observadas) e de aberrações cromossômicas em células

meristemáticas de *A. cepa* (FERNANDES et al., 2007), além da presença de micronúcleos em células F₁.

A diminuição do índice mitótico (IM) sugere que a substância teste pode interferir, negativamente, nos processos de crescimento e desenvolvimento, enquanto que IM elevados podem indicar que a substância tem potencial para induzir a proliferação, característica estar comum em processos de tumorização (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009). As aberrações cromossômicas (AC) são observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* em qualquer fase do ciclo celular. De acordo com o tipo de AC encontrado durante as análises, pode-se inferir o modo de ação do agente investigado podendo este ser indutor de efeitos aneugênico e/ou clastogênico (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002).

Segundo Fiskesjö (1985), resultados positivos obtidos pelo teste de *A. cepa* são possíveis indicações de que a substância testada também pode causar danos biológicos a outros organismos, uma vez que esta espécie apresenta uma alta correlação com os outros sistemas biológicos utilizados para a mesma função (CHAUHAN et al., 1999; RANK; NIELSEN, 1994; TEIXEIRA et al., 2003). Devido a estes conhecimentos, Roberto (2006) sugeriu a utilização do sistema-teste de *A. cepa* para testes de antimutagenicidade.

2.5.2 Cultura de células

Os ensaios *in vitro*, em especial os realizados com cultura de células de mamíferos, constituem uma importante ferramenta de investigação na área da toxicologia (LEWINSKA et al., 2007) e apresentam diversas vantagens frente aos testes *in vivo*. Sistemas *in vitro* simulam o ambiente *in vivo*, reproduzindo e conservando as características fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos tecidos originais (ZUCCO et al., 2004). Sendo assim, são considerados uma alternativa viável para substituir o uso de animais em testes realizados em laboratório (ROGERO et al., 2003).

As vantagens de se utilizar essa técnica estão relacionadas com a praticidade do delineamento experimental, no qual é possível limitar o número de variáveis; padronizar facilmente os ensaios, manipular e controlar as condições do teste; obter resultados significativos em curto período de tempo; utilizar pequenas quantidades de células (CARVALHO, 1996; ROGERO et al., 2003) e, conseqüentemente, reduzir a quantidade de animais experimentais e os custos operacionais e de infra-estrutura (BRUSICK, 1987; CARVALHO, 1996; ZUCCO et al., 2004; LEWINSKA et al., 2007). Além disso, o uso de ensaios *in vitro* possibilita também direcionar os efeitos tóxicos da substância teste para órgãos alvos específicos (ZUCCO et al., 2004), avaliando assim, o mecanismo de ação de

xenobióticos, o que possibilitando estimar a sua ação direta ou indireta sobre o DNA (TAKAHASHI, 2003).

As culturas de células de mamíferos são amplamente utilizadas nos estudos de avaliação da mutagenicidade (COSTA et al., 2008) e antimutagenicidade (BELLINI et al., 2006) de extratos orgânicos. No entanto, Morales (2008) sugere que os estudos desenvolvidos com linhagens celulares também devem ser realizados em sistemas *in vivo*, a fim de confirmar os efeitos encontrados *in vitro*. Segundo a autora, o organismo completo pode responder de forma diferente das células isolada, devido as interações fisiológicas entre os diversos tecidos e órgãos, o que pode levar a variações nos resultados.

As linhagens celulares derivadas de tecido humano são consideradas mais confiáveis para a avaliação de riscos toxicológicos a serem extrapolados para seres humanos. Dentre as linhagens utilizadas na toxicologia, destacam-se as células de hepatoma humano (HepG2), por estas apresentarem uma intensa atividade e expressão de enzimas relacionadas à metabolização de substâncias químicas (ZUCCO et al., 2004), o que as tornam um poderoso sistema-teste para detecção *in vitro* (KNOWLES; HOWE; ADEN, 1980; GUILLOUZO, 1998; SINZ, 1999).

A principal vantagem de se utilizar essa linhagem celular, está relacionada a similaridade de suas características com as células humanas *in vivo* (VAN DER WATER et al., 2011). Estas células conservam a maior parte das funções dos hepatócitos humanos (NAJI-ALI et al., 1994) e apresentam morfologia bastante semelhante a eles. A linhagem HepG2 também possui sistema de metabolização que inclui atividades enzimáticas de Fase I e II, as quais podem promover a ativação e desintoxicação de substâncias químicas reativas ao DNA (KNASMÜLLER et al., 1998; 2004). Sendo assim, a cultura desta linhagem celular é considerada um eficiente sistema teste, para ser aplicado em ensaios que avaliam o potencial citotóxico e genotóxico de diversas substâncias (WESTERINK et al., 2010; LEME et al., 2011; LIU et al., 2012).

Vários tipos celulares têm sido isolados com sucesso, aumentando as possibilidades de uso de culturas celulares para avaliação da ação de xenobióticos. Outra linhagem celular também muito utilizada para este fim é a de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Essa linhagem tumoral foi estabelecida na década de 70, a partir de células tumorais provenientes de efusão pleural, originadas de tumor metastático de câncer de mama. As células desta linhagem apresentam receptor para estrógeno, são resistentes a uma variedade de drogas (SIMSTEIN et al., 2003; JÄNICKE, 2009) e apresentam tumorigenicidade, quando implantadas em camundongos, porém pouco invasivas (ZAJCHOWSKI et al., 2001). Além disso, elas mantêm várias características do epitélio mamário diferenciado, incluindo a capacidade de processar o

estradiol por meio de receptores de estrogênio citoplasmáticos e a capacidade de formar cúpulas. Por essas características, elas são muito utilizadas em estudos *in vitro* de câncer de mama (MORANTES et al., 2007).

2.6 Biomarcadores

2.6.1 Teste de aberrações cromossômicas (AC)

O teste de aberrações cromossômicas realizados com células meristemáticas de *A. cepa* é amplamente utilizado em diversas pesquisas que avaliam o potencial citotóxico, genotóxicos e mutagênico e para compreender os mecanismos de ação de várias substâncias químicas (FISKESJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1994; BIANCHI et al., 2011; BAKARE et al., 2012; ARORA et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015; MAZZEO et al., 2015; VENTURA-CAMARGO et al., 2016). Este teste, que é baseado na citogenética clássica, é citado como o mais utilizado e um dos poucos capazes de avaliar mutações em células expostas a substâncias com potencial carcinogénico (RANK et al., 2002).

De uma forma geral, os testes citogenéticos são eficientes para verificar os efeitos danosos de uma substância, em suas diferentes concentrações e após tempos variados de exposição. Estes testes também são importantes para avaliar influência dos xenobióticos sobre os organismos (AL-SABTI & KURELEC, 1985; AL-SABTI, 1989; ABDU et al., 1989; ARRIGONI et al., 1989; KAK & KAUL, 1989; KUMAR & SINHA, 1989; RAO, 1989; CHAUHAN & SUNDERARAMAN, 1990; PANDA et al., 1990; KUMAR et al., 1989).

As aberrações cromossômicas são alterações, espontâneas ou induzidas por agentes físicos/químicos (RUSSEL, 2002), que ocorrem na estrutura ou no número de cromossomos das células expostas a uma dada substância de interesse de avaliação (GRANT, 1982; GRANT, 1994; FISKEJÖ, 1985; NIELSEN & RANK, 1994). Fernandes et al. (2009) sugere que as alterações cromossômicas podem ser consideradas evidências de efeitos genotóxicos e mutagênicos, induzidos por agente clastogênicos e/ou aneugênicos.

De acordo com Fenech (2000), os agentes químicos e físicos podem promover AC ou por ação aneugênica, quando a interação do agente se dá com estruturas citoplasmáticas, ou por ação clastogênica quando a interação acontece com a molécula do DNA. Segundo Fiskesjo (1993), as quebras cromossômicas estão relacionadas com a formação de fragmentos acêntricos, que podem formar MN nas próximas gerações celulares, enquanto que a ação aneugênica pode inativar o fuso mitótico e conseqüentemente, gerar células c-metafásicas (FISKESJO, 1985; FISKESJO, 1993).

Além das perdas cromossômicas, a ação aneugênica também pode acarretar uma segregação inapropriada dos cromossomos durante a divisão celular e resultar em uma sequência de eventos que levam as várias alterações cromossômicas (SAUNDERS et al., 2000, FERNANDES et al., 2009) como, células binucleadas, poliploidias, C-metáfese, aderências cromossômicas, células com núcleos lobulados e anáfases multipolares (FERNANDES et al., 2009).

As células poliploides são decorrentes de falha no fuso mitótico e inibição da citocinese. Pelas falhas do fuso, os cromossomos não migram para os polos das células e, por falhas nas estruturas relacionadas com a citocinese (fragmoplasto das vegetais e estruturas contrácteis em animais), o material genético não se segrega para polos opostos, caracterizando assim um único núcleo celular poliploidizado. (VIDAKOVIĆ-CIFREK, et al., 2002; FERNANDES et al., 2009).

A multipolaridade ocorre, durante a anáfase ou telófase, como consequência de um desequilíbrio do aparelho mitótico, que ocasiona a divisão dos centros organizadores de microtúbulos sem a haver segregação cromossômica. Após a normalização da divisão celular, os centros organizadores estão amplificados, gerando mais de dois polos para receberem, no próximo evento de divisão celular desta célula, os cromossomos em migração, dando origem, assim, às células multinucleadas (FERNANDES et al., 2009).

Outras alterações observadas no teste de aberrações cromossômicas são aneuploidia, pontes, brotos e aderências. A aneuploidia está relacionada com a inativação parcial do fuso mitótico, que decorre em perda de cromossomos inteiros, os quais ficam dispersos no citoplasma (SHAMINA et al., 2003). Já as pontes surgem quando os cromossomos dicêntricos são tracionados para polos opostos, sem haver rompimento da estrutura cromossômica, mantendo os núcleos filhos ligados por uma ponte cromatínica (UMEGAKI et al., 2000; FERNANDES et al., 2009).

Os brotos são derivados da ação do mecanismo de reparo celular, que eliminam o DNA amplificado do núcleo (FENECH; CROTT, 2002). Alguns autores, como Shimizu et al (1998; 2000) e Fernandes (2007), caracterizaram esse evento como um processo ativo do material amplificado localiza na periferia do envoltório nuclear.

Por fim, as aderências cromossômicas são danos irreversíveis, promovidos por inativação total dos fusos mitóticos (FERNANDES et al., 2009), resultantes da ação de um agente tóxico sobre a célula. Essa AC, geralmente está associada a mecanismos tóxicos que levam à morte celular (MARCANO et al., 2004; GÖMÜRGEN et al., 2005; TÜRKOĞLU, 2007).

Segundo Houk (1992), os resultados obtidos em bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana, pois o alvo de estudo é o DNA, estrutura esta comum a todas as células vivas. Desta forma, é possível inferir que compostos reativos com o DNA de uma espécie têm o potencial de agir de forma semelhante em outras espécies. Em geral, as alterações provocadas no material genético, como as aberrações estruturais e numéricas, são deletérias para o organismo e podem ocasionar alterações à saúde humana, como neoplasias e anormalidades congênitas de recém-nascidos. (NATARAJAN, 2002)

2.6.2 Teste de citotoxicidade – MTT

Os testes de citotoxicidade são ferramentas importantes para investigar se um determinado agente influencia na viabilidade celular. Esses testes são necessários de serem desenvolvidos antes de outros ensaios celulares, como os de mutagenicidade, indução de apoptose, de patologias celulares e, até mesmo, de toxicidade de drogas farmacêuticas (KOMISSAROVA et al., 2005).

Atualmente, dentre os ensaios para avaliar a citotoxicidade de compostos isolados ou em misturas, se destaca o ensaio colorimétrico do MTT que, por ser um dos testes mais versáteis, rápidos, precisos e baratos, é também um dos mais utilizados em pesquisas para este fim. Dentre os seus usos estão a avaliação de citotoxicidade, proliferação ou a ativação celular (MOSMANN, 1983).

O teste do MTT se baseia no metabolismo celular, onde células metabolicamente ativas absorvem o sal 3-(4,5-dimethylthiazolil-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), um corante amarelo, e o reduzem a cristais de formazan 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan, de coloração roxa, dentro das suas mitocôndrias. Sendo assim, o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células, ou seja, a quantidade de formazan gerada é proporcional à quantidade de células vivas, dados estes que podem ser medidos espectrofotometricamente (HOLST; OREDSSON, 2005).

Em geral, o ensaio do MTT mede danos induzidos por um dado composto/extrato no metabolismo celular de glicídeos, uma vez que este metabolismo é fundamental para a geração dos elétrons, que serão responsáveis pela redução do MTT a formazan. Assim, quando as células sofrem algum dano decorrente do contato com as amostras testadas, o metabolismo dos glicídeos é alterado, levando a uma queda/bloqueio da produção de elétrons o que, conseqüentemente, não permite ou diminui a redução do MTT a formazan (BERRIDGE, HERST, & TAN, 2005).

Este teste vem sendo utilizado previamente em diversas análises como as de citotoxicidade de efluentes, águas superficiais e tratadas (ZEGURA et al., 2009), microcontaminantes após o tratamento avançado do efluente com O₃ e UV/H₂O₂ (RICHARD et al., 2013), de compostos químicos (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; MCGUIGAN & LI, 2014), fármacos (AYAKI et al., 2010; ALLEN et al., 1991).

2.6.3 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis Assay (SCGE) é considerado um eficiente teste para avaliação de genotoxicidade, pela sua rapidez, simplicidade e sensibilidade em detectar danos no DNA de células individuais, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (PAVLICA et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Este teste permite detectar danos genético das células, promovidos por agentes capazes de induzir quebras na estrutura do DNA (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013). Sua análise baseia-se na observação de lâminas preparadas com células expostas a um determinado agente a ser investigado, que foram submetidas a uma corrida de eletroforese. As células com quebras no seu material genético, terão seus fragmentos deslocados, em relação à posição da cabeça do nucleóide, formando uma figura semelhante a um cometa (BAJPAYEE et al., 2013).

Outra vantagem do ensaio do cometa, desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e por Speit et al. (2009), está na capacidade que esta técnica possui em detectar baixos níveis de danos, bem como reparos, no DNA. Além disso, requerer um pequeno número de células, não necessitando que estas estejam em divisão, o que permite que o teste seja desenvolvido em qualquer fase do ciclo celular (PAVLICA et al., 2001).

De acordo com Singh et al. (1988), o ensaio do cometa é capaz de detectar quebras de fita simples ou dupla, lesões de sítios alcali-lábeis, locais incompletos e crosslinks (BRIANEZI, CAMARGO, MIOT, 2009). Entretanto, segundo Tice et al. (2000), o ensaio do cometa, realizado com o pH > 13, é o mais recomendado para ser utilizado em testes de genotoxicidade, uma vez que o pH alto maximiza a expressão de sítios álcali-lábeis e quebras de fitas simples de DNA.

O ensaio do cometa vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para avaliar, *in vitro* e *in vivo*, a genotoxicidade de diversos compostos químicos em várias linhagens celulares, normais ou transformadas (PATEL et al., 2007; MAZZEO et al., 2013; CAVALCANTE et al., 2014; MANZANO et al., 2014; BIANCHI et al., 2015). Estudos realizados por Matsumoto et al. (2005) e por Ventura et al. (2008) confirmam a alta sensibilidade do ensaio do cometa na

detecção de danos e demonstram a compatibilidade entre este teste com outros métodos de avaliação de genotoxicidade. Bianchi (2008) destacou ainda que o ensaio do cometa foi mais sensível que o teste do micronúcleo, para avaliar, em células da linhagem HTC, os efeitos do inseticida malation.

2.6.4 Teste do MN

O teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese é um ensaio citogenético eficaz, tanto *in vivo* como *in vitro*, para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas (HEDDLE et al., 1983). Este teste pode verificar tanto a ação de agentes clastogênicos (quebram cromossomos) como de ação aneugênica (induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MAC GREGOR et al., 1987).

Um dos principais parâmetros analisados neste teste são os micronúcleos (MN), os quais correspondem a estruturas circulares, compostas por massas de cromatina, de aproximadamente 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula, que apresentam a mesma refringência do núcleo (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Em geral, os MNs são resultantes da condensação de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros, que se quebraram ou se perderam durante o processo de divisão celular e não foram incorporados a nenhum dos núcleos das células-filhas (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo é considerado uma técnica de avaliação de mutagenicidade eficaz, de fácil análise e aplicável tanto em testes *in vivo* como *in vitro* (HEDDLE et al., 1983). Esse ensaio tem sido amplamente usado em testes *in vitro* (FENECH, 2000), com diferentes linhagens celulares, como as CHO (OLIVEIRA et al., 2007), HTC (COSTA et al., 2008), HepG2 (MIYAJI et al., 2006) e HeLa (JAGETIA; ARUNA, 2003).

Nos ensaios de micronúcleo *in vitro*, é necessária a utilização da citocalasina B, que é um inibidor da polimerização da proteína actina, que é requerida para a formação do anel contrátil, que induz a divisão da célula (citocinese). Essa substância bloqueia a divisão celular sem impedir a divisão nuclear, resultando, então, em células portadoras de dois núcleos. Dessa forma, há um acúmulo de células binucleadas, obtidas de células que passaram por um ciclo de divisão nuclear. A análise dos MN dessas células binucleadas permite avaliar o seu potencial mutagênico da substância testada (FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

2.6.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo que ocorre devido ao desequilíbrio entre as concentrações de agentes pró-oxidantes e a capacidade antioxidante da célula, gerando uma excessiva quantidade de radicais livres, associado a uma baixa velocidade de remoção dos mesmos (BARBOSA et al, 2010). Os radicais livres possuem a capacidade de reagirem com as biomoléculas e, conseqüentemente, ocasionar perda de funções biológicas e/ou a alteração do equilíbrio homeostático, que se manifesta em forma de danos nas células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

As células estão constantemente expostas a uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de radicais livres, tanto de origem endógena como exógena, gerados nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma (KOHEN; GATI, 2000).

As EROS e os radicais livres podem induzir efeitos prejudiciais às constituintes da membrana celulares, aos ácidos nucleicos, aos lipídios, às proteínas e a outros componentes celulares (POLI et al., 2004). Segundo Kohen e Nyska (2002), os lipídeos das membranas biológicas, as proteínas e o DNA são os alvos mais vulneráveis às EROS.

Os danos que ocorrem aos lipídeos são denominados de peroxidação lipídica, o qual pode desestruturar a organização de membranas biológicas, devido a mudanças na sua fluidez e permeabilidade, ocasionando tanto a inibição de processos metabólicos como alterações no transporte de íons (NIGAM; SCHEWE, 2000). Os produtos da peroxidação lipídica podem ser quebrados e resultarem na formação de diversos aldeídos reativos, como malondialdeído (MDA). Estes aldeídos também podem reagir com o DNA, ocasionando modificação nas bases nitrogenadas, perda de purinas (sítios apurínicos), danos na desoxirribose, quebras de fita simples e duplas, ligação cruzada DNA-proteína e danos no mecanismo de reparo do DNA (KOHEN; NYSKA, 2002).

Um dos métodos para a avaliação da peroxidação lipídica mais utilizado é a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), especialmente, o malondialdeído (MDA) (KOHEN; NYSKA, 2002).

Em geral, as EROS podem causar diversos tipos de danos no DNA, que podem resultar na formação adutos que induzem mutações e alterações nos padrões de expressão gênica, como atraso ou indução do processo de transcrição, indução das vias de transdução de sinais, erros de replicação e morte celular (VALKO et al., 2006; KLAUNIG et al., 2011).

Devido aos efeitos deletéricos das EROS, os organismos possuem sistemas para inativar e/ou bloquear estas espécies reativas e, assim, controlar a ocorrência de danos oxidativos celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SHAMI; MOREIRA, 2004). Este sistema pode ser

dividido em duas classes de antioxidantes: o sistema não enzimático, constituído por vitaminas A, C e E, carotenóides, flavonóides, antioxidantes tíois, uratos, além de outros compostos (MCCALL; FREI, 1999; ZIECH et al., 2010), e o sistema enzimático, constituído pelas enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) (POWERS et al., 1994).

A análise do nível de estresse oxidativo pode ser feita de diversos modos, dentre eles, os mais usuais incluem a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes e averiguação dos danos celulares causados pelas espécies reativas (BARBOSA et al., 2010). Sendo assim, os biomarcadores bioquímicos são extensivamente utilizados para essas avaliações, pois estão envolvidos com a detoxificação celular e apresentam algumas vantagens, como sensibilidade a xenobióticos, alta especificidade e baixo custo de análise (VAN DER OOST et al., 2003).

A catalase (CAT) é enzimas tetraméricas intracelulares que tem como função degradar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (VALKO et al., 2006; VLASITS et al., 2010). Dentre as enzimas degradantes, a CAT tem sido considerada a enzima mais eficiente para degradar o H_2O_2 , pois degrada o seu substrato e, ainda, promove um ganho de energia celular. Além da CAT estar envolvida na dismutação do H_2O_2 , ela também participa de processos detoxificativos de alguns substratos, como fenol, álcoois, ácido fórmico e formaldeído (SENGUPTA, CHATTERJEE, DEY, 2016).

Outra enzima intracelular que catalisa a dismutação de O_2^- para O_2 e H_2O_2 é a superóxido dismutase (SOD) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A SOD é a enzima antioxidante intracelular mais abundante no organismo (VENSKE, 2010), classificada de acordo com o metal que apresentam em sua estrutura, sendo os mais conhecidos o cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), o manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD) (ALSCHER et al., 2002).

As glutathione transferases (GSTs), também conhecida como glutathione S-transferases, são enzimas antioxidantes que catalisam a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com compostos tóxicos, interagindo com o seu grupo sulfidril (SH). Alterações nos níveis de grupos -SH das proteínas totais representam um marcador eficiente para avaliar danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010). A ação das GSTs leva a neutralização dos sítios eletrofílicos, para tornar seus produtos mais solúveis em água e menos tóxicos, facilitando, assim, a sua degradação e excreção (HABIG et al., 1974; CARLETTI et al., 2008; FORTIN, 2014). Evolutivamente, as GSTs representam um mecanismo de defesa da célula, por participar das etapas do catabolismo de aminoácidos, como fenilalanina e tirosina, além de serem utilizadas pela célula na inativação de fármacos (OLIVEIRA, 2014).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo sintetizado pelo organismo, a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Esse tripeptídeo exerce um importante papel na manutenção dos grupos tióis (-SH) das proteínas e redução das ligações dissulfetos (-S-S-), induzidas pelo estresse oxidativo (YOU; PARK, 2010). Essa forma reduzida da glutathiona (GSH) age como um antioxidante, neutralizando a ação dos radicais livres. A atividade da GSH é utilizada como um marcador da capacidade da célula manter a sua homeostase. O seu déficit acarreta na diminuição da resistência às drogas, radiações e da capacidade de reversão de tumores (YOU; PARK, 2010; HARA, 2012).

2.6.6 Análises fitoquímicas

As pesquisas fitoquímicas tem como objetivo determinar ou confirmar a presença dos constituintes químicos de diversas espécies vegetais. Essa análise pode auxiliar no direcionamento de avaliações que visam o isolamento ou o melhor conhecimento das substâncias presentes no material investigado (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Atualmente, as substâncias isoladas de plantas estão servindo de modelo para a produção de novos medicamentos sintéticos, enquanto que seus extratos são utilizados como fitoterápicos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Os metabólitos secundários são substâncias que não desempenham atividades biológicas vinculadas ao metabolismo básico da espécie, ou seja, não são essenciais ao organismo produtor. Entretanto, estes metabólitos asseguram vantagens para a sobrevivência e preservação do organismo (SIMÕES et al, 2003). As análises fitoquímicas podem indicar os grupos de metabólitos secundários mais relevantes de uma espécie.

Tradicionalmente, as caracterizações dos principais grupos de substâncias vegetais são feitas por meio de reações químicas colorimétricas e/ou precipitação. Dentre os testes clássicos de identificação dos principais grupos de princípios ativos, pode-se citar o índice de espuma, para as saponinas; os reagentes de Bouchardat e Drangerdoff, para os alcalóides; e a reação com cloreto férrico, para os flavonóides (HARBONE; 1998; MELLO et al., 2000; FALKENBERG et al., 2003).

As saponinas são heterosídeos de triterpenos ou esteróides que possuem a capacidade de formar espuma persistente em água, por diminuem a tensão superficial. Tal característica se deve a sua estrutura, cuja composição compreende uma porção lipofílica apolar (aglicona ou sapogenina) e uma hidrofílica polar (açúcares), semelhante a um detergente. Devido a estas características, a identificação é feita pelo teste de formação de espuma persistente, após agitação vigorosa da mesma (ARRUDA, 2015).

Os alcalóides são substância de caráter básico, que possuem em sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio, geralmente presentes na estrutura cíclica. As reações gerais para detectar a presença de alcalóides se baseiam na formação de complexos insolúveis, precipitados, formados após a utilização dos reagentes de Bouchardat e Drangerdoff (ARRUDA, 2015).

Os flavonóides são compostos bioativos do grupo dos polifenóis, que possuem como estrutura química principal C6-C3-C6. Estes compostos compõem o maior grupo de agentes fenólicos naturais encontrados nos vegetais e apresentam função protetora contra danos oxidativos no próprio organismo produtor (PETERSON; DWYER, 1998). Os compostos fenólicos são facilmente oxidados e, após a oxidação, eles, se transformam em substâncias com cores específicas, que indicam o grupo a que eles pertencem. Por exemplo, quando o cloreto férrico reage com flavonóides a reação adquire a cor azul ou verde azulada (ARRUDA, 2015).

Uma forma de se determinar os compostos fenólicos presentes em vegetais é por meio de análise fitoquímicas quantitativas dos compostos fenólicos totais. Esses compostos são substâncias que conferem sabor, odor e cor para diversos vegetais (SIMÕES et al., 2003). A determinação destes compostos permite estimar o potencial antioxidante do extrato vegetal, pois a quantidade de polifenóis totais de um extrato está diretamente relacionada com a sua capacidade antioxidante do mesmo (SILVA et al, 2015).

A atividade antioxidante pode ser determinada pelo ensaio com o composto 2,2 difenil- 2-picril-hidrazil 2,2 difenil- 2-picril-hidrazil, conhecido como método do DPPH. O DPPH é um radical livre estável, com ausência de um elétron em sua estrutura, que pode ser usado para testar o potencial de doação de elétrons de outros compostos, por exemplo dos compostos fenólicos. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH, faz com que este mude sua cor, permitindo o monitoramento da reação pelo espectrofotômetro (OSMAN et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Considerando a ampla utilização de *Lycium barbarum* como nutracêutico e os poucos estudos sobre seu possível efeito tóxico no organismo, assim como seu potencial protetor para o material genético, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial citotóxico, genotóxico, antigenotóxico, mutagênico, anitmutagênico e indução do estresse oxidativo de diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*, por meio de ensaios realizados com sistemas-testes *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico do extrato de *L. barbarum*, pela análise de alterações nos índices mitóticos em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a concentrações recomendadas para uso diário humano;
- Avaliar os potenciais genotóxicos do extrato de *L. barbarum*, por meio do ensaio de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a concentrações recomendadas para o uso diário humano;
- Avaliar os potenciais mutagênicos do extrato de *L. barbarum*, por meio do ensaio de micronúcleos em células F₁ de *A. cepa*, expostas a concentrações recomendadas para o uso diário humano;
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxico, antigenotóxicos, mutagênico, antimutagênicos e indução de estresse oxidativo do extrato de *L. barbarum*, por meio do ensaio do MTT, ensaio do cometa, teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese e avaliação do estresse oxidativo em células HepG2 (células de hepatoma humano) e MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano);
- Identificar e inferir os possíveis mecanismos de ação do *L. barbarum* por meio de diferentes bioensaios, desenvolvidos com diferentes organismos;
- Avaliar qualitativamente a presença de flavonóides, saponinas e alcalóides nas diferentes concentrações testadas para o extrato de *L. barbarum*;

- Avaliar quantitativamente a atividade antioxidante das concentrações testadas para o extrato de *L. barbarum* assim como o teor de polifenóis do extrato vegetal de *L. barbarum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material estudado

O extrato aquoso de *Lycium barbarum*, proveniente da distribuidora Galena Farmacêutica[®], foi adquirido em uma farmácia de Rio Claro- SP. Para a realização de todos os ensaios realizados com os diferentes sistemas testes foram preparadas diferentes concentrações de *L. barbarum*, baseadas nas informações toxicológicas contidas na ficha de segurança do produto fornecida pelo distribuidor do produto.

4.2 Material biológico

4.2.1 Sistema teste *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* (2n = 16) foi usada como organismo-teste para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade do *L. barbarum*. Nos ensaios, foram usadas sementes de cebola Isla Park Sementes Ltda[®] do mesmo lote da variedade Baia Periforme.

4.2.2 Manutenção da linhagem celular HepG2

As células de hepatocarcinoma humano HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]) foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio MEM (*Meio Mínimo* Essencial de Eagle), suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular com ventilação (25 cm²) foram mantidos em temperatura (37°C) e umidade controladas (60%), em estufa de CO₂ (5%). Primeiramente, as células foram descongeladas em 10 mL de meio MEM com soro. Após o crescimento celular, elas foram lavadas, por duas vezes, em 5 mL de PBS, tripsinizadas por 5 minutos com Tripsina-EDTA 0,5%. A seguir a tripsina foi inativada, pela adição de 1,5 mL de meio de cultura suplementado. Após obter a quantidade ideal de células nos frascos, foram realizados o teste do MTT, ensaio do cometa, teste do MN com bloqueio de citocinese e avaliação do estresse oxidativo.

4.2.3 Manutenção da linhagem celular MCF-7

As células de câncer de mama humano MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]) foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio DMEM (Meio Dulbecco MEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular com ventilação (25 cm²) foram mantidos em temperatura (37°C) e umidade controlada (60%), em

estufa de CO₂ (5%). Inicialmente, a linhagem MCF-7 foi descongelada em 10 mL de meio DMEM com soro. Após o crescimento celular, as células foram lavadas, por duas vezes, em 5 mL de PBS, tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,5% por 5 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1,5 mL de meio de cultura suplementado. Quando se obteve a quantidade ideal de células nos frascos foram realizados os testes do MTT, do cometa, do MN com bloqueio de citocinese e avaliação do estresse oxidativo.

4.3 Bioensaios realizados

Para a determinação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade, mutagenicidade, antimutagenicidade e indução do estresse oxidativo do *L. barbarum*, nas linhagens HepG2 e MCF-7, foram realizados os testes do MTT, ensaio do cometa, ensaio do MN com bloqueio de citocinese e avaliação da indução do estresse oxidativo. Para o organismo *A. cepa*, foram realizados os testes de Aberrações cromossômicas e micronúcleos em meristemática e o teste de MN em células F₁. A metodologia de todos esses ensaios está detalhadamente apresentada nos artigos que compõem os resultados desta pesquisa.

5 RESULTADOS

Artigo 1: Avaliação da ação genotóxica e antigenotóxica de extrato de *Lycium barbarum*

Letícia Cristina Gonçalves¹, Maria Tereza Pamplona Silva¹, Fernanda Flores Navarro¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

Artigo 2: Avaliação dos efeitos toxicogenéticos e antitoxicogenéticos de extrato de *Lycium barbarum* em culturas de células hepáticas humanas

Letícia Cristina Gonçalves¹, Maria Tereza Pamplona Silva¹, Franco Dani Campos Pereira¹, Fernanda Flores Navarro¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

Artigo 3: Análise do potencial genotóxico, mutagênico e indutor de estresse oxidativo do extrato de *Lycium barbarum*, sobre as células de adenocarcinoma de mama humano

Letícia Cristina Gonçalves¹, Maria Tereza Pamplona Silva¹, Franco Dani Campos Pereira¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

Artigo 1: Avaliação da ação genotóxica e antígenotóxica de extrato de *Lycium barbarum*

Letícia Cristina Gonçalves¹, Maria Tereza Pamplona Silva¹, Fernanda Flores Navarro¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

Lycium barbarum, popularmente conhecido como goji berry, é uma planta que tem em sua composição flavanóides, compostos fenólicos e carotenóides que estão relacionados a efeitos anticarcinogênicos e antimutagênicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio do sistema teste *Allium cepa*, a ação genotóxica/antígenotóxica e mutagênica/antimutagênica dos extratos desta planta. Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados com sementes de *A. cepa* submetidas a 3 diferentes concentrações do extrato de goji berry (0,2; 0,4 e 0,6 g/L) por 24 horas. As concentrações do extrato também foram associadas ao MMS, para avaliação do potencial antígenotóxico e antimutagênico, sob protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo simples e pós-tratamento. Foi avaliado ainda o potencial antioxidante, o teor de polifenóis totais e a fitoquímica qualitativa do extrato. Os resultados deste estudo mostram que o *L. barbarum* não apresentou potencial genotóxico ou mutagênico para *A. cepa*, mas apresentou resposta positiva para ação antígenotóxica e antimutagênica. Os protocolos de pré-tratamento com a concentração de 0,6 g/L e todos os tratamentos simultâneos mostraram ser mais eficientes na desmutagênese. Contudo, como houve eficiência para todos os protocolos e concentrações testadas, pode-se inferir que o goji berry também age por bioantimutagênese. Pelas taxas de redução dadas observadas para *A. cepa*, podemos inferir que o extrato de *L. barbarum* apresenta um efeito protetor sobre esse organismo (41,7% a 64% para células meristemáticas e de 65% a 100% para as células F₁), o que pode sugerir a possibilidade de intensificação de seu uso como um alimento funcional capaz de prevenir lesões no DNA.

Pavras-chaves: goji berry; *Allium cepa*; redução de danos no DNA; antimutagenicidade; aberrações cromossômicas; micronúcleos.

1. Introdução

Atualmente, tornou-se evidente o uso crescente de plantas medicinais como formas alternativas de tratamento ou terapia paralela à medicina convencional. Alguns pesquisadores sugerem que a valorização mundial do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas seja consequência da busca constante por hábitos saudáveis e pela dificuldade de se obter tratamentos eficazes contra algumas doenças (SOUZA-MOREIRA, ETHUR et al., 2011; OLIVEIRA, GILBERT, BÔAS, 2013; CORRÊA JR., 2014; ASSIS et al., 2015).

Dentre os diversos fitoterápicos utilizados na medicina popular, o *Lycium barbarum*, popularmente conhecido como “Goji Berry”, vem despertando muito interesse devido a sua ação redutora de peso (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014; COSTA et al., 2017), de um forte aliado na prevenção do envelhecimento e, conseqüentemente, no aumento da longevidade (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011; DONNO et al., 2014; MOURA, 2016).

O *L. barbarum*, também conhecido como “wolfberry”, “gou qi zi”, “fructus lycii”, é uma planta natural da Ásia, principalmente do noroeste da China, cuja frutos fusiformes têm alto valor nutritivo (ZHONG; SHAHIDI; NACZK, 2012; VIEIRA, 2016). Seus frutos são referenciados no ocidente como “super frutos”, devido ao grande poder antioxidante (CAVAZIM; FREITAS, 2014; VIEIRA, 2016), conferido pela presença de flavanóides, compostos fenólicos, betaína, β -carotenos e polissacáridos em sua composição (BALLARÍN, 2011; CAVAZIM; FREITAS, 2014).

Além da atividade antioxidante, os constituintes do *L. barbarum* conferem outras atividades biológicas como ação antimutagênica (MOCAN et al., 2017), funções imunomoduladoras (OSMAN et al., 2012; CUNHA, 2014) e propriedades neuroprotetivas (STATE PHARMACOPOEIA COMMITTEE, 2010; SILVA, DEGÁSPARI, 2014).

Apesar dos benefícios, plantas medicinais podem também conferir efeitos adversos, requerendo a necessidade de segurança avaliação toxicológica. As plantas medicinais apresentam substâncias bioativas para outros organismos, sendo então chamadas de xenobióticos. Contudo, essas substâncias podem sofrer biotransformação no organismo exposto e gerar produtos tóxicos, que vão além da sua finalidade terapêutica (ARAÚJO et al., 2011; BALDISSERA et al., 2016). Desta forma, o consumo exacerbado de fitoterápicos pode desencadear efeitos deletérios imediatos ou a longo prazo à saúde do consumidor, tais como efeitos alergênicos, efeitos tóxicos graves em vários órgãos e até mesmo induzir o desenvolvimento de certos tipos de câncer (MANSO, 2013).

Diante destes fatos, existe cada vez mais a necessidade de se estudar esses compostos pois, além da sua bioatividade, eles vêm sendo amplamente usados sem o devido controle médico. Os estudos com fitoterápicos podem contribuir com informações mais consistentes sobre os efeitos desses químicos, bem como sobre a eficiência e segurança do seu uso para a saúde humana.

Uma forma de melhor avaliar a ação citogenotóxica de um agente é pela utilização de bioindicadores que apresentem sensibilidade de respostas a xenobióticos. Dentre os diversos testes indicados para como de primeira triagem sobre os potenciais efeitos de xenobióticos, está o teste realizado com o bioindicador vegetal *Allium cepa*. Essa espécie apresenta uma alta sensibilidade a xenobióticos com potencial citogenotóxicos e mutagênicos, sendo validados por várias agências ambientais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Programa de Genetox da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (SOUZA, 2014; PORTIS et al., 2016). Assim, resultados obtidos com esta espécie podem auxiliar nos direcionamentos de estudos que visam avaliar e prevenir danos à saúde humana promovidos por compostos tóxicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A espécie *A. cepa* possui protocolos padronizados pelo Programa Internacional de Bioensaios de Plantas (IPPB) (GOPALAN, 1999; RAMBO, 2013) e se destaca por ser um teste bem estabelecido, com alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio e número reduzido de cromossomos ($2n = 16$) (FISKEJO, 1985). A análise de células meristemáticas deste organismo permite avaliar o potencial citotóxico (Índice Mitótico - IM), genotóxico (alterações cromossômicas e nucleares), mutagênico (quebras cromossômicas e/ou MN) (LEME; MARIN-MORALES, 2009), antigenotóxico e antimutagênico (fórmula de redução %) de amostras ambientais e de substâncias químicas de várias origens.

A espécie *L. barbarum*, mesmo sendo reconhecida como planta medicinal, portanto utilizada com finalidades terapêuticas, tem sido pouco estudada quanto ao seu potencial protetivo do material genético e quanto à sua toxicidade, após processo de biotransformação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico, antigenotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato de *L. barbarum*, por meio dos testes de aberrações cromossômicas (AC), de micronúcleos (MN) em células meristemáticas e F_1 , do sistema teste *Allium cepa* e avaliar o potencial de reduzir danos (% RD) desse extrato vegetal; avaliar o potencial antioxidante dos extratos de goji berry, por meio do método DPPH; caracterizar

fitoquimicamente o extrato e determinar o seu teor de fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteu.

2. Materiais e métodos

2.1. Fitoterápico Testado

A substância teste usada neste estudo foi extrato seco de *Lycium barbarum*, denominado comercialmente de extrato de goji berry 40 % - 0,250 kg, adquirido em uma farmácia de produtos naturais da cidade de Rio Claro – SP/Brasil, cuja distribuição é de responsabilidade da Galena Farmacêutica®. Para a realização dos ensaios com *A. cepa*, foram preparadas diferentes concentrações de *L. barbarum* (0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L), baseadas nas informações toxicológicas contidas na ficha de segurança do produto, que é fornecida pela própria Galena Farmacêutica®. Todas as concentrações foram diluídas em água ultrapura e preparadas no momento em que o bioensaio foi realizado.

2.2. Metil Metanosulfonato (MMS)

A solução aquosa de Metilmetano Sulfonato (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), um agente alquilante monofuncional amplamente reconhecido como um mutágeno (BERANEK, 1990), foi utilizada como controle positivo (concentração de 4×10^{-4} M diluído em água Milli-Q).

2.3. Análises Fitoquímicas

2.3.1. Caracterização fitoquímica preliminar

As diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum* foram caracterizadas por reações químicas qualitativas, testes clássicos de identificação dos principais grupos de princípios ativos (flavonoides - reação com cloreto férrico; saponinas - índice de espuma; alcaloiides - reagente de Dragendorff e Bouchardat) (MELLO; MENTZ; PETROVICK, 2001; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003) no laboratório de química da Fundação Hermínio Ometto – FHO-UNIARARAS.

2.3.2. Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada quantitativamente com o extrato bruto e também desenvolvidas no laboratório de química da Fundação Hermínio Ometto – FHO-UNIARARAS. Para a quantificação do teor de fenóis totais, primeiramente foi realizada uma diluição inicial de 0,750 g do extrato vegetal em 250 mL de água destilada. Na sequência,

foi transferido 5 mL desta diluição para um balão volumétrico de 25 mL, completando seu volume com água destilada. A seguir, 2 mL dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, onde foi adicionado 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2/N) e 10 mL de água. O volume do balão foi completado com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após a adição da última solução e um período de descanso de 30 minutos, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro Bel UV M51, (Biovera®) ($\lambda = 691$ nm), utilizando água como branco (GLASL, 1983).

2.3.3. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato de *L. barbarum*, foi realizado o ensaio de atividade antioxidante com 2,2 difenil- 2-picril-hidrazil (DPPH), utilizando o padrão de quercetina, em diferentes concentrações, os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental. O extrato de *L. barbarum* foi diluído em MeOH, para a obtenção de concentrações finais de 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L. Foram adicionados 1mL de cada amostra em 2mL da solução de DPPH (4 mg de DPPH em 100 mL de MeOH), para se obter um volume final de 3 mL. Após este procedimento, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente, protegidas da luz por 30 minutos. Em seguida, foi medida a absorvância em espectrofotômetro Bel UV M51, (Biovera®) ($\lambda = 517$ nm), utilizando 2 mL de solução de DPPH em 1 mL de MeOH como branco (A_0). Os cálculos foram feitos pela fórmula:

$$\% \Delta = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

Onde:

$\% \Delta$ = variação da absorvância.

A_0 = Absorvância do DPPH em metanol

A = Absorvância da amostra, após 30 minutos de reação (MICHELIN, 2008).

2.4. Organismo Teste

A espécie *A. cepa* ($2n = 16$) foi usada como organismo-teste para as avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade, antígenotoxicidade, mutagenicidade e anti-mutagenicidade do *L. barbarum*. Os ensaios foram realizados com sementes de cebola da marca Isla Park Sementes Ltda®, de mesmo lote e variedade (Baia Periforme).

2.5. Bioensaio

Os bioensaios foram realizados em 3 réplicas. As sementes de *A. cepa* (100 por placa) foram submetidas à germinação em placas Petri forradas com papel filtro, onde foram diretamente expostas às diferentes concentrações de *Lycium barbarum* (citadas anteriormente), em água ultrapura para o controle negativo (CN) e em solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS – Sigma-Aldrich – 4×10^{-4} M) para o controle positivo (CP). A exposição foi realizada como segue:

- **Exposição contínua:** as sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação nas diferentes concentrações de *L. barbarum* (tratamentos) e aos controles. Este teste foi realizado para verificar os possíveis efeitos das concentrações de *L. barbarum*, ou seja, avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade induzida pelas diferentes concentrações do extrato estudado.
- **Exposição antigenotóxica e antimutagênica:** as sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação em concentrações consideradas não genotóxicas e não mutagênicas, para a avaliação do potencial antigenotóxico e antimutagênico, sendo realizados quatro tipos diferentes de tratamento:
 - **pré-tratamento:** as sementes foram primeiramente expostas às diferentes concentrações do fitoterápico estudado por 24 horas. Passado este período, as sementes foram lavadas em água destilada e expostas ao metilmetano sulfonato (MMS, CAS No 66-27-3), na concentração de 4×10^{-4} M, por mais 24 horas;
 - **tratamento simultâneo:** as sementes foram expostas simultaneamente ao MMS (4×10^{-4} M) e às diferentes concentrações do fitoterápico, por 48 horas;
 - **pós-tratamento:** as sementes foram expostas ao MMS (4×10^{-4} M) por 24 horas. Passado este período, as sementes foram lavadas em água destilada e expostas às diferentes concentrações do fitoterápico por 24 horas;

Após a germinação, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 centímetros, elas foram coletadas, fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v) e armazenadas a 4 °C, até a suas utilizações nos ensaios. Para os testes de AC e de MN em células meristemáticas e F1 de *A. cepa*, foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas passaram por três banhos em água destilada, foram hidrolisadas em HCl 1 N a 60 °C por 10 minutos e transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por, aproximadamente, 2 horas.

Após esse procedimento, as regiões meristemáticas e F1 das raízes foram seccionadas em lâmina, com o auxílio de uma lâmina metálica. O material foi recoberto com lamínula e

esmagado, suavemente, em uma gota de Carmim Acético (2%). Para a obtenção de lâminas permanentes, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética (Entellan®).

Foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento, para cada uma das réplicas, onde foram analisadas, aproximadamente, 500 células por lâmina. Para as análises citológicas, as lâminas foram observadas em microscopia de luz, em objetiva de 40 x, a fim de estimar os índices de citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade do *L. barbarum*. O índice mitótico (IM) foi obtido pela relação entre o número de células em divisão/número total de células observadas.

Os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos foram avaliados pela frequência de aberrações cromossômicas como brotos nucleares, células binucleadas, células poliplóides, aderências cromossômicas, C-metáfases, perda e pontes cromossômicas, anáfases multipolares e outras. O potencial mutagênico e antimutagênico da substância foi estimado pela contabilização de células meristemáticas portadoras de quebras cromossômicas e MN e de células F1 portadoras de MN.

As atividades antigenotóxicas e antimutagênicas foram avaliadas por meio da análise da porcentagem de redução de danos para cada um dos tratamentos com *L. barbarum*. Para determinar esta porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{a-b}{b-c} \times 100$$

Onde:

a = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no CP;

b = número de células micronucleadas, ou com quebra cromossômica nos tratamentos;

c = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica no teste CN (ROBERTO et al., 2016)

2.6. Análise estatística

A comparação dos resultados obtidos nas análises dos parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, antigenotoxicidade e antimutagenicidade foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, conferidos pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Em seguida, foi aplicado o teste paramétrico (ANOVA/Tukey), para os parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade, que apresentaram distribuição normal dos dados, e o teste não paramétrico (Kruskal-Wallis/Dunn's), para os parâmetros de mutagenicidade e antimutagenicidade, que apresentaram distribuição não normal. Para as análises foi usado o software GraphPad Prism (versão 7.00). Para os resultados dos

experimentos de atividade antioxidante e polifenóis totais, foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de média de Tukey a 5% de significância. Os resultados que obtiveram níveis de significância ($p < 0,05$), quando comparados com o controle negativo ou controle positivo, foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Análises Fitoquímicas

3.1.1. Caracterização fitoquímica preliminar

Na caracterização fitoquímica preliminar, foi diagnosticada a presença de flavanóides, saponinas e alcalóides nas três concentrações do extrato de *Lycium barbarum* (0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L), em todas as triplicatas (Tabela 1).

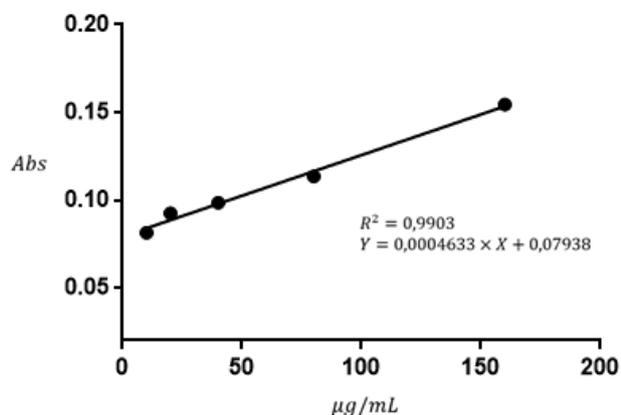
Tabela 1- Triagem fitoquímica das diferentes concentrações dos extratos de *Lycium barbarum*.

Compostos	Concentrações de <i>Lycium barbarum</i>								
	0,2 g/L			0,4 g/L			0,6 g/L		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Flavanóides	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcalóides	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado positivo (presença), por triplicata. T1: triplicata 1; T2: triplicata 2 e T3: triplicata 3.

3.1.2. Determinação do teor de fenóis totais

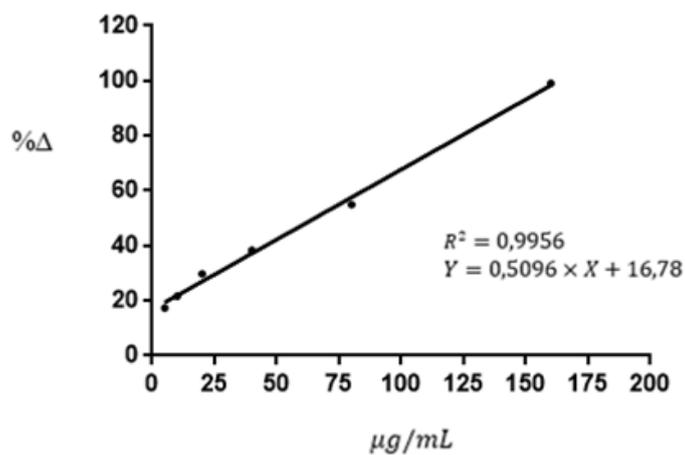
Para a determinação do teor de fenóis totais de cada concentração do extrato de *L. barbarum* foi, primeiramente, construída uma curva padrão com ácido gálico, a qual foi tomada como substância de referência (Figura 1). O extrato de *L. barbarum* apresentou 6,03 mg eq. de ác. gálico/mL.

Figura 1: Curva de calibração do teor de fenóis totais realizada com o padrão de ácido gálico.

Abs.: absorvância

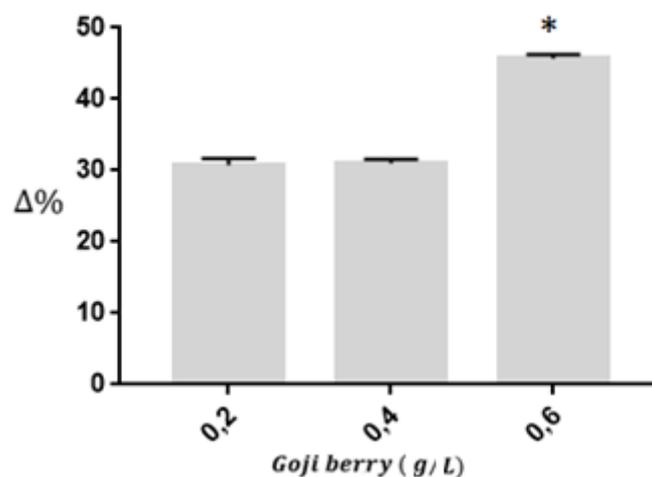
3.1.3. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante, realizada pelo método do DPPH foi baseado na curva padrão de quercetina (Figura 2). A maior atividade antioxidante foi observada na maior concentração do extrato de *L.barbarum* (0,6 g/L) (Figura 3).

Figura 2: Curva de calibração da atividade antioxidante, realizada com o padrão de quercetina

Δ%: variação de porcentagem

Figura 3: Atividade antioxidante das diferentes concentrações de *Lycium barbarum*, expressas em porcentagem de atividade antioxidante.



Δ%: variação de porcentagem. *p<0,05 estatisticamente significativo comparado entre os tratamentos

3.1.4. Bioensaio

3.1.4.1. Índice mitótico, atividades genotóxica e mutagênica em células meristemáticas e F₁

Os resultados relativos a IM, genotoxicidade e mutagenicidade das células meristemáticas e mutagenicidade das células F₁ não foram significativos, em relação ao CN, para todos os tratamentos realizados (Tabela 2 e 3).

3.1.4.2. Índice mitótico, atividades antigenotóxica, antimutagênica e redução de danos (RD%) em células meristemáticas e células F₁

Os resultados do IM mostraram que eles não diferiram estatisticamente do CN. Contudo, os resultados referentes ao potencial antigenotóxico do *L. barbarum* demonstraram uma eficiência na diminuição de danos promovidos pelo MMS em células de *A. cepa*, para o pré-tratamentos (concentração 0,6) e todas as concentrações testadas no teste simultâneo. De acordo com os resultados obtidos sobre o potencial antimutagênico do extrato estudado em células meristemáticas, foi observada uma eficiência na redução desse tipo de dano para o pré-tratamento 0,6 g/L, para o pós- tratamentos 0,4 g/L e para todas as concentrações testadas no tratamento simultâneo (Tabela 4).

Quanto ao potencial antimutagênico do *L. barbarum* para células F₁ de *A. cepa*, os resultados também mostraram que houve para uma eficiência significativa na redução de mutagenicidade do MMS para a concentração de 0,6 g/L do pré- tratamento, 0,4 g/L do pós- tratamento e para todos os tratamentos simultâneos realizados (Tabela 5).

Tabela 2- Genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes concentrações de *Lycium barbarum* para células meristemáticas de *Allium cepa*

Tratamentos (g/L)	IM	IG	IMut
CN R1	20,46 ± 0,76	0,14 ± 0,096	0,14 ± 0,096
CP R1	18,66 ± 0,88	0,30 ± 0,120	1,64 ± 0,350 *
0.2 R1	19,26 ± 0,45	0,16 ± 0,120	0,20 ± 0,163
0.4 R1	19,08 ± 0,76	0,14 ± 0,084	0,16 ± 0,126
0.6 R1	19,28 ± 0,86	0,18 ± 0,108	0,22 ± 0,113
CN R2	21,16 ± 0,36	0,12 ± 0,103	0,16 ± 0,126
CP R2	18,44 ± 0,69	0,20 ± 0,163	1,94 ± 0,298 *
0.2 R2	19,10 ± 0,96	0,14 ± 0,134	0,26 ± 0,134
0.4 R2	18,90 ± 0,59	0,16 ± 0,126	0,18 ± 0,147
0.6 R2	20,12 ± 0,34	0,18 ± 0,113	0,24 ± 0,126
CN R3	20,88 ± 0,45	0,16 ± 0,126	0,12 ± 0,103
CP R3	19,68 ± 0,45	0,26 ± 0,134	1,6 ± 0,282 *
0.2 R3	19,86 ± 0,52	0,16 ± 0,084	0,18 ± 0,147
0.4 R3	19,14 ± 1,09	0,14 ± 0,096	0,16 ± 0,084
0.6 R3	19,30 ± 0,77	0,18 ± 0,063	0,20 ± 0,163

IMut: Índice mitótico; IG: Índice de genotoxicidade; IMut: Índice de mutagenicidade; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; R1: réplica 1; R2: réplica 2; R3: réplica 3.

Tabela 3- Mutagenicidade de diferentes concentrações de *Lycium barbarum* para células F₁ de *Allium cepa*

Tratamentos (g/L)	IMut (R1)	IMut (R2)	IMut (R3)
CN	0,12 ± 0,10	0,14 ± 0,11	0,14 ± 0,10
CP	0,28 ± 0,12 *	0,26 ± 0,11 *	0,32 ± 0,17 *
0.2	0,16 ± 0,10	0,16 ± 0,06	0,16 ± 0,08
0.4	0,18 ± 0,14	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,09
0.6	0,14 ± 0,11	0,16 ± 0,06	0,14 ± 0,10

IMut: Índice de mutagenicidade; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; R1: réplica 1; R2: réplica 2; R3: réplica 3.

Tabela 4- Antigenotoxicidade e antimutagenicidade de diferentes concentrações de *Lycium barbarum* para células meristemáticas de *Allium cepa*

Tratamentos (g/L)	IM			Antigenotoxicidade			Antimutagenicidade			(%RD)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CN	20,64 ± 0,36	20,48 ± 0,45	20,32 ± 0,30	0,14 ± 0,10	0,16 ± 0,13	0,16 ± 0,13	0,16 ± 0,084	0,18 ± 0,11	0,18 ± 0,11	---	----	---
CP	17,03 ± 5,33	18,38 ± 0,39	18,44 ± 0,30	0,60 ± 0,16	0,62 ± 0,26	0,56 ± 0,16	1,80 ± 0,133	1,72 ± 0,29	1,66 ± 0,21	---	---	--
PRÉ 0,2	19,90 ± 0,37	20,06 ± 0,48	20,00 ± 0,56	0,52 ± 0,17	0,58 ± 0,20	0,54 ± 0,23	1,84 ± 0,158	1,82 ± 0,20	1,80 ± 0,16	12	15	10
PRÉ 0,4	18,06 ± 0,43	18,34 ± 0,88	18,18 ± 0,46	0,50 ± 0,11	0,54 ± 0,25	0,52 ± 0,23	1,64 ± 0,126	1,56 ± 0,30	1,56 ± 0,08	41	33	41
PRÉ 0,6	19,02 ± 0,58	19,06 ± 0,94	19,08 ± 0,51	0,26 ± 0,16 *	0,22 ± 0,11*	0,28 ± 0,14*	0,78 ± 0,305 *	0,74 ± 0,31*	0,78 ± 0,15 *	65	67	60
PÓS 0,2	19,10 ± 0,37	19,40 ± 0,47	19,00 ± 0,31	0,56 ± 0,21	0,58 ± 0,26	0,56 ± 0,28	1,76 ± 0,158	1,84 ± 0,16	1,78 ± 0,18	10	5	5
PÓS 0,4	18,30 ± 0,27	18,28 ± 0,47	18,32 ± 0,38	0,36 ± 0,21	0,44 ± 0,21	0,50 ± 0,19	1,02 ± 0,103 *	1,12 ± 0,17 *	0,98 ± 0,18 *	45	41	39
PÓS 0,6	19,54 ± 0,23	19,74 ± 0,33	19,50 ± 0,40	0,52 ± 0,17	0,52 ± 0,23	0,58 ± 0,06	1,60 ± 0,094	1,70 ± 0,11	1,62 ± 0,15	25	24	23
SIM 0,2	18,56 ± 0,26	18,68 ± 0,29	18,72 ± 0,25	0,28 ± 0,10 *	0,26 ± 0,10 *	0,26 ± 0,16 *	0,88 ± 0,140 *	0,84 ± 0,16 *	0,88 ± 0,10 *	58	56	57
SIM 0,4	19,08 ± 0,41	19,08 ± 0,41	19,06 ± 0,13	0,18 ± 0,15 *	0,22 ± 0,06 *	0,16 ± 0,08 *	1,00 ± 0,189 *	1,02 ± 0,15 *	0,98 ± 0,18 *	55	48	51
SIM 0,6	19,12 ± 0,23	19,16 ± 0,30	19,08 ± 0,27	0,22 ± 0,11 *	0,20 ± 0,16 *	0,24 ± 0,13 *	0,80 ± 0,189 *	0,80 ± 0,130 *	0,78 ± 0,18 *	60	57	56

IM: Índice mitótico; % RD: porcentagem de redução de danos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; PRE: pre-tratamento; PÓS: pós-tratamento; SIM: tratamento simultâneo simples. * significativo ($p < 0,05$) em relação ao CP. R1: réplica 1; R2: réplica 2; R3: réplica 3

Tabela 5- Avaliações das atividades antimutagênicas e redução de danos para as células F₁ nas 3 réplicas:

Tratamentos (g/L)	IAmut (R1)	%RD (R1)	IAmut (R2)	%RD (R2)	IAmu t (R3)	%RD (R3)
CN	0,18 ± 0,11	-	0,14 ± 0,10	-	0,16 ± 0,13	-
CP	0,80 ± 0,16	-	0,78 ± 0,27	-	0,78 ± 0,22	-
PRÉ 0.2	0,64 ± 0,21	19	0,7 ± 0,17	13	0,68 ± 0,19	16
PRÉ 0.4	0,71 ± 0,10	58	0,62 ± 0,18	53	0,58 ± 0,18	48
PRÉ 0.6	0,20 ± 0,16 *	97	0,18 ± 0,15 *	94	0,20 ± 0,09 *	94
PÓS 0.2	0,66 ± 0,27	20	0,68 ± 0,36	16	0,66 ± 0,19	19
PÓS 0.4	0,32 ± 0,10 *	68	0,30 ± 0,14 *	59	0,28 ± 0,14 *	68
PÓS 0.6	0,70 ± 0,11	35	0,66 ± 0,25	30	0,58 ± 0,20	32
SIM. 0.2	0,24 ± 0,13 *	90	0,22 ± 0,15 *	88	0,24 ± 0,16 *	87
SIM. 0.4	0,22 ± 0,06 *	94	0,20 ± 0,09 *	91	0,20 ± 0,13 *	94
SIM. 0.6	0,12 ± 0,10 *	100	0,14 ± 0,10 *	100	0,12 ± 0,10 *	100

IAmut: Índice de Antimutagenicidade; % RD: porcentagem de redução de danos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; PRE: pré- tratamento; PÓS: pós-tratamento; SIM: tratamento simultâneo simples. * significativo ($p < 0,05$) em relação ao CP. R1: réplica 1; R2: réplica 2; R3: réplica 3.

3.2. Discussão

Há mais de 2500 anos, o *L. barbarum* tem sido tradicionalmente utilizado como composto alimentar e como planta medicinal. De acordo com a literatura científica (INAGAKI, SHIMADA, SHIMANO; NAGASAWA, 1979; BENSKY & GAMBLE, 1993; WANG, 2006; AMAGASE; FARNSWORTH, 2011; MOURA, 2016), esta planta não apresenta características tóxicas. Porém, embora haja essa indicação de não toxicidade, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alertou em 2015 que, devido à escassez de dados toxicológicos sobre a ingestão de frutos de goji berry *in natura*, secos ou em extratos, esse fitoterápico deve ser consumido com moderação, até que seja comprovada ausência de efeitos adversos para humanos.

Assim, devido à ausência de dados toxicológicos sobre o goji berry e a eficiência do sistema teste *Allium cepa* em investigar a ação de xenobióticos sobre o material genético, este estudo buscou obter informações sobre a ação do extrato de *L. barbarum*, usando como sistema teste a espécie *A. cepa*.

Pelos resultados obtidos neste estudo para índice mitótico, genotoxicidade e mutagenicidade, pode-se inferir que as concentrações de 0,2 g/L; 0,4 g/L e 0,6 g/L do extrato

de *L. barbarum* não foram capazes de induzir danos citogenéticos em *A. cepa*, indicando que essas concentrações foram seguras para este sistema teste. Essa resposta pode estar associada à presença de flavanoides, saponinas, alcaloides e ao alto teor de polifenóis detectado nas análises fitoquímicas realizadas com o extrato de *L. barbarum*. Nossos dados são concordantes com os publicados por Donno et al. (2014), onde os autores identificaram e quantificaram no fruto de goji berry, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), 17 compostos bioativos, com prevalência para ácidos orgânicos e compostos polifenólicos. Ceccarini (2016) também descreve que potencial antioxidantes dessa planta pode ser devido aos seus altos teores de flavonóides.

Vários dos compostos identificados por Donno et al. (2014) possuem potencial antioxidante. Sendo assim, também avaliamos neste estudo o potencial antioxidante das diferentes concentrações de goji berry, por meio do método DDPH, que é um dos métodos indicado para a mensuração da atividade antioxidante de plantas. A atividade sequestradora do radical DPPH baseou-se na curva padrão de quercetina, por ser este flavanóide o de maior presença nas bagas do goji berry. (WANG et al., 2010; MOURA, 2016). Dentre as concentrações testadas do extrato de *L. barbarum*, a de 0,6 g/L foi a que apresentou o maior poder antioxidante, cujos valores foram estatisticamente diferentes dos observados para o CN. Sendo assim, essa maior concentração testada mostrou possuir também uma maior capacidade de neutralização da ação dos radicais livres, diminuindo sua ação pró-oxidante e conferindo um efeito protetor por restrição dos efeitos danosos das reações oxidativas.

O sequestro de radicais livres, a inativação enzimática ou química e a prevenção de espécies química reativas são os principais mecanismos de ação dos compostos antimutagênicos (SILVA, 2015). Um agente antimutagênico é um composto capaz de prevenir ou reduzir mutações, portanto um supressor de mutagênese celular. Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos podem se dar por duas vias distintas: desmutagênese ou bioantimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores atuam diretamente sobre os compostos indutores de mutações por inativação química ou enzimática, enquanto que na bioantimutagênese os agentes antimutagênicos atuam em processo de indução de mutações, impedindo essa ação mutagênica ou ainda promovem reparo dos danos genéticos causados por mutágenos (MITSCHER et al. 1996; SILVA, 2015; CARNEIRO, 2016).

Foi observado pelos ensaios de antígeno toxicidade que houve uma redução de danos significativa nos ensaios de pré- tratamento com a concentração de 0,6 g/L de *L. barbarum*, assim como para todos os tratamentos simultâneos realizados, em relação aos resultados do CP. Resultados similares foram registrados em estudos *in vitro* realizados com frutos tipo “berry”,

por Coates et al. (2007) e Brown et al., (2012), onde os autores deste estudo apontaram um efeito protetor para esses frutos contra quebras na cadeia de DNA induzidas por H₂O₂. Essa ação foi associada à alta presença de polifenóis dos frutos. Brown et al. (2014) associam os efeitos protetores do DNA ao aumento da atividade antioxidante e/ou ao aumento no reparo dos danos promovidos nesta molécula, confirmando então a ação antígeno-tóxica observada neste presente estudo.

Estudos de Schantz et al., (2010), demonstraram efeitos genoprotetores para alguns componentes isolados de tipos diversos de frutos “berry” como os flavonóides em geral, com destaque para a quercetina, que é também o flavonóide predominante no *L. barbarum* (WANG et al., 2010; MOURA, 2016). Ainda, de acordo com Ramos et al. (2008), a quercetina possui atividade antígeno-tóxica associada a eliminação de radicais livres, a quelação de metais e a biomodulação de repostas antioxidantes celulares. Os autores também relacionaram a atividade antígeno-tóxica ao efeito anticarcinogênicos da quercetina.

Estudos de Luo et al.(2006) indicaram que o *L. barbarum* apresentou efeitos protetores contra danos no DNA de células de testículo de ratos, causados por fator físico (exposição ao calor) e químico (H₂O₂). Wu et al. (2006) também demonstraram que ratos com *Diabetes Mellitus* não insulino-dependente (NIDDM), tratados com *L. barbarum*, tiveram redução de danos no DNA, como consequência da diminuição dos níveis de estresse oxidativo proporcionado por esse fitoterápico

Para o parâmetro de antimutagenicidade observado em células meristemáticas e F₁, foi constatado que os mesmos tratamentos que induziram efeitos antígeno-tóxicos (pré-tratamento 0,6 g/L e todos os tratamentos simultâneos) também induziram efeitos antimutagênicos, acrescentados a eles o pós-tratamento de 0,4 g/L. Todos esses tratamentos citados promoveram decréscimo significativo de danos no DNA, quando comparado com os resultados do CP. A atividade antimutagênica do *L. barbarum* pode ser considerada como um indicativo de potencial anticancerígeno, como descrito por Mao et al. (2011). Esses autores avaliaram os efeitos anticancerígenos dos polissacarídeos presentes em *L. barbarum* sobre células de câncer de cólon humano e constataram efeito antiproliferativo celular, que os autores consideraram como uma ação anticarcinogênica do composto.

Na literatura, existem estudos que associam os compostos antioxidantes da dieta com efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos. Esta correlação é feita devido a capacidade dos antioxidantes protegerem as células não cancerosas de danos do DNA resultantes do estresse oxidativo (ANDERSON et al., 1995; WEIJL et al., 1997; SENDÃO, 2004). Considerando esses estudos, podemos atribuir a antígeno-tóxicidade e antimutagenicidade registrada neste estudo aos

compostos bioativos antioxidante presentes no extrato de *L. barbarum*. Dentre esses compostos, pode ser destacado o β -caroteno que, de acordo com Patel et al. (1998) e Aissa (2010), possui atividade anticlastogênica; o ácido clorogênico, devido a suas atividades antimutagênicas, antitumorais, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e anti-angiogênicas (FARSKY, 2013); e os compostos fenólicos, que também são considerados por Cai et al. (2006); Palioto et al. (2015) potencialmente anticarcinogênico, antimutagênico e anti-inflamatório.

De uma forma geral, os resultados sugerem que o *L. barbarum* pode agir tanto por desmutagênese (diminuição significativa de danos em todos os ensaios simultâneos e no ensaio de pré- tratamento com a concentração de 0,6 g/L), quanto por bioantimutagênese (conforme observado para o pós-tratamento com a concentração de 0,4 g/L).

Os agentes alquilantes, como o MMS, tem habilidade de interação diretamente com o DNA (Beranek, 1990), promovendo quebra de fita dupla nesta molécula (ALMEIDA et al., 2005). Devido a esse efeito, essa substância tem sido usada, há muito tempo, para estudar eventos de mutagenicidade e carcinogenicidade (BERANEK, 1990; LUNDIN et al, 2005). No caso da desmutagênese observada neste estudo e de acordo com os estudos citados anteriormente sobre o efeito do MMS, inferimos que o goji berry pode ter uma ação direta no DNA, rompendo os crosslinks promovidos pelo MMS e impedindo assim o efeito mutagênico do MMS, anteriormente descrito. Já para a bioantimutagênese, o *L. barbarum* pode intervir como modulador do reparo e replicação do DNA, inibindo possíveis erros decorrentes das falhas dos sistemas de reparo celular.

Carvalho, Mauro e Oliveira (2008) avaliaram, pelo sistema teste do *A. cepa*, os efeitos antimutagênicos do nutracêutico licopeno. Os autores registram, por este teste, a evidência de ação bioantimutagênica e desmutagênica para o produto testado, reforçando que a desmutagênese foi a ação mais eficiente do nutracêutico. Esse estudo comprova a eficiência do organismo *A. cepa* para avaliar ação antimutagênica de fitoterápicos, mostrando que os dados aqui obtidos com este sistema teste são representativos para a real ação do *L.barbarum*. .

Para os estudos de antimutagenicidade, são consideradas as porcentagens de redução de danos no DNA (% RD). Neste estudo, as % RD, observadas para as células meristemáticas foram de 12%, 38,3%, 64%, para os pré-tratamentos; 7,7%, 41,7%, 24% para os pós-tratamento; 57%, 51,3% e 57,7% para os tratamentos simultâneos simples, para as respectivas concentrações de 0,2 g/L, 0,4 g/L e 0,6 g/L do extrato de *L. barbarum*. Para as células F₁, os pré-tratamentos apresentaram %RD de 16%, 53%, 95%; os pós-tratamentos de 18,3%, 65%, 32,3%; os tratamentos simultâneos simples de 88,3%, 93%, 100%, para, as concentrações de 0,2 g/L, 0,4 g/L e 0,6 g/L respectivamente.

Caillet et al. (2011) e Gontijo et al. (2014) classificam a ação antimutagênica, realizada por meio da % de inibição mutagênica, conhecida também como % RD, como forte, quando a ação antimutagênica tiver valores superior a 70 %; moderada, entre 40 % a 70 %, e neutra, para valores abaixo de 40 %. Frente aos resultados obtidos neste estudo, é possível inferir que a ação antimutagênica observada foi “forte” para as células F₁ e “moderada” para as células meristemáticas.

Apesar dos estudos já realizados com extratos de goji berry, os resultados ainda são insuficientes para um total esclarecimento da ação dos componentes desta planta, o que infere na necessidade de mais estudos com o *L. barbarum*. Pelos resultados obtidos neste e em outros estudos realizados com este nutracêutico, observamos que esta planta possui um potencial efeito protetor sob a molécula do DNA o que pode, em um futuro próximo, ser indicada como alimento funcional a ser usado com adjuvante em tratamentos de prevenção do câncer.

4. Conclusão

Pelos resultados do presente estudo, pode-se observar que o *L. barbarum* não apresentou potencial genotóxico e mutagênico para a espécie *A. cepa*. Contudo, esse nutracêutico apresentou um potencial antigenotóxico e antimutagênico, os quais podem ser atribuídos a sua constituição rica em diversos antioxidantes, que possuem características protetoras e permitem que ajam como compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos.

A espécie *A. cepa* mostrou ser um excelente bioindicador de genotoxicidade, mutagenicidade, anigenotoxicidade e antimutagenicidade, pois proporciona respostas consistentes sobre ação de quimiopreventivos, além de ser um método economicamente vantajoso, por ser de curta duração e de baixo custo.

O *L. barbarum* possui uma boa capacidade quimiopreventiva, principalmente devido ao seu mecanismo de desmutagênese, embora também apresente ação bioantimutagênica. As %RD registradas neste estudo mostraram que a ação do goji berry como fitoterápica é muito promissora, embora sejam necessários outros estudos que possam complementar as informações relativas aos efeitos deste fitoterápico. Portanto, este estudo contribuiu com dados importantes para melhor conhecimento das propriedades nutricionais e protetoras do extrato de *L. barbarum* e para nortear possíveis aplicações deste material botânico como alimento funcional e preventivo.

4. Referências Bibliográficas

- AISSA, Alexandre Ferro. **Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- AIYER, H. S.; VADHANAM, M. V.; STOYANOVA, R.; CAPRIO, G. D.; CLAPPER, M. L.; GUPTA, R. C. Dietary berries and ellagic acid prevent oxidative DNA damage and modulate expression of DNA repair genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9, 327–341.
- ALLEM, Laísa Nogueira. **Atividade alelopática de extratos e triturados de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) sobre o crescimento inicial de espécies alvo e identificação de frações ativas através de fracionamento em coluna cromatográfica**. 84 f. Dissertação(Mestrado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- AMAGASE H. FARNSWORTH N.R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International** 2011; 44(7):1702–17.
- ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, S. D. EDWARDS, A. J. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo genotoxicity assays. **Mutat. Res.**, v. 329, p. 37-47, 1995.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico n° 66, 01 de junho de 2015, Esclarecimentos sobre a avaliação de segurança da espécie vegetal *Lycium barbarum*, também conhecida como goji berry. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+ Interesse/Informes+Tecnicos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Informes+Tecnicos) >. Acesso em: 24/06/2017.
- ARÁUJO, É. J. F. D., ARAÚJO, D. Y. M., FREITAS, R. M. D., & FERREIRA, P. M. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Rev. ciênc. farm. básica apl**, v. 35, n. 3, 2014.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**.5 ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.
- ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 9(1): 1-72, Jan-Mar 2015.
- BALDISSERA, M. D., COPETTI, P. M., DE OLIVEIRA, P. S. B., SAGRILLO, M. R. Efeito genotóxico in vitro do extrato aquoso de *luffa operculata* sobre células mononucleares de sangue periférico. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2016.

BALLARIN S.M, MATAS M.A.L., ABAD D.S., CINTO N.P., CARNÉS J. Anaphylaxis Associated With the Ingestion of Goji Berries (*Lycium barbarum*). **J Investig Allergol Clin Immunol**. 2011; 21(7):567-70.

BENSKY, D., GAMBLE, A. (1993). Gou Qi Zi. Chinese Herbal Medicine, **Materia Medica** (pp. 333–334). (revised ed). Seattle, Washington: Eastland Press, Inc.

BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 231, p. 11–30, 1990.

BROWN, E. M.; MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D.; PEREIRA-CARO, G.; GONZALEZ-BARRIO, R.; ALLSOPP, P.; MAGEE, P.; CROZIER, A.; ROWLAND, I.; GILL, C. I. Persistence of anticancer activity in berry extracts after simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **PLoS One** 2012, 7, 1–10.

BROWN, E. M; LATIMER, C.; ALLSOPP, P.; TERNAN, N. G.; MCMULLAN, G.; MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D.; CROZIER, A.; ROWLAND, I.; GILL, C.I. R. In vitro and in vivo models of colorectal cancer: Antigenotoxic activity of berries. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 18, p. 3852-3866, 2014.

BRYAN, J. K.; COSTA, D.; GIESE, N.; NUMMY, K.; RAPP, C.; SEAMON, E. Goji (*Lycium spp*) in natural standard monograph (2008). **Natural Standard Inc**.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.2872-2888, 2006.

CAILLET, S.; LESSARD, S.; LAMOUREUX, G.; LACROIX, M. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. **Food Chemistry**, 124, 1699–1707, 2011.

CARNEIRO, C.C. **Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, citotóxica, anticitotóxica, angiogênica e antiangiogênica de elagitaninos utilizando ensaios in vitro e in vivo**. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Biologia) -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

CARVALHO, P. C.; MAURO, M.O.; OLIVEIRA, R.J. **Avaliação da antimutagenicidade do licopeno em Allium cepa**. Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica, Departamento de Biomedicina, Centro Universitário Filadélfia, 2008.

CAVAZIM, P. F.; FREITAS, G. As propriedades antioxidativas do goji berry no auxílio à melhora do centro de acuidade visual, com abordagem em tratamentos da retinopatia diabética. **Revista UNINGÁ Review**. Vol.20, n 2, pp.55-60 ,Out - Dez 2014.

CECCARINI, M. R.; VANNINI S, CATALDI S, MORETTI M, VILLARINI M, FIORETTI B, ALBI E, BECCARI T, CODINI M. *In Vitro* Protective Effects of *Lycium barbarum*.

Berries Cultivated in Umbria (Italy) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

CHANG, R. C. C. SO, K.F. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far?. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 5, p. 643-652, 2008.

CHAUHAN, L.K.; SAVENA, P.M.; GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, v. 42, p. 181-189, 1999.

COATES, E. M.; POPA, G.; GILL, C. I.; MCCANN, M. J.; MCDUGALL, G. J.; STEWART, D.; ROWLAND, I. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. **J. Carcinog**. 2007, 18, 4–17.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. de L. M. Chemical composition, functional properties and technological applications of chia (*Salvia hispanica* L) seeds in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 259-268, 2014.

CORRÊA Jr., C. 2014 – As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v.32, p.376.

COSTA, R.B.; SZERWIESKI, L. L. D.; MACUCH, R. S., VERMELHO, S. C., CORTEZ, D. A. G. Promoção da saúde por meio de produtos naturais: percepção e conhecimento de comerciantes. **Rev enferm UFPE on line**. Recife, 11(Supl. 3):1410-9, mar., 2017.

CUNHA, M. M. R. Avaliação do perfil fenólico e atividade antioxidante de suplementos alimentares baseados em frutas e legumes. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar** Vila Real, Julho 2014.

DHARMANANDA, S. LYCIUM FRUIT. Portland, Oregon: Food and Medicine. **Institute for Traditional Medicine**. Disponível em: <<http://www.itmonline.org/arts/lycium.htm>>. Acesso em 31/07/17.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; BENNICELLI, C. Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: role in primary prevention. In: **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms III**. Springer US, 1993. p. 1-16.

DHARMANANDA, S. *Lycium fruit*. Portland, Oregon: Food and Medicine, Institute for Traditional Medicine, 2007.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, p. 6–20, jun. 2014.

- ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui-RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 121-128, 2011.
- FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R.I dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 229-245, 2003.
- FARSKY, S. H. P. Efeitos do ácido clorogênico sobre as propriedades de adesão do endotélio. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pest. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 252–259.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- GLASL, H. Zur Photometric in der Drogenstandardisierung- 3. gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1987, 1983.
- GONTIJO, D.C.; FIETTO, L.C.; LEITE, J.P.V. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagenica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Coimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 4, p.874-880, 2014.
- GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 99–102, 1999.
- GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.
- HARBORNE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. springer science & business media, 1998.
- HEMIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. **Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. Biotecnol. na Agricult. e na Agroind. Guaíba: Agropecuária**, v. 1, p. 227-52, 2001.
- HISTER, C. A. L.; PASQUALLI, M.; TRAPP, K. C.; STEFANELLO, R.; BOLIGON, A. A.; CAMPOS, M. M. A.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, 2017.

INAGAKI, I., SHIMADA, H., SHIMANO, T.; NAGASAWA, M. *Lycii fructus*. **Pharmacognosy** (pp. 145). Tokyo, Japan: Nankodo, 1979.

INFANTE, J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KATAOKA, Y.; PERRIN, J.; HUNTER, N.; MILAS, L.; GRDINA, D. J. Antimutagenic effects of amifostine: clinical implications. In: **Seminars in oncology**. 1996. p. 53-57.

KING, S. R.; AMBIKA, R. Allelopathic plants. *Chromolaen odorata* L. *Allelopathy Journal*, v. 9, n. 1, p. 35-41, 2002.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, p. 296-301, 2002.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutat Res.**, v. 682, p.71–81, 2009.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells, **Aquat. Toxicol.** 88 (2008) 214–219.

LI, X. M.; LI, X. L.; ZHOU, A. G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits in vitro. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 2, p. 488–497, fev. 2007.

LUO, Q.; LI, Z.; HUANG, X.; YAN, J.; ZHANG, S.; CAI, Y. Z. *Lycium barbarum* polysaccharides: protective effects against heat-induced damage of rat testes and H₂O₂-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats. **Life sciences**, v. 79, n. 7, p. 613-621, 2006.

MANSO, C. I. M. P. **Consumo de laxantes particularmente de Sene numa Farmácia do Nordeste Transmontano**. 2013. Tese de Doutorado.

MAO, F.; XIAO, B.; JIANG, Z.; ZHAO, J.; HUANG, X.; GUO, J. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G₀/G₁ phase arrest. **Medical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 121-126, 2011.

MIAO, Y.; XIAO, B.; JIANG, Z.; GUO, Y.; MAO, F.; ZHAO, J.; HUANG, X.; GUO, J. Growth inhibition and cell-cycle arrest of human gastric cancer cells by *Lycium barbarum* polysaccharide. **Medical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 785-790, 2010.

MARTINS; G. S. G., COIMBRA, C. C.B.E., SCHLICHTING, C. L. R. TOXICITY OF Goji berry (*Lycium barbarum*). **Revista UNINGÁ Review**. Vol.20, n.1,pp.87-91 (Out - Dez 2014).

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S; MALAGUTTI, M.I.A; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, **Genet. Mol. Biol.** 29 (2006) 148–158.

MELLO, J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. 821p.

MICHELIN, Daniele Carvalho. **Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* (L.) urb.(Convolvulaceae)**. 2008.

MITSCHE LA, TELIKEPALLI H, MCGHEE E, SHANKEL DM. Natural antimutagenic agents. **Mutat Res** 1996;350:143-52.

MOURA, C. **Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e goji berry: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo petit suisse**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p.189-218.

OLIVEIRA, L.F.G.; GILBERT, B.; BÔAS, G.K.V. 2013 – Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**, v.8, p.1-10.

OSMAN N. I., AWAL A., SIDIK N. J., ABDULLAH S. Antioxidant activities of in vitro seedlings of *lycium barbarum* (goji) by diphenyl picrylhydrazyl (dpph) assay. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 2012; 4(4):137-41.

PALITO G.F.; SILVA C.F.G.; MENDES M.P.; ALMEIDA V.V.; ROCHA C.L.M.S.C.; TONIN, L.T.D. Proximate composition, bioactive compounds and antioxidant activity of fruits of *Morinda citrifolia* L. (noni) cultivated in Paraná, Brazil, **Rev. bras. Plantas med.** vol.17 no.1 Botucatu Jan./Mar. 2015.

PATEL, R.K.; TRIVEDI, A.H.; JAJU, R.J.; KUKRETI, M.S.; BHATAVDEKAR, J.M.; SHAH, P.M.; PATEL, D.D. Protection from pan masala induced genomic damage by betacarotene and retinoic acid na in vitro experience. **Neoplas, Bratislava**, v. 45, n. 3, p; 169-175, 1998.

PESSOTTO, G. P.; PASTORINI, L. H. Análise da germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sob a influência alelopática do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 990-992, 2007.

PORTIS, I. G., FIGUEREIDO, F. R. G., PENA, R. V., HANUSCH, A. L., SOUSA, L. P., MACHADO, R. C., CRUZ, A. D. Bioensaio citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *chochlospermum regium*. **REFACER-Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 5, n. 1, 2016.

RAMBO, C. L. **Avaliação da toxicidade dos sedimentos de reservatórios artificiais utilizando o sistema teste *Allium cepa***. 2013. Tese de Mestrado, UNOCHAPECÓ, Chapecó - SC, 2013.

RAMOS, A. A. et al. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin, and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. **Toxicol. Lett**, v.177, p.66-73, 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 17–24, 1994.

REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. 2013. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 27(4): 629-646.

REN, W.; QUIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavanoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Research Review**, [s.l.], v.23, n.4, p.519-534, 2003.

ROBERTO, M. M., MATSUMOTO, S. T., JAMAL, C. M., MALASPINA, O., MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro** v.33, p. 9-15, 2016.

RODRIGUES, H.G.; MEIRELES, C.G.; LIMA, J.T.S.; TOLEDO, G.P.; CARDOSO, J.L.; GOMES, S.L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 13(3): 359- 366, 2011.

RODRIGUES, R.P. Effect of photodynamic therapy supplemented with quercetin in HEP-2 cells. **Cell Biol. Int.**, v.38, n.6, p. 716-22, 2014.

RODRÍGUEZ, Y. A., CHRISTOFOLETTI, C. A., PEDRO, J., BUENO, O. C., MALASPINA, O., FERREIRA, R. A. C., FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438-442, 2015.

SCHANTZ, M.; MOHN, C.; BAUM, M.; RICHLING, E. Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumour cell lines Caco-2 and HT-29. **J. Berry Res.** 2010, 1, 25–33.

SENDÃO, M. C. **Efeito do licopeno na mutagenicidade induzida pela cisplatina em ratos.** Dissertação (Mestrado), Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SHEN, L.; DU, G. Lycium barbarum polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway. **Life Sciences**, v. 91, p. 353–357, 2012.

SILVA, C. R. **Genética toxicológica da chalcona sulfonamida (CPN): evidências de genoto-xicidade e antimutagenicidade em diferentes sistemas-teste *in vivo* e *in vitro*.** 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SILVA, J. C. F.; DEGÁSPARI, C. H. Propriedades nutricionais e efeitos adversos da “goji berry” (*Lycium barbarum* L.). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.15, n.3, Jul. - Setembro, 2014.

SILVA, M. V. B. **Efeitos da adição de compostos fenólicos sobre o crescimento de leveduras etanológica (*Saccharomyces sp.*) em meio sintético e em caldo de cana de açúcar.** Dissertação de mestrado, 2013.

SONG, Y.; XU, B. Diffusion Profiles of Health Beneficial Components from Goji Berry (*Lyceum barbarum*) Marinated in Alcohol and Their Antiozidant Capacities as Affected by Alcohol Concentration and Steeping time. **Journal of Food and Science**, v. 2, p. 32-42, 2013.

SOUZA, L. L. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água e do sedimento do rio Corumbataí - São Paulo, Brasil. 2014.** 123 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. 2010 – O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.435-440.

STATE PHARMACOPOEIA COMMITTEE (2010). Pharmacopoeia of the People's Republic of China Part I, 2010. **Beijing: Chemical Industry Press**, 232–233.

VIEIRA, É. de A. **Potencial nutricional e antioxidante de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.).** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016. 2016.

WANG, L.S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters, Amsterdam**, v. 269, p. 281-290, 2008.

- WANG, Q., DONG, Z. L. (1990). Modern clinic necessities for traditional Chinese medicine — Teaching materials for international advanced training course in Europe. **Beijing: China Ocean Press.**
- WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and α - glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759–1768, jun. 2010.
- WANG, Z. The Magic Lycium Barbarum from **Ningxia Province**. 2006.
- WEIJL, N. I., CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, v.23, p. 209-240, 1997.
- WU, H.; GUO, H.; ZHAO, R. Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats. **Yakugaku Zasshi**, v. 126, n. 5, p. 365-371, 2006.
- ZHONG, Y.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Hui: Food Science and Technology : Dried Fruits : Phytochemicals and Health Effects. Somerset, USA: **John Wiley & Sons**, p.133-141, 2012.
- ZHU, J. S.; HALPERN, G. M.; JONES, K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: Cordyceps sinensis Part I. **The Journal of alternative and complementary medicine**, v. 4, n. 3, p. 289-303, 1998.

Artigo 2: Avaliação dos efeitos toxicogênicos e antitoxicogênicos de extrato de *Lycium barbarum* em culturas de células hepáticas humanas

Letícia Cristina Gonçalves¹, Maria Tereza Pamplona Silva¹, Franco Dani Campos Pereira¹,
Fernanda Flores Navarro¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

Os frutos de *Lycium barbarum* (goji berry) têm sido amplamente usados na medicina popular, devido aos estudos realizados com esta planta que indicam que ela apresenta um bom potencial nutricional, anticarcinogênico e antioxidantes. Devido às propriedades do goji berry, o presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio de testes *in vitro* realizado com cultura de células de hepatoma humano (HepG2), os possíveis efeitos genotóxicos, antigenotóxicos (ensaio do cometa), mutagênicos, antimutagênicos (teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese) e antioxidante (quantificação dos níveis de GSH de peroxidação lipídica-TBARS, atividade das enzimas SOD e GST) com extratos de *L. barbarum* em 3 diferentes concentrações (0,2; 0,4 e 0,6 g/L). Para os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, as células HepG2 foram expostas, por 24 horas, às concentrações estudadas. Os ensaios de antigenotoxicidade e antimutagenicidade foram realizados com as diferentes concentrações do extrato submetidos a protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo com e sem incubação e pós-tratamento com metanossulfonato de metila (MMS). Os resultados mostraram ausência de genotoxicidade, mutagenicidade e de indução de estresse oxidativo, para todas as concentrações testadas. Contudo, o potencial antigenotóxico e antimutagênico, para os protocolos de pré e pós-tratamento, concentrações de 0,4 e 0,6 g/L, demonstraram eficácia de 100% de redução dos danos induzidos pelo MMS. Embora também tenha havido a redução de danos para concentração de 0,2 g/L, esta foi moderada (40 a 70% de redução). Assim, inferimos que o extrato de *L. barbarum* apresenta a eficácia contra danos causados por hepatotóxicos, resultado este que pode servir como indicativo para um maior investimento na produção de fármacos com este fitoterápico, a serem utilizados com adjuvante em terapias agressivas aos indivíduos, como as quimioterapias, com o intuito de minimizar os seus efeitos.

Palavras-chaves: goji berry; estresse oxidativo; genotoxicidade, mutagenicidade, antimutagenicidade, células HepG2

1. Introdução

Tradicionalmente, a medicina popular utiliza, plantas com finalidades terapêuticas para o tratamento de diversas enfermidades (BRUNING, 2015). A partir dos conhecimentos obtidos na medicina popular, muitas espécies vegetais têm sido alvo de estudos que visam encontrar princípios ativos eficientes para serem usados como fitoterápico (CALIXTO, 2000; GOIS, 2010, SILVA, 2013; SANTOS et al., 2015). Esses estudos esses têm levado a produção de vários fármacos, que vêm sendo amplamente utilizados na área clínica (NASCIMENTO-JUNIOR, 2015). Os fitoterápicos vêm sendo ampla e progressivamente utilizados no combate a diversas patologias (SILVA & CARVALHO, 2004; MCCLEMENTS et al., 2009; HO et al., 2010; DE MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013), sendo aplicados como prática médica complementar a tradicional, em vários países (SANTOS et al., 2011). Muitos fitoterápicos apresentam, além dessas características farmacológicas, um potencial nutricional considerável, sendo então comumente utilizados como alimento. Neste caso, o fitoterápico é denominado de nutracêutico, cujo termo é derivado da junção das palavras “Nutriente” e “Farmacêuticos” (KALRA, 2003).

Na China e na Índia há uma tentativa de reconhecer legalmente o uso terapêutico de princípios ativos de muitas das espécies vegetais que são usadas na medicina popular. A cultura chinesa, por exemplo, tem mais de 5 mil espécies amplamente utilizadas com fins terapêuticos dentre elas o *Lycium barbarum*. (LOPES et al., 2013).

A espécie *L. barbarum*, vulgarmente conhecida como goji berry, é um arbusto da família *Solanaceae*, amplamente cultivado no noroeste da China (MAGALHÃES; CAMARGO; HIGUCHI, 2013). Esta planta produz frutos de cor vermelho brilhante com alto teor de suco, cujas bagas medem, aproximadamente, 1 a 2 cm de comprimento (SEEL; MURRIEL, 2009; ZHONG; SHAHIDI; NACZK, 2012).

Alguns estudos realizados com frutos de goji berry mostram um potencial preventivo contra o câncer e a degeneração macular, assim como melhores respostas imunológicas, aumento da fertilidade masculina, redução dos teores de açúcar e lipídios do sangue que, conseqüentemente, levam a uma redução de doenças cardiovasculares e da diabetes (LUO et al., 2009; WANG et al., 2010; GUOLIANG et al., 2011; CARNÉS et al., 2013; PRASAD et al., 2013). Amagase e Farnsworth (2011) associam as propriedades medicinais/terapêuticas do *L. barbarum*, principalmente, aos teores de ácidos fenólicos (flavonoides, quinonas e cumarinas), que possuem, de acordo com esses autores, atividades farmacológicas comprovadas. Ceccarini et al. (2016) citam, ainda, que essa planta pode apresentar potencial antioxidantes, devido aos seus altos teores de flavonoides. Os autores afirmam que, além de

vários antioxidantes, como betacaroteno e xantinas este também possui uma composição rica em vitaminas C, E, B1, B5.

Essa riqueza nutritiva, associada a ação antioxidante das suas bagas, vêm despertando o interesse da comunidade científica ocidental em investigar as propriedades desta planta e o seu possível uso como um fitoterápico (BALLARIN et al., 2011; MAGALHÃES; CAMARGO; HIGUCHI, 2013). Assim, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de descobrir e ou confirmar os efeitos benéficos dos componentes químicos do goji berry e, conseqüentemente, as suas propriedades farmacológicas para o organismo humano (POTTERAT, 2010; VIEIRA, 2016).

Dentre os testes biológicos aplicados nas investigações das propriedades fitoterápicas, destacam-se os ensaios realizados com a cultura celular HepG2, por essa linhagem ter se mostrado eficaz e sensível na avaliação dos mecanismos de ação de extratos vegetais (MUNARI et al., 2010; JACOBIUNAS et al., 2013). Assim, essas células HepG2 vêm sendo utilizadas em avaliações de genotoxicidade e antigenotoxicidade de extratos de plantas medicinais, bem como dos componentes bioativos derivados dessas plantas (YANG et al., 2011; PILLAY et al., 2013). Esta linhagem celular é considerada um bom modelo de avaliação *in vitro* dos possíveis metabólitos gerados pela metabolização do próprio xenobiótico. Isto porque essas células, por serem derivadas de fígado, apresentam enzimas de metabolização de fase I e II, comuns em hepatócitos humanos normais, que estão envolvidas com a ativação e desintoxicação de substâncias, como pró-carcinógenos (KNASMÜLLER et al., 2004, 1998; LAOHAVECHVANICH et al. 2010).

Considerando o amplo uso de goji berry na medicina popular; o alto teor de macro e micronutrientes desta planta, que lhe confere um bom teor nutricional; e a ampla comercialização internacional do seu fruto para fins terapêuticos, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e indutores de estresse oxidativos do *L. barbarum*, bem como investigar se essa planta apresentam algum efeito citoprotetor, que possa justificar o seu uso como fitoterápico.

2. Materias e métodos

2.1. Fitoterápico testado

Para a realização deste estudo, foi utilizado um extrato seco comercial de *Lycium barbarum*, denominado comercialmente de extrato de goji berry 40 % - 0,250 kg, comercializado pela distribuidora Galena Farmacêutica[®], que foi adquirido em uma drogaria da cidade de Rio Claro-SP.

Para a realização dos bioensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, antigenotoxicidade, antimutagenicidade e de estresse oxidativo foram preparadas diferentes concentrações com o extrato seco de *L. barbarum*, de mesmo lote, que serão descritas a seguir, conforme cada tipo de teste realizado. A escolha das concentrações foi feita com base nas informações toxicológicas constantes no informativo técnico do produto (sob a responsabilidade da Galena Farmacêutica®). Todas as concentrações estudadas foram preparadas com meio de cultura MEM (*Meio Mínimo* Essencial de Eagle), no momento da realização dos bioensaios.

2.2. Análise fitoquímica do extrato de *L. barbarum*

A partir deste extrato, foram realizados ensaios fitoquímicos qualitativos para flavonoides, saponinas e alcaloides e quantitativos para os teores de fenóis totais, além de avaliação da sua atividade antioxidante (método DPPH).

2.2.1. Caracterização fitoquímica qualitativa

As diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum* (0,2; 0,4 e 0,6 g/L) foram caracterizadas por reações químicas qualitativas, desenvolvidas no laboratório de química da Fundação Hermínio Ometto – FHO-UNIARARAS. As análises foram realizadas por meio de testes clássicos de identificação para os principais grupos de princípios ativos: flavonoides (reação com cloreto férrico); saponinas (índice de espuma) e alcaloides (reagente de Dragendorff e Bouchardat) (MELLO; MENTZ; PETROVICK, 2001; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

2.2.2. Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada quantitativamente com o extrato bruto e também desenvolvidas no laboratório de química da Fundação Hermínio Ometto – FHO-UNIARARAS. Primeiramente, foi realizada uma diluição inicial de 0,750 g do extrato vegetal em 250 mL de água destilada. Foram transferidos 5 mL desta diluição para um balão volumétrico de 25 mL e completado seu volume com água destilada. A seguir, 2 mL dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, onde foram adicionados 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2/N) e 10 mL de água. O volume do balão foi completado com solução de carbonato de sódio a 14,06 %. Após a adição da última solução e de um período de descanso de 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro Bel UV M51, (Biovera®) a 691 nm, utilizando água como branco. Os

cálculos deste teste foram feitos pela fórmula expressa em mg eq. de ác. gálico /mL de polifenóis totais:

$$PT = \frac{1565 \times Abs}{1000 \times m}$$

Onde: PT = polifenóis totais
Abs = Absorbância da amostra
m = massa da amostra (GLASL, 1983).

2.2.3. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante, foi realizado o ensaio com 2,2 difenil- 2-picril-hidrazil (DPPH). O DPPH, um radical livre estável, cuja estrutura falta um elétron, é usado para testar o potencial de doação de elétrons entre compostos, como os compostos fenólicos. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH, faz com que este mude sua cor de roxa para amarela, permitindo o monitoramento da reação, por espectrofotômetro. O extrato de *L. barbarum* foi diluído em MeOH, para a obtenção de concentrações finais de 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L. Foram adicionados 1mL de cada amostra em 2mL da solução de DPPH (4 mg de DPPH em 100 mL de MeOH), para se obter um volume final de 3 mL. Após este procedimento, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente e protegidas da luz por 30 minutos. A seguir, a mistura foi lida em espectrofotômetro Bel UV M51, (Biovera®), 517 nm. A leitura da absorbância do teste branco (A₀) foi feito com uma mistura de 2 mL de solução de DPPH em 1 mL de MeOH. Os cálculos deste teste foram feitos pela fórmula:

$$\% \Delta = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

Onde: %Δ = variação da absorbância.
A₀ = Absorbância do DPPH em metanol
A = Absorbância da amostra, após 30 minutos de reação (MICHELIN, 2008).

Como referência, foi utilizado o padrão de quercetina, submetido a diferentes concentrações, seguindo o mesmo processo aplicado nas amostras do extrato testado. Os valores medidos das absorbâncias foram plotados em um gráfico de variação da absorbância (%Δ), *versus* concentração da amostra (MICHELIN, 2008) e submetidos ao teste estatístico ANOVA.

2.3. Metanossulfonato de Metila (MMS)

Para a realização do teste controle positivo (CP), foi utilizada solução aquosa de Metil Metano Sulfonato - MMS (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3) na concentração de 4 x 10⁻⁴ M

(diluição em PBS). Essa substância é considerada potencialmente mutagênica pela IARC (1999).

2.4. Cultivo das células HepG2

Os bioensaios *in vitro* foram realizados com células de hepatocarcinoma humano (HepG2 - ATCC[®] HB-8065[™]), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular (25 cm²), com ventilação, foram mantidos em temperatura controlada de 37 °C, em estufa de CO₂ (5 %) e umidade de 80 %.

2.4.1. Teste do MTT

A determinação da citotoxicidade de *L. barbarum* para as células HepG2 foi feita pelo teste do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - CAS n. 298-93-1, Sigma), seguindo o protocolo estabelecido, inicialmente, por Mosmann (1983), com algumas modificações. O teste foi realizado em placas de 96 poços. Foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células por poço, em um volume total de 100 µL de meio com soro, exceto nos poços referentes ao teste branco, onde foi adicionado apenas o meio de cultura. A placa foi incubada por um período de 24 horas em estufa de CO₂ (5 %) a 37 °C. Transcorridas as 24 horas, o meio foi retirado para serem adicionados 200 µL dos tratamentos, por poço, preparados com as diferentes concentrações do extrato seco de *L. barbarum* (0,05 g/L; 0,1 g/L; 0,15 g/L; 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L). Nos poços destinados ao controle negativo (CN), foi adicionado meio de cultura sem soro e nos poços do controle positivo (CP) solução de Triton X-100 (1 %). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ (5 %) a 37 °C. Após a incubação, os tratamentos foram retirados e adicionados 150 µL de MTT, diluído em PBS, na concentração de 1×10^{-6} mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas, em estufa de CO₂, a 37 °C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Multiskan FC – Thermo Scientific), filtro de 540 nm. Como todas as concentrações testadas apresentaram viabilidade superior a 80%, foram selecionadas para os testes de MN, cometa e de estresse oxidativo as dosagens diárias recomendadas no Informativo Técnico de Goji Bery (0,2; 0,4; 0,6 g/L).

2.4.2. Tratamento para os ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade e antigenotoxicidade e antimutagenicidade

Para os ensaios de genotoxicidade/antigenotoxicidade e de mutagenicidade/antimutagenicidade, as células HepG2 foram expostas às concentrações de 0,2; 0,4 e 0,6 g/L do extrato seco de *L. barbarum*), determinadas previamente pelo teste de Teste de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) e devidamente justificadas para uso nestes ensaios anteriormente. O controle negativo foi realizado com meio de cultura associado a 50 µL de PBS e o controle positivo com 50 µL da solução de MMS (4×10^{-4} M). Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas e em triplicata. As comparações dos resultados dos tratamentos realizados com esse material botânico foram feitas de acordo com o tipo de avaliação realizada: para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade, a comparação foi feita com o CN, enquanto que para os testes de antigenotoxicidade e antimutagenicidade essa comparação foi feita com o CP, uma vez que neste teste se avaliou o efeito protetor do agente estudado.

2.4.3. Ensaio do cometa e viabilidade celular

O ensaio do cometa, realizado para avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico dos extratos de *L. barbarum*, foi feito de acordo com o protocolo estabelecido por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com algumas modificações. Para ambas as avaliações, foram semeadas 5×10^5 células por frasco de cultura de 25 cm². Os frascos foram incubados por um período de 24 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%), em atmosfera úmida, tempo este referente ao período de estabilização das células nos frascos. Em seguida, foram feitas duas avaliações: de genotoxicidade, onde as células foram expostas por 24 horas aos tratamentos; e de antigenotoxicidade, onde foram realizados quatro diferentes protocolos de tratamentos:

- **Pré-tratamento:** as células foram expostas às diferentes concentrações do fitoterápico estudado por 24 horas. Passado este período, o meio foi retirado e as células foram expostas, por mais 24 horas, ao meio de cultura novo, contendo MMS (MMS, CAS No 66-27-3), na concentração de 4×10^{-4} M;
- **Pós-tratamento:** as células foram expostas ao MMS (4×10^{-4} M) por 24 horas. Passado este período, o meio foi retirado e as células foram expostas, por 24 horas, ao meio de cultura novo contendo diferentes concentrações do fitoterápico;
- **Tratamento simultâneo:** as células foram expostas simultaneamente, por 24 horas, ao MMS (4×10^{-4} M) associado às diferentes concentrações do fitoterápico;

- **Tratamento simultâneo com incubação:** a solução de MMS (4×10^{-4} M) foi associada previamente, por uma hora, á 37°C , com as diferentes concentrações do fitoterápicos e, após este período de incubação, as células foram expostas a esta mistura por 24 horas; Além desses tratamentos, foram também realizados os tratamentos de controle negativo (CN- 50 μL de PBS) e controle positivo (CP- MMS, 4×10^{-4} M).

Após os tempos de tratamento descritos acima, as células foram coletadas para a avaliação do potencial genotóxico e antígenotoóxico. As suspensões celulares obtidas da cultura foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com o azul de tripan. Para esta avaliação, foram misturados, em criotubos, 20 μL da suspensão celular com 20 μL de Azul de Trypan, de acordo com a metodologia descrita por Salvadori; Ribeiro; Fenech (2003). Foram quantificadas 100 células por tratamento, a fim de se obter o percentual de células vivas (brancas) e de células mortas (azuis).

Logo após a determinação da viabilidade celular, 20 μL de cada suspensão celular foi misturada com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão, que estava a 37°C . Estas misturas foram dispostas em lâminas previamente revestidas com agarose normal e recobertas com lamínula. Para a remoção das lamínulas, as lâminas foram resfriadas a 4°C por, aproximadamente 20 minutos, para solidificar o gel. Em seguida, após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram expostas a solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM. Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), no escuro, a 4°C , por um período mínimo de 1 hora.

Decorrido o período de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com $\text{pH} > 13$) a 4°C , por 20 minutos, para a deselicoidização do DNA. Após esse processo, as lâminas foram submetidas a eletroforese a 39 V (~ 0.8 V / cm), 300 mA durante 20 minutos. Logo após a eletroforese, as lâminas foram retiradas e neutralizadas em tampão Tris (0,4 M cloridrato de Trizma, pH 7,5), fixadas em etanol absoluto durante 10 minutos e armazenadas a 4°C , até o momento da análise.

As análises microscópicas foram realizadas em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 3⁴ (excitação: $\lambda = 420$ nm – 490 nm, barreira: $\lambda = 520$ nm), por meio da adição de 50 μL de GelRed® (15 μL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada). Foram analisados, ao acaso, em objetiva de 40x, 100 nucleóides por frasco (duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 300 nucleóides/tratamento. Os danos no DNA foram estimados baseados na intensidade de na cauda do DNA medida pelo software Comet Assay IV. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e, de acordo

com a distribuição dos dados, foi realizado o teste estatístico paramétrico ANOVA ($p < 0,05$) *post hoc* Dunnett, para comparar os danos observados nas células tratadas com as concentrações dos extratos de *L. barbarum* com os do controle negativo.

2.4.4. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

A avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade dos extratos de *L. barbarum* foi realizada pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC), de acordo com o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. Para ambas as avaliações, foram semeadas 1×10^6 células em frascos de cultura 25 cm², que foram mantidos, para estabilização, em estufa a 37 °C, 5 % CO₂ em atmosfera úmida, por 24 horas. Após este procedimento, foram realizadas duas avaliações: mutagenicidade, onde as células foram expostas a três concentrações do extrato de *L. barbarum* (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), por 24 horas; e de antimutagenicidade, realizadas por meio de 4 diferentes tipos de tratamentos, conforme já descritos para o ensaio do cometa. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS, o meio foi trocado e foi adicionada 3 µg/mL de citocalasina B (CitoB), onde permaneceram, por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. Em seguida, as células foram coletadas, tratadas com solução hipertônica de citrato de sódio (1 %), fixadas com formol (40 %) e Carnoy (3 etanol : 1 ácido acético). Para o preparo das lâminas, as células foram centrifugadas, a suspensão celular foi ressuspensa em 0,5 mL de Carnoy e gotejada sobre lâminas com um filme de água gelada (4 °C). As lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com Giemsa 5 % por 8 minutos.

As análises foram realizadas em microscopia de luz em objetiva de 100x. Foram contabilizadas 2.000 células binucleadas por frasco (duas lâminas com 1.000 células binucleadas cada), totalizando 6.000 células por tratamento. Dentre as células analisadas, foram consideradas, as células binucleadas normais e as células binucleadas portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares. Os critérios utilizados para essas análises foram descritos por Fenech (2000), onde são selecionadas células binucleadas com integridade nas delimitações nucleares e citoplasmáticas, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração.

2.4.4.1. Determinação do efeito antimutagênico

A atividade antimutagênica pode também ser avaliada pela análise da porcentagem de redução de danos, observada em cada tratamento realizado com os extratos de *L. barbarum*. Para determinar esta porcentagem, foi utilizada a fórmula:

$$\text{Redução (\% RD)} = \frac{a-b}{b-c} \times 100$$

Onde: a = número de células micronucleadas presentes no CP;

b = Número de células micronucleadas nos tratamentos;

c = número de células micronucleadas presentes no CN (ROBERTO et al., 2016).

2.4.4.2. Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)

A partir das mesmas lâminas confeccionadas para o teste do MNBC, foi possível avaliar o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC). Este índice é determinado pela contagem de 500 células por frascos (totalizando 1500 células/tratamento) e indica o número médio de ciclo celulares das células durante o período de exposição à CitoB. O IPBC é, de acordo com a OECD 487 (2012), utilizado para calcular a proliferação celular, cuja fórmula está apresentada a seguir:

$$IPBC = \frac{(M1) + (2x M2) + (3X M3)}{N}$$

Onde: M1 = células com 1 núcleo;

M2= células com 2 núcleos;

M3 = células com multinucleadas;

N = número de células analisadas (OECD 487, 2012).

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e a análise de significância foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA ($p < 0,05$) pos hoc Dunnet, comparando os resultados dos tratamentos com os obtidos no controle negativo (CN).

2.4.5. Avaliação do estresse oxidativo

Os ensaios de estresse oxidativo foram realizados para mensurar as atividades das enzimas de estresse oxidativo Superóxido dismutase (SOD), Glutathione-S-transferase (GST), além dos níveis de Glutathione reduzida (GSH) e do nível de peroxidação lipídica (TBARS) induzidos, em células HepG2, após tratamentos realizados com *L. barbarum*. Para isto, foram semeadas, em frascos de cultura, 1×10^6 células, que foram estabilizadas por 24 horas em estufa de CO₂. A seguir, as células expostas às diferentes concentrações estudadas (0,2; 0,4 e 0,6 g/L) do extrato de *L. barbarum*. Após esse período, as células foram lavadas com PBS gelado, retiradas dos frascos com o auxílio de “scraper”, transferidas para criotubos de 1,5 mL e armazenadas em nitrogênio líquido (LN₂), para posteriores análises.

Os ensaios com essas células seguiram os procedimentos: as células foram retiradas do LN₂ e colocadas em recipiente com gelo e sonicadas em PBS numa frequência de 5 kHz durante, aproximadamente, 10 segundos, por duas vezes, no aparelho QSonica Sonicators (modelo Q55). As análises foram realizadas, em triplicata, em placas de 96 poços. Todos os ensaios foram quantificados em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan, Mannedorf Suíça.

2.4.5.1. Avaliação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, descrito por Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. O ensaio foi realizado com 20 µL da suspensão celular sonicada, 200 µL de tampão TRIS- HCl (25 mM) com EDTA (1 mM, pH 8,5) e 20 µL de pirogalol (15 mM), incubados a 25°C durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 1N e mensurada espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan a 440 nm. A atividade foi expressa em unidades de absorbância/minuto.

2.4.5.2. Avaliação da atividade da Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada de acordo com o método de Habig et al. (1974), com algumas modificações. Foi usada para a realização deste ensaio uma mistura de 20 µL da suspensão celular sonicada, 200 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7.4), 30 µL de GSH (0,1 mM) e 20 µL de CDNB (0,1 mM) (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno. A leitura da absorbância desta mistura foi monitorada, minuto a minuto, por um período total de 5 minutos em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan a 340 nm. O resultado foi expresso em absorbância/ minuto.

2.4.5.3. Avaliação da atividade da Glutathione reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram quantificados pela metodologia descrita por Ellman (1959), com algumas adaptações. Foram adicionados 200 µL da suspensão celular sonicada em um mesmo volume de ácido tricloroacético 20 % (TCA), contendo 1 mM EDTA. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente, para precipitação das proteínas, e, em seguida, foi centrifugada por 5 minutos a 4.500 rpm. Foi retirada do sobrenadante 100 µL de amostra, que foram adicionados em 100 µL de tampão TRIS- HCl (25 mM) com EDTA (1 mM, pH 8,2) e, por último, 20 µL de DTNB (10 mM) (5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)). A absorbância (Abs) foi monitorada, em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan, imediatamente após a adição do DTNB e depois de 15 minutos da exposição, em 412 nm. A concentração de GSH foi calculada pela equação:

$$[\text{GSH (mmol/L)}] = (\text{Abs}_{\text{final}} - \text{Abs}_{\text{inicial}}) \times 1,57 \text{ (mM)} \text{ (ALLAMEH et al., 1997).}$$

2.4.5.4. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS)

A determinação da quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi adaptada de protocolo proposto por Buege e Aust (1978). Foram utilizados 800 μL de suspensão celular sonicada, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67 %), 10 μL de NaOH (10 M) e 500 μL de H_3PO_4 (20 %). Essa mistura foi fervida em banho-maria por 15 minutos e resfriada em gelo. Na sequência, foram adicionados 1,5 mL de n-butanol. Para a extração do cromógeno, a mistura foi vigorosamente agitada e centrifugada por 5 minutos a 3500 rpms, para a separação da fase orgânica. A leitura da sua absorbância foi feita em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan a 535 nm. A concentração de TBARS foi calculada usando $\lambda_{535} = 149.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na equação:

$$[\text{TBARS (mmol/L} \times 10^{-9})] = \frac{\text{Abs}}{\lambda} \times 1000000000$$

2.4.5.5. Análise estatística do estresse oxidativo

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente ao teste ANOVA com pos hoc Dunnet para todos os testes. Os resultados dos tratamentos foram comparados com os resultados do CN.

3. Resultados

3.1. Análises Fitoquímicas

3.1.1. Caracterização fitoquímica

Pela caracterização fitoquímica preliminar, foi observada a presença de flavanoides, saponinas e alcalóides para as três concentrações do extrato de *L. barbarum* (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), em todas as triplicatas (Tabela 1).

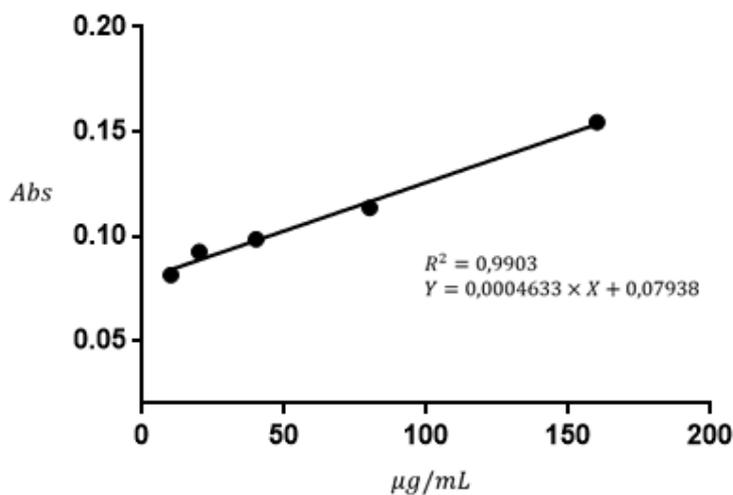
Tabela 1- Triagem fitoquímica das diferentes concentrações dos extratos de *Lycium barbarum*.

Compostos	Concentrações de <i>Lycium barbarum</i>								
	0,2 g/L			0,4 g/L			0,6 g/L		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Flavanóides	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcalóides	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado positivo (presença), por triplicata. T1: triplicata 1; T2: triplicata 2 e T3: triplicata 3.

3.1.2. Determinação do teor de fenóis totais

Para a determinação dos teores de fenóis totais em cada concentração do extrato de *L. barbarum*, foi construída uma curva padrão com ácido gálico, a qual foi tomada como substância de referência (Figura 1). O extrato estudado apresentou 6,03 g equivalente (eq.) de ác. gálico /L, para o teor de polifenóis totais.

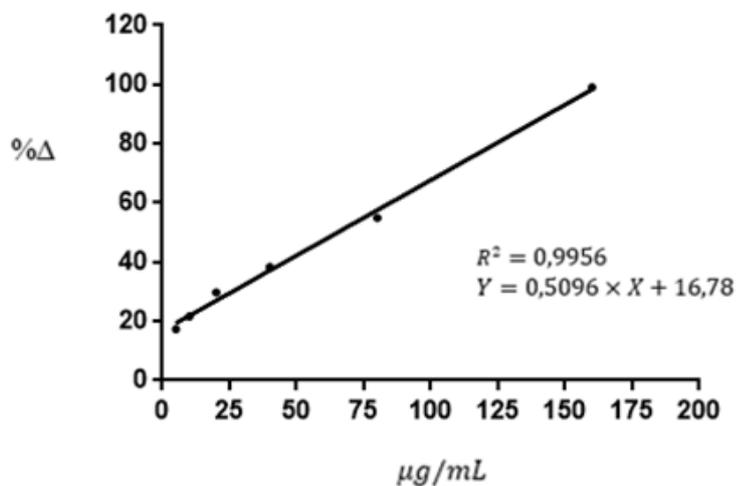
Figura 1: Curva de calibração do teor de fenóis totais realizada com o padrão de ácido gálico.

Abs.: absorvância

3.1.3. Avaliação da atividade antioxidante

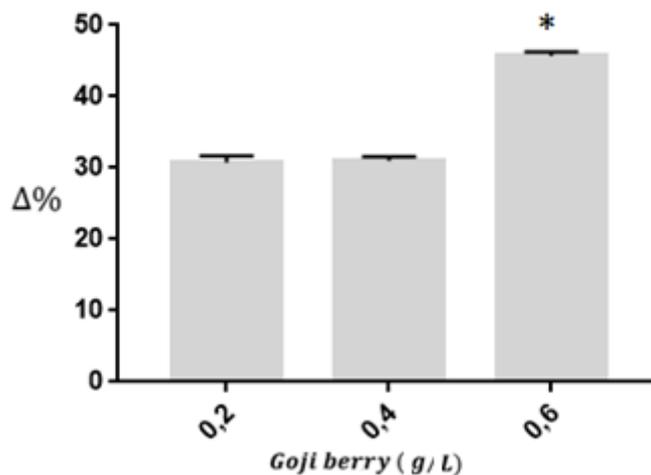
A avaliação da atividade antioxidante, pelo método do DPPH, baseou-se na curva padrão de quercetina (Figura 2). A maior atividade antioxidante foi observada para a maior concentração do extrato de *L. barbarum* (0,6 g/L) (Figura 3).

Figura 2: Curva de calibração da atividade antioxidante, realizada com o padrão de quercetina



$\Delta\%$: variação de porcentagem

Figura 3: Atividade antioxidante das diferentes concentrações de *Lycium barbarum*, expressas em porcentagem de atividade antioxidante

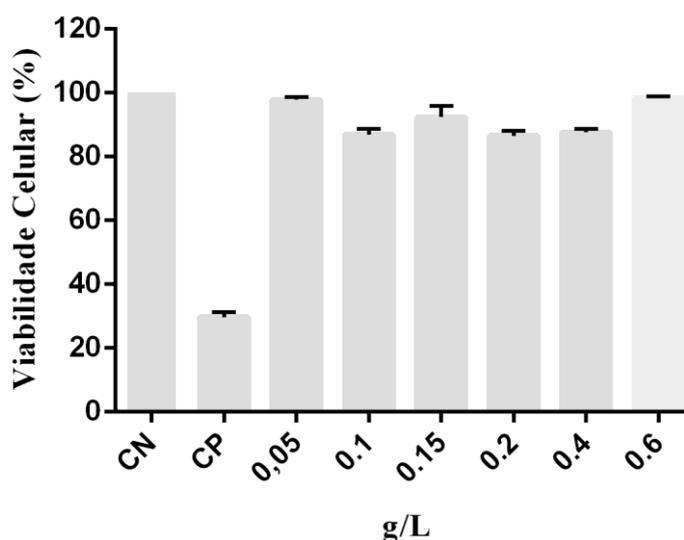


$\Delta\%$: variação de porcentagem. * $p < 0,05$ estatisticamente significativo comparado entre os tratamentos

3.2. Teste do MTT

Os resultados referentes ao efeito citotóxico das diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum* (0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,4 e 0,6 g/L), avaliado pelo teste do MTT em células HepG2, após 24 horas de exposição, demonstraram que nenhuma das concentrações testadas foi citotóxica para essas células, pois todos os ensaios exibiram viabilidade celular superior a 80% (Figura 4).

Figura 4: Viabilidade celular, avaliada pelo teste de MTT com células HepG2 expostas a diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*.



CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo.

3.3. Ensaio do cometa

Os níveis de danos primários no DNA de células HepG2, expostas às diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum* (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), avaliados pelo ensaio do cometa (parâmetro de intensidade da cauda), mostraram que nenhum dos tratamentos realizados com *L. barbarum* induziu genotoxicidade estatisticamente significativa em relação aos resultados do CN. Já para o teste de antigenotoxicidade, todos os tratamentos realizados neste estudo apresentaram diferença significativa, quando comparadas ao CP. Os tratamentos simultâneos com e sem incubação apresentaram morte celular (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados do ensaio do cometa, realizado com células HepG2 após exposição a diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*

	Tratamento	Intensidade da cauda
Genotoxicidade	CN	10,31 ± 1,72
	CP	55,46 ± 7,54*
	0,2 g/L	12,0 ± 2,24
	0,4 g/L	11,74 ± 1,95
	0,6 g/L	10,50 ± 1,30
Antigenotoxicidade	CN	5,12 ± 1,43
	CP	54,78 ± 3,37
	PRÉ 0,2 g/L	21,13 ± 1,58 ^a
	PRÉ 0,4 g/L	20,48 ± 1,68 ^a
	PRÉ 0,6 g/L	17,23 ± 1,63 ^a
	PÓS 0,2 g/L	15,68 ± 0,24 ^a
	PÓS 0,4 g/L	10,94 ± 1,98 ^a
	PÓS 0,6 g/L	5,22 ± 0,95 ^a
	SIM 0,2 g/L	†
	SIM 0,4 g/L	†
	SIM 0,6 g/L	†
	SIM I. 0,2 g/L	†
	SIM I. 0,4 g/L	†
SIM I. 0,6 g/L	†	

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; PRÉ: pré- tratamento; PÓS: pós- tratamento; SIM: tratamento simultâneo; SIM I.: tratamento simultâneo com incubação. *p<0,05: estatisticamente significativo comparado ao CN; ^ap<0,05: estatisticamente diferente comparado ao CP. †: indução de morte celular.

3.4. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Os efeitos mutagênicos das diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum* estudadas foram avaliados pelo teste do MN, (onde foram estimados os valores de MN, brotos), presentes em células binucleadas da linhagem HepG2. Os resultados referentes a esses parâmetros analisados no teste de genotoxicidade demonstraram ausência de efeito mutagênico para todas as concentrações de *L. barbarum* (0,2; 0,4 e 0,6 g/L). Já para o teste de antigenotoxicidade, todos os tratamentos testados apresentaram diferença significativa, quando comparadas ao CP. (Tabela 3).

Tabela 3: Frequências de anormalidade nucleares e de micronúcleos (MN) observadas em células HepG2, expostas a diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*

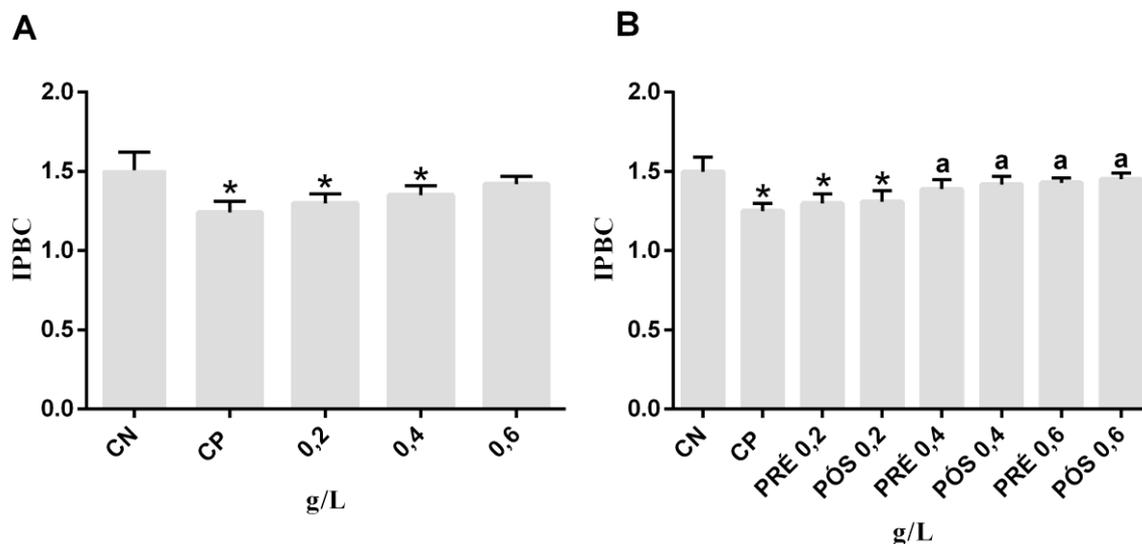
	Tratamento	MN	Broto	Redução
Mutagenicidade	CN	1,0 ± 0,18	0,6 ± 0,13	-----
	CP	4,1 ± 0,12*	1,9 ± 0,15*	-----
	0,2 g/L	1,3 ± 0,26	0,5 ± 0,11	-----
	0,4 g/L	1,2 ± 0,22	0,6 ± 0,12	-----
	0,6 g/L	1,0 ± 0,12	0,7 ± 0,15	-----
Antimutagenicidade	CN	1,1 ± 0,21	0,6 ± 0,13	-----
	CP	4,4 ± 0,4	1,9 ± 0,15	-----
	PRÉ 0,2 g/L	3,1 ± 0,49 ^a	1,1 ± 0,44 ^a	40%
	PRÉ 0,4 g/L	2,3 ± 0,29 ^a	1,0 ± 0,14 ^a	100%
	PRÉ 0,6 g/L	1,58 ± 0,38 ^a	0,8 ± 0,21 ^a	100%
	PÓS 0,2 g/L	1,9 ± 0,25 ^a	0,9 ± 0,15 ^a	70%
	PÓS 0,4 g/L	1 ± 0,14 ^a	0,8 ± 0,15 ^a	100%
	PÓS 0,6 g/L	1 ± 0,12 ^a	0,6 ± 0,19 ^a	100%
	SIM 0,2 g/L	†	†	†
	SIM 0,4 g/L	†	†	†
	SIM 0,6 g/L	†	†	†
	SIM I. 0,2 g/L	†	†	†
	SIM I. 0,4 g/L	†	†	†
SIM I. 0,6 g/L	†	†	†	

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; PRÉ: pré- tratamento; PÓS: pós- tratamento; SIM: tratamento simultâneo; SIM I.: tratamento simultâneo com incubação. *p<0,05 estatisticamente significativo comparado ao CN; ^ap<0,05: estatisticamente diferente comparado ao CP. †: indução de morte

3.4.1. Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)

O IPBC induzido pelo extrato de *L. barbarum* sobre as células HepG2, mostraram que as concentrações de 0,2 g/L e 0,4 g/L induziram uma diminuição dos valores deste índice, quando comparados com os resultados do CN. Contudo a concentração de 0,6 g/L mostrou uma resposta de proliferação semelhante estatisticamente à do CN (Figura 5 A). As avaliações do IPBC, após os pré e pós-tratamentos com as concentrações estudadas do *L. barbarum*, mostraram que as concentrações de 0,4 g/L e 0,6 g/L apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao CP, e uma tendência de normalização com os resultados observados no CN (Figura 5 B).

Figura 5: Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) para estimar o potencial proliferativo do *Lycium barbarum* sobre células HepG2 (A) e dos efeitos dos pré e pós-tratamentos com este extrato vegetal (B).

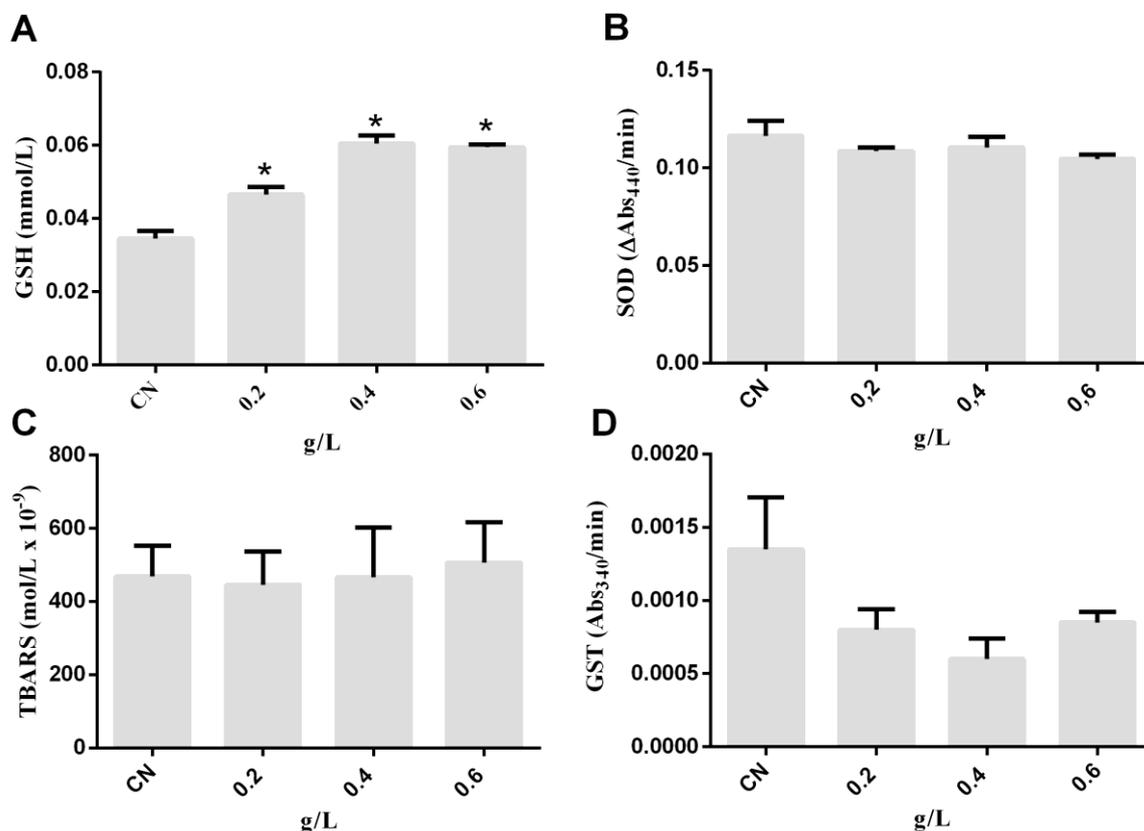


* $p < 0,05$ estatisticamente significativo comparado ao CN; ^a $p < 0,05$: estatisticamente diferente comparado ao CP

3.4. Avaliação do estresse oxidativo

Os efeitos dos extratos de *L. barbarum*, sobre o mecanismo de defesa antioxidante das células HepG2, foram avaliados pelas atividades das enzimas SOD e GST e pelos níveis de GSH e TBARS. Somente os resultados da dosagem dos níveis de GSH, de todos os tratamentos testados (0,2; 0,4 e 0,6 g/L), exibiram diferença significativa, em relação ao CN (Figura 3).

Figura 3: Efeitos nos níveis de GSH (Glutationa Reduzida) (A); SOD (Superóxido Dismutase) (B); TBARS (espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico) (C); GST (Glutationa S-transferase) (D), sobre a cultura celular HepG2 exposta a diferentes concentrações do extrato de *Lycium barbarum*.



*p<0,05 estatisticamente significativo.

4. Discussão

Na literatura, as substâncias bioativas são classificadas como tóxicas ou como nutracêuticas. Compostos tóxicos são agentes químicos que causam efeitos adversos a saúde humana, sejam eles de origem natural ou derivados de síntese realizadas pelo homem. Os nutracêuticos são compostos que apresentam, além de potencial farmacológico, como os fitoterápicos, um valor nutricional reconhecido. O próprio termo “nutracêutico” tem como origem a junção das palavras “Nutriente” e “Farmacêuticos” (KALRA, 2003). Considerando que *L. barbarum* (goji berry) é uma planta utilizada tanto na medicina popular como na alimentação, ela pode ser, então, considerada um nutracêutico.

O presente estudo avaliou, por meio do teste do MTT realizado com células de hepatocarcinoma humano (HepG2), os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*.

O potencial genotóxico do *L. barbarum* para HepG2 foi avaliado pelo ensaio do cometa, entretanto, para a prosseguir com este teste foi necessária a realização prévia de um teste de viabilidade celular com azul de Trypan (ANDERSON; PLEWA, 1998; TICE et al., 2000). Neste teste, obtivemos também uma viabilidade celular superior a 85 %, para todas as concentrações testadas, confirmando os resultados obtidos no teste do MTT.

Os resultados obtidos, para todas as concentrações testadas (0,2, 0,4 e 0,6 g/L), não demonstraram diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle negativo, indicando que o *L. barbarum* não apresenta nenhum efeito genotóxico para as células HepG2. Estudos de Ceccarini et al. (2016), que também evidenciaram, para células HepG2, ausência de efeito citotóxico para diversas concentrações do extrato de *L. barbarum* (400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, e 2800 $\mu\text{g/mL}$), pelo teste do MTT e do azul de Trypan. Esses autores também observaram ausência de genotoxicidade (ensaio do cometa) para as concentrações de 200, 600, 1000, 1400, e 1800 $\mu\text{g/mL}$ do extrato, após 4 horas de tratamento.

Embora o ensaio do cometa tenha a capacidade de detectar lesões primárias no DNA, essas lesões podem ser passíveis de correção. Quando as lesões são corrigidas adequadamente, o dano induzido não se fixa, portanto não se caracterizando como um efeito mutagênico (SOUZA, FONTANETTI, 2006). Sendo assim, foram realizados neste estudo ensaios de mutagenicidade pelo teste de MN com bloqueio de citocinese, pois, de acordo com Maluf (2004), a associação do ensaio do cometa com o teste do MN permite analisar de forma mais conclusiva os resultados obtidos no ensaio do cometa.

Os resultados observados em todas as concentrações testadas de *L. barbarum* pelo teste do MN com bloqueio de citocinese, para os parâmetros MN, ponte e brotos, não foram estatisticamente significativos, quando comparadas com o controle negativo, indicando ausência de efeito mutagênico para o extrato estudado.

Devido à ausência de genotoxicidade e mutagenicidade do extrato de *L. barbarum* registrada neste estudo e as referências de propriedades hepato-protetoras desta e de outras plantas do gênero *Lycium* (grupo das “wolfberries”), estudadas por XIAO et al. (2012, 2013, 2014), neste estudo foram realizados o teste de antigenotoxicidade, por meio do ensaio do cometa, e de antimutagenicidade, por meio do ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese. A primeira indicação de efeito antigenotóxico registrado para *L. barbarum* foi descrita por Ceccarini et al. (2016), que demonstraram, por meio de dados globais, obtidos pelo teste do cometa, um potencial antigenotóxico para os extratos desta planta.

O teste de antigenotoxicidade desenvolvido neste estudo (ensaio do cometa) demonstrou redução estatisticamente significativa na intensidade da cauda, para os pré e pós tratamentos, quando comparados ao CP. Os dados apresentaram uma diminuição da intensidade da cauda diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato. Além disso, também se pode observar que, em todas as concentrações testadas do extrato, os pós tratamentos foram os mais eficazes na redução de danos, sendo que a maior concentração (0,6 g/L) exibiu resultados semelhantes ao do CN.

Amagase e Farnsworth (2011) identificaram, dentre os componentes bioativos do extrato de *L. barbarum*, quinonas, que são compostos que possuem diversas propriedades farmacológicas como atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e anticancerígenas (ALMEIDA, 2017). Há vários modos de ação pelos quais as quinonas exercem essas atividades, sendo que a sua principal ação é a indução de danos (ASCHE, 2005; MARINHO FILHO, 2012; FARIAS, 2014). Esses danos são promovidos pela ação das quinonas sobre a molécula de DNA, pois algumas delas atuam como agente intercalantes ou inibidores da biossíntese de nucleotídeos (COSTA, 2009).

Beranek (1990) afirma que a ação tóxica das quinonas sobre o DNA é semelhante aos efeitos promovidos pelo MMS, uma vez que esse composto é um agente alquilante monofuncional ou seja, possuem a habilidade de interagem diretamente com o DNA promovendo quebra de fita dupla nesta molécula (ALMEIDA et al., 2005). Sendo assim, essa substância tem sido usada, há muito tempo, para estudar eventos de mutagenicidade e carcinogenicidade (BERANEK, 1990). Outros autores citam que o MMS é um agente modificador de bases do DNA, que gera aberrações cromossômicas (KANDASAMY et al., 2009; RANK, 2003). Diante dos efeitos similares das duas substâncias, sugere-se a possibilidade de haver uma interação das ações dos compostos presentes no extrato de *L. barbarum* (como as quinonas) com o MMS.

Os tratamentos simultâneos, sem e com incubação, induziram morte celular nas células HepG2. Esse efeito sugere que houve uma possível ação conjunta entre o MMS (utilizado para induzir danos) e os compostos bioativos presentes no extrato. Dentre as ações interativas de compostos químicos, as aditivas são aquelas cujo efeito final observado é igual à soma dos efeitos isolados dos agentes indutores, e a sinérgica, aquelas cujo efeito final é sempre maior que a soma dos efeitos individuais.

Pelos efeitos de morte celular observados para todas as células tratadas com as três concentrações do extrato de *L. barbarum* (tratamentos simultâneos) fica difícil inferir qual o tipo de interação ocorreu entre os dois agentes (extrato e MMS), só sendo possível sugerir uma

ação conjunta que foi letal para as células. Entretanto, esse elevado efeito citotóxico em combinação com agentes alquilantes podem ser promissores medicamentos para tratamento câncer visando a eliminação de células tumorais.

Outro parâmetro avaliado por meio do teste do MN foi o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC). As concentrações de 0,2 e 0,6 g/L, avaliadas no teste de mutagenicidade, levou a uma diminuição significativa do IPBC, quando comparadas ao controle negativo. Já no teste de antimutagenicidade, a concentração que apresentou uma diminuição significativa do IPBC, em relação ao controle negativo, para ambos os tratamentos (pré e pós), foi a de 0,2 g/L. As demais concentrações (0,4 g/L e 0,6 g/L) avaliadas neste ensaio apresentaram um aumento significativo deste parâmetro, em relação ao controle positivo. Estes resultados são corroborados pelos estudos de Mao et al. (2010), no qual os autores descrevem uma inibição da proliferação de diversos tipos de células cancerosas, após a exposição das mesmas aos extratos de *L. barbarum*, além da indução da parada do ciclo celular na fase G0/G1, S ou G2/M.

Zhang et al. (2005) demonstraram inibição do crescimento de células de hepatoma humano (QGY7703), após tratamento com *L. barbarum*. Os pesquisadores também verificaram a paradas do ciclo células na fase S sugerindo este mecanismo como um dos possíveis sistemas responsáveis pela atividade antiproliferativa do *L. barbarum* em células de hepatoma humano.

O mesmo efeito descrito acima para antigenotoxicidade foi observado também nos tratamentos simultâneos, sem e com incubação, do teste de antimutagenicidade. Neste teste foram observadas diferenças significativas entre as frequências de MN e brotos nucleares dos pré e pós-tratamentos e o controle positivo, mostrando que o extrato é eficaz na redução de danos. As concentrações de 0,4 e 0,6 g/L destacaram-se como as mais eficazes nesta redução (100%). Avaliando a diferença de resposta observada para a concentração de 0,2 g/L, entre o pré (40%) e pós tratamento (70%), podemos concluir que o pós-tratamento se mostrou mais efetivo na redução de danos causados pelo MMS.

A ação antimutagênica pode ser avaliada pela porcentagem de redução de danos (RD %), classificada dentre as categorias de forte (% RD maior que 70%), moderada (% RD entre 40% a 70%) e neutra (% RD abaixo de 40%) (CAILLET et al., 2011; GONTIJO; FIETTO; LEITE, 2014). De acordo com essa avaliação, podemos classificar a ação antimutagênica de todos os pós tratamentos como “forte” (0,2 g/L = 70%, 0,4 g/L e 0,6 g/L= 100%), assim como para os pré-tratamentos das concentrações de 0,4 g/L e 0,6 g/L (100%). Apenas a concentração 0,2 g/L do pré-tratamento foi classificada como de ação “moderada” (40%).

Pelos resultados obtidos, pode-se sugerir que o extrato estudado se comporta como um agente antimutagênico, por meio de ação desmutagênica e bioantimutagênica. A literatura define como agente antimutagênico uma substância capaz de prevenir ou reduzir danos ocasionados induzidos por agente mutagênicos. Essa ação pode acontecer por meio de eventos de desmutagênese, quando a substância possui a capacidade de inativar o agente indutor do dano, ou de eventos de bioantimutagênese, onde a substância é capaz de impedir a fixação do dano (mutação) (MITSCHER et al. 1996; SILVA, 2015; CARNEIRO, 2016).

Um grande número de estudos associa os nutracêuticos á atividades antimutagenicos e anticarcinogênicos. Esta correlação estabelecida é devida a capacidade dos antioxidantes protegerem os tecidos biológicos dos danos ao DNA induzidos por espécies reativas, resultantes do estresse oxidativo (ANDERSON et al., 1995; WEIJL et al., 1997; SENDÃO, 2004). Dentre os antioxidantes com poder anti-inflamatório, antimutagênico e anticarcinogênico encontrados em vegetais, podemos citar compostos fenólicos, como os flavonoides e alcaloides (CAI et al., 2006; PALIOTO et al., 2015).

Por fim, também foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo (GST, SOD, TBARS e GSH) em células HepG2 expostas às diferentes concentrações de *L. barbarum*, para estimar se este nutracêutico promove aumento de produção de radicais livres. Essa avaliação se baseia nas descrições de Birben et al., (2012), que correlacionam o aumento de citotoxicidade de um composto ao seu mecanismo de indução de radicais livres na célula. Os presentes resultados não demonstraram diferença significativa para as atividades das enzimas SOD e GST, assim como para os níveis séricos de TBARS, indicando ausência de indução de estresse oxidativo. Apenas obtivemos aumento significativo para os níveis de GSH.

A GSH é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina (NETO et al., 2013), que interfere em diversos processos biológicos como antioxidantes e detoxificante, transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa de certas enzimas, proteção do organismo contra a exposição a radiações solares e na morte celular programada (YOU; PARK, 2010; CRUZ, 2016). Esta molécula é considerada um dos principais eliminadores de radicais livres das células, que, juntamente com os tióis não-proteicos, atuam na prevenção da toxicidade induzida pelos radicais livres (HAENEN; BAST, 2014). Sendo assim, acredita-se que o aumento de GSH observado neste estudo poderia representar uma proteção celular decorrente da ação do extrato de *L. barbarum*, caracterizado como um evento auxiliar na defesa da célula.

Os resultados, obtidos nos ensaios de estresse oxidativo, são corroborados por outros estudos que demonstraram, em ratos, que o uso diário de extrato etanólico de *L. barbarum*

promoveu uma diminuição de danos oxidativos induzidos por alta ingestão de paracetamol (GUNDUZ et al. 2015). Cheng e Kong (2011) também investigaram, em ratos, o efeito protetor do *L. barbarum* sobre lesões hepáticas induzidas pela ingestão de álcool. Os pesquisadores demonstraram que a administração de 300 mg de *L. barbarum*/kg de peso do animal, durante 30 dias, foi capaz de reverter, significativamente, as lesões hepáticas induzidas pelo etanol.

Donno et al. (2014) identificaram e quantificaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 17 compostos bioativos presentes nos frutos de goji berry, com prevalência para os ácidos orgânicos e compostos polifenólicos. Dentre os compostos citados acima, foram também identificados nas análises fitoquímicas do presente estudo flavanoides, saponinas e alcaloides, além de um eminente teor de polifenóis. Com os compostos identificados por Donno et al. (2014) e as análises químicas realizadas com as presentes amostras possuem, de acordo com Cai et al. (2006), Palioto et al. (2015) e Ceccarini et al. (2016), potencial antioxidante, foi então avaliado este potencial antioxidante das diferentes concentrações de goji berry pelo método do DPPH. A metodologia do DPPH se baseia na capacidade do radical estável 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) reagir com os doadores de hidrogênio, ocasionando mudança de coloração na solução variando de roxa para amarela, conforme o radical é eliminado por substâncias com propriedades antioxidantes (OSMAN et al., 2012). A atividade sequestradora do radical DPPH baseou-se na curva padrão de quercetina, por ser este o flavonoide mais evidente das bagas de goji berry (LI; LI; ZHOU, 2007; WANG et al., 2010; MOURA, 2016).

Dentre as concentrações testadas do extrato de *L. barbarum*, a de 0,6 g/L foi que apresentou o maior poder antioxidante, quando comparado com os resultados do controle negativo. Por estes resultados, pode-se inferir que a maior concentração testada deste fitoterápico possui maior capacidade de neutralizar a ação dos radicais livres, sendo eficiente para proteger as células contra os efeitos danosos das reações de oxidação.

O presente estudo mostrou que as concentrações de 0,2; 0,4 e 0,6 g/L de *L. barbarum* apresentam potencial antígeno-tóxico e antimutagênico para células de hepatoma humano (HepG2), com promissoras %RD. Os dados também demonstraram ausência de indução de estresse oxidativo para o extrato estudado e um aumento da proteína GSH, indicando um possível efeito protetor deste nutracêutico. Este estudo aponta que o *L. barbarum* apresenta um potencial promissor para ser utilizado nas produções de fitoterápicos, tanto pelos seus efeitos protetivos observados, como pela ausência de toxicidade desse material botânico. Para tanto são necessários estudos mais detalhados sobre o seu potencial farmacológico.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as concentrações de 0,2; 0,4 e 0,6 g/L do extrato de *L. barbarum* não induziram efeitos genotóxicos nem mutagênicos em células HepG2. Contudo, as mesmas concentrações apresentaram um efeito protetor contra a ação de um agente comprovadamente mutagênico (MMS), indicando, assim, um alto potencial antigenotóxico e antimutagênico para este fitoterápico.

O *L. barbarum* apresenta uma ação protetora tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese, demonstrada pelas porcentagens significativas de redução de danos (% RD), bem como pelo aumento dos níveis de GSH observados. Entretanto, como nossos resultados foram obtidos em sistema teste *in vitro*, há a necessidade de se realizar, ensaios com sistemas testes *in vivo*, para a certificação dos seus efeitos sobre organismo humano. Sendo assim, para que essa planta possa ser usada com segurança ainda são necessários mais estudos que possam avaliar, detalhadamente, os seus mecanismos de ação na proteção da molécula de DNA.

Por fim, destacamos a importância do presente estudo por revelar possíveis potenciais antigenotóxico e antimutagênico do *L. barbarum*, o que pode auxiliar nos desenvolvimentos de formulações farmacológicas eficazes na prevenção de danos induzidos por agentes com potencial genotóxico e ou mutagênicos.

6. Referências Bibliográficas

ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mechanisms of ageing and development**, v. 95, n. 1-2, p. 71–79, 1997.

ALMEIDA, P. D. O. **Estudo do potencial antineoplásico de uma nova naftoquinona sintetizada a partir da Lausona**. 2017. 134 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**, v. 44, p. 1702-1717, 2011.

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67–73, 1998.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, S. D. EDWARDS, A. J. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo genotoxicity assays. **Mutat. Res.**, v. 329, p. 37-47, 1995.

ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 5, p. 449-467, 2005.

BALLARIN, S.M.; MATAS, M. A. L.; ABAD, D.S.; CINTO, N, P; CARNÉS J. Anaphylaxis Associated With the Ingestion of Goji Berries (*Lycium barbarum*). **J Investig Allergol Clin Immunol**. v. 7, p. 567-570, 2011.

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutat Res**. 231:11–30, 1990.

BIRBEN, E. S. R. A.; MURAT SAHINER, M.D.; CANSIN SACKESSEN, M.D.; SERPIL ERZURUM, M. D. ; KALAYCI, M. D. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

BRUNING, M. C. R. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais: Em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde**. Novas Edições Acadêmicas, 2015.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. *Methods and Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.2872-2888, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAILLET, S.; LESSARD, S.; LAMOUREUX, G.; LACROIX, M. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. **Food Chemistry**, 124, 1699–1707, 2011.

CARNEIRO, C.C. **Avaliação das atividades genotóxica, antígenotóxica, citotóxica, anticitotóxica, angiogênica e antiangiogênica de elagitânicos utilizando ensaios in vitro e in vivo**. Tese (Doutorado em Biologia) -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

CARNÉS, J., LARRAMENDI, C. H., FERRER, A., HUERTAS, A. J., MATAS, M. A. L., PAGÁN, J. A., NAVARRO, L. A., ABUJETA, J. L. G., VICARIO, S., PEÑA, M. Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to Goji berries (*Lycium barbarum*). *Food Chemistry*, v.137, p.130-135, 2013.

CECCARINI, M. R.; VANNINI S, CATALDI S, MORETTI M, VILLARINI M, FIORETTI B, ALBI E, BECCARI T, CODINI M. *In Vitro* Protective Effects of *Lycium barbarum*. Berries Cultivated in Umbria (Italy) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **BioMed research international**, v.2, 2016.

CHENG, D., KONG, H. The effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on alcoholinduced oxidative stress in rats. **Molecules**. v. 16, p. 2542–2550, 2011.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAC, V.; DUSINKAD, M.; MOLLERF, P.; ROJASG, E.; DHAWANHI, A.; BENZIEJ, I.; COSKUNK, E.; MORETTIL, M.; SPEITM, G.; BONASSIC, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project, **Mutation Research**, v. 759, p. 27-39, 2014.

COSTA, A. M. **Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogos do lapachol**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2009.

CRUZ, K. S. **Otimização numérica da produção de glutatona por saccharomyces cerevisiae utilizando subprodutos industriais**. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

DE MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. doi: 10.5102/ucs.v9i1.1308. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

DONG, J. Z.; WANG, S. H.; ZHU, L.; WANG, Y. Analysis on the main active components of *Lycium barbarum* fruits and related environmental factors. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 12, p. 2276-2283, 2012.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium spp.*): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, p. 6–20, jun. 2014.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R.I dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 229-245, 2003.

FARIAS, M. S. **Dano ao DNA, citotoxicidade, efeito antiproliferativo e antitumoral de 1, 4-naftoquinonas substituídas**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FIC, B.; ŽEGURA, M.; DOLENC, S.; FILIPIČ, M.; MAŠIČ, L. P. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. **Arh. Hig. Rada Toksikol.**, v. 64, p. 189–200, 2013.

GLASL, H. Zur Photometric in der Drogenstandardisierung- 3. gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

GÓIS, R. W. S. **Estudo fitoquímico e biológico de Bauhinia acuruana Moric**. 2010. Tese de Doutorado. Dissertation, Federal University of Ceará.

GONTIJO, D.C.; FIETTO, L.C.; LEITE, J.P.V. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagenica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Coimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 4, p.874-880, 2014.

GUNDUZ, E.; DURSUN, R.; ZENGİN, Y.; İÇER, M.; DURGUN, H. M.; KANICE, A.; KAPLAN, I.; ALABALIK, U.; GURBUZ, H.; GULOGLU, C. *Lycium barbarum* extract provides effective protection against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 7898-7905, 2015.

GUOLIANG, L., JUNYOU, S., YOURUI, S., ZHIWEI, S., LIAN, X., JIE, Z., JINMAO, Y., YONGJUN, L. Supercritical CO₂ cell breaking extraction of *Lycium barbarum* seed oil and determination of its chemical composition by HPLC/APCI/MS and antioxidant Activity. **LWT. Food Science and Technology**, v. 44, p. 1172-1178, 2011.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HAENEN, G.; BAST, R. M. M. Glutathione revisited: a better scavenger than previously thought. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, 2014.

HO, C.; RAFI, M.M.; GHAI, G. Substâncias Bioativas: Nutracêuticas e Tóxicas. In: Damodaran, S.; Parkin, K.L.; FENNEMA, O. R. (Ed). **Química de Alimentos de Fennema**, 4ªed., Porto Alegre: Artimed, 900 p., 2010.

INFORMATIVO TÉCNICO DE GOJI BERRY, Pharmanostra, Florata International Alliance of Dietary/Food Supplement Associations. Disponível em: < <http://www.ia-dsa.org/page.php?key=faqs,3434d0867d55785a1f9529272a4366b58c6a3084,0,1>>. Acesso em 13/11/2017.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Overall evaluations of carcinogenicity: Lyo: IARC; 1999. p.1059. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, v. 71.

JACOCIUNAS, L. V.; DE ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M.; DE ABREU, B. R. R.; FERRAZ, A. D. B. F.; DA SILVA, J.; DIHL, R. R. Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis block micronucleus (CBMN) cytochrome assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 56-59, 2013.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales. **Nutrición Hospitalaria**, v.28, n.5, p.1413-1421, 2013.

KALRA, E. K. Nutraceutical-definition and introduction. **AAPS PharmSci**. 2003 Sep; 5(3): 27–28, 2003.

KANDASAMY, M. K., E. C. MCKINNEY, R. B. DEAL, A. P. SMITH, AND R. B. MEAGHER. *Arabidopsis* actin-related protein ARP5 in multicellular development and DNA repair: **Dev Biol**, v. 335, p. 22-32, 2009.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 185–202, 1998.

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1–3, p. 315–328, 2004.

LAOHAVECHVANICH P, MUANGNOI C, BUTRYEE C, KRIENGSINYOS W. Protective effect of makrut lime leaf (*Citrus hystrix*) in HepG2 cells: Implications for oxidative stress. **Science Asia**, v.36, p.112-117, 2010.

LOPES, M. I.; LOPES, R. C.; DA FONSECA, R. R.; NEVES, A. P. M.; DE OLIVEIRA, J. D.; PAULA, M. M. M. X.; DOS SANTOS, J. O. G. Uso racional de Plantas Medicinais: Um Resgate Popular na Região do Vale do Assu–RN. **Informativo Técnico do Semiárido**, v. 7, n. 1, p. 23-29, 2013.

LUO, Q.; LI, Z.; YAN, J. ZHU, F.; XU, R. J.; CAI, Y. Z. *Lycium barbarum* Polysaccharides Induce Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells and Inhibits Prostate Cancer Growth in a Xenograft Mouse Model of Human Prostate Cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 695–703, 2009.

MAGALHÃES, B. H.; CAMARGO, M. F.; HIGUCHI, C. T. Indicação de uso de espécies vegetais para o tratamento da celulite com fins cosméticos. **InterfacEHS - Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 8, n. 3, 2013.

MALUF, S. W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v. 347, p. 15–24, 2004.

MAO, F.; XIAO, B.; JIANG, Z.; ZHAO, J.; HUANG, X.; GUO, J. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. **Medical Oncology**, v. 28, p. 121–126, 2010.

MARINHO FILHO, José Delano Barreto. **Participação das vias ATM/ATR e C-MYC/GSH nos efeitos antitumorais da cordiaquinona J induzidos pelo estresse oxidativo**. 2012. 173 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.49, n.6, p.577-606, 2009.

MELLO, J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. 821p.

MICHELIN, D. C. **Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* (L.) urb. (*Convolvulaceae*)**. 2008. 144 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008

MITSCHER, L. A.; TELIKEPALLI, H.; MCGHEE, E.; SHANKEL, D.M. Natural antimutagenic agents. **Mutat Res.** v. 350 p. 143-152, 1996.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods.** 65, 55-63, 1983.

MOURA, C. **Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e goji berry: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo petit suisse**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MUNARI, C. C.; ALVES, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 22-28, 2010.

NASCIMENTO-JUNIOR, N. M. A relação entre fragmentos estruturais oriundos de produtos naturais e compostos bioativos. **Rev. Virtual Quim**, 2015, 7(2), 697-712.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis.** 6, 399-403, 1991.

NETO, J. M. F. A.; NADER, B.B.; DONADON, C. C.; TUROLLE, D. C. S.; RIBEIRO, E. Biomarcadores de Estresse no Futebol-Parte 2: Dosagem Sanguínea dos Níveis de Estresse Oxidativo. **RBFF-Revista Brasileira de Futsal e Futebol**, v. 5, n. 17, 2013.

OECD, ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, 2012. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cellmicronucleus-test_9789264224438-en>. Acesso em 28/11/2017

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANFITH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Exptl. Cell Res.**, v. 198, p. 259-260, 1992.

OSMAN N. I., AWAL A., SIDIK N. J., ABDULLAH S. Antioxidant activities of in vitro seedlings of *Lycium barbarum* (goji) by diphenyl picrylhydrazyl (dpph) assay. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 2012; 4(4):137-41.

PALITO G.F.; SILVA C.F.G.; MENDES M.P.; ALMEIDA V.V.; ROCHA, C.L. M.S.C.; TONIN L.T.D. Proximate composition, bioactive compounds and antioxidant activity of fruits of *Morinda citrifolia* L. (noni) cultivated in Paraná, Brazil, **Rev. bras. Plantas med.** vol.17 no.1 Botucatu Jan./Mar. 2015.

PILLAY, P.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A. A.; DU TOIT, K., BODENSTEIN, J. The cytotoxic effects of *Scilla nervosa* (Burch.) Jessop (Hiocinthaceae) aqueous extract on culture HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 200- 204, 2013.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Medica**, n.76, v.1, p.7–19, 2010.

PRASAD, N., YANG, B., KONG, K.W., KHOO, H. E., SUN, J., AZLAN, A., ISMAIL, A., ROMLI, Z. B. Phytochemicals and Antioxidant Capacity from Nypafruticans Wurmb. Fruit. Hindawi Publishing Corporation **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2013.

RANK, J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay: **Ekologija**, v. nr. 1, p. 5, 2003.

ROBERTO, M. M., MATSUMOTO, S. T., JAMAL, C. M., MALASPINA, O., MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro** v.33, p. 9-15, 2016.

SALVADORI, D.; RIBEIRO, L.; FENECH, M. **Teste do micronúcleo em células humanas in vitro**. In: RIBEIRO, L. M.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra. 2003.

SANTOS, C. A. L.; CRUZ, D. D.; ARAÚJO, P. S. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana da tintura de barbatimão (*stryphnodendron adstringens*) sobre bactérias planctônicas recuperadas de amostra clínica. **JORNADA CIENTÍFICA DA UNESC**, n. 1, 2015.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C. PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. bras. plantas med.** [online]. vol.13, n.4, pp.486-491, 2011.

SCHOONEN, W. G.; DE ROOS, J. A.; WESTERINK, W. M.; DÉBITON, E. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. **Toxicol. Vitro**, v. 19, n. 4, p. 491–503, 2005.

SEEL, P.; MURRIEL, G. **Flora of Britain and Ireland**. Cambridge, p.325-326, 2009.

SENDÃO, M. C. **Efeito do licopeno na mutagenicidade induzida pela cisplatina em ratos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, 2004.

SILVA, A. A. **A intervenção farmacêutica na prescrição dos medicamentos fitoterápicos**. TCC - Especialização. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, 2013. 2013.

SILVA, C. R. **Genética toxicológica da chalcona sulfonamida (CPN): evidências de genotoxicidade e antimutagenicidade em diferentes sistemas-teste in vivo e in vitro**, 88 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SILVA, M. C.; JCARVALHO, J. C. T. PLANTAS MEDICINAIS: IN: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiinflamatórios. **Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004, 480 p.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175, 184-191, 1988.

SOUZA, T.; FONTANETTI, C. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 605, pp. 87-93, 2006.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; Kobayashi, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutat. Res.**, v. 441, n. 2, p. 215-224, 1999.

VALENTIN-SEVERIN, I.; LE HEGARAT, L.; LHUGUENOT, J. C.; LE BON, A. M.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutat. Res.**, v. 536, n. 1-2, p. 79-9, 2003.

VIEIRA, É. D. A. **Potencial nutricional e antioxidante de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, 2016.

WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN B. H. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 184-192, 2010.

WEIJL, N. I., CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, v.23, p. 209-240, 1997.

XIAO J, LIONG EC, CHING YP, CHUEN CHUNG, R. CHANG, K. FAISO· M. LUNGFUNG, G., TIPOE L. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. **J Ethnopharmacol.** v.139, n. 2, p. 462-470, 2012.

XIAO J, LIONG EC, CHING YP, CHUEN CHUNG, R. CHANG, K. FAISO· M. LUNGFUNG. *Lycium barbarum* polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury. **Nutr Diabetes.** v. 3, n. 81, 2013.

XIAO J.; XING F.; HUO J.; CHUEN CHUNG, R.; CHANG, K.; FAISO, M.; LUNGFUNG, G.; TIPO, E. *Lycium barbarum* polysaccharides therapeutically improve hepatic functions in non-alcoholic steatohepatitis rats and cellular steatosis model. **Sci Rep.** v. 4, p. 5587, 2014.

YANG, G.; ZHONG, L.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; SUN, X.; MA, Y. 6-gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. **Phytotherapy Resources**, v. 25, p. 1480-1485, 2011.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1356–1362, 2010.

ZHANG, M.; CHEN, H.; HUANG, J; LI, Z.; ZHU, C.; ZHANG, S. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis. **Life Science**, 76(18), 2115–2124, 2005.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Hui: Food Science and Technology: Dried Fruits : **Phytochemicals and Health Effects**. Somerset, USA: John Wiley & Sons, p.133-141, 2012.

Artigo 3: Análise do potencial genotóxico, mutagênico e indutor de estresse oxidativo do extrato de *Lycium barbarum*, sobre as células de adenocarcinoma de mama humano

Letícia Cristina Gonçalves¹, Maria Tereza Pamplona Silva¹, Franco Dani Campos Pereira¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Resumo

O *Lycium barbarum*, uma planta cultivada no Oriente como um alimento funcional, obteve recentemente um aumento em seu consumo como medicamento fitoterápico, devido às propriedades benéficas de seu fruto e seus efeitos positivos sobre a saúde humana. No entanto, não existem, até o momento, estudos que avaliem o potencial genotóxico deste extrato em células de câncer de mama humano (MCF-7), nas concentrações recomendadas para uso diário (0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L). O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* dos extratos de *L. barbarum*, pelo teste do MTT (citotoxicidade); do cometa (genotoxicidade); do micronúcleo com bloqueio de citocinese (mutagenicidade) e por meio de ensaios para avaliação de alterações dos níveis de estresse oxidativo (quantificação da GSH, da atividade das enzimas SOD e GST e do nível de peroxidação lipídica). Todos os ensaios foram realizados para o tempo de exposição de 24 horas. Os resultados mostraram ausência tanto de citotoxicidade como de potencial indutor de estresse oxidativo do *L. barbarum* para a linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7). Quanto ao potencial genotóxico, avaliado pelo ensaio do cometa, todas as concentrações testadas apresentaram diferença significativa, quando comparadas com o grupo controle negativo. Pelo teste do MN, foi observado uma diminuição significativa de brotos nucleares, pontes e MNs em todas as concentrações testadas. Diante desses resultados, podemos inferir que a genotoxicidade observada no ensaio do cometa pode ter sido promovida pela atividade aumentada dos mecanismos de reparo de danos no material genético. Pela diminuição registrada dos efeitos mutagênicos (MN), podemos sugerir que o extrato de *L. barbarum* apresenta um possível potencial antimutagênico, possivelmente relacionado ao seu conteúdo de quinonas, o que pode ser aproveitado para o desenvolvimento de novas drogas a serem usadas como protetoras do DNA. Entretanto, são necessários mais estudos que possam comprovar os mecanismos de ação do goji berry sobre a molécula de DNA.

Palavras-chaves: MCF-7; goji berry; anticancerígeno; ensaio do cometa; teste do micronúcleo; estresse oxidativo.

1. Introdução

A fitoterapia é uma ciência médica milenar que utiliza vegetais para tratamento e prevenção de doenças, sendo usada como uma terapia alternativa ou até complementar às convencionalmente usadas na medicina tradicional (ALEXANDRE; 2004; SENS, 2005; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; ROCHA BRITO et al., 2014). Esta ciência se baseia na cultura popular, por isso constituída de um conjunto de saberes internalizados e difundido, há gerações, por usuários de diversos países (KLEIN et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2012).

O aumento na procura por fitoterápicos está relacionada com uma busca constante de hábitos saudáveis, em decorrência da valorização mundial do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas (BRUNING, MISEGUI, VIANNA, 2012). Porém, como o consumo de fitoterápicos não exige prescrição médica obrigatória, eles vêm sendo usados indiscriminadamente, devido a prática de automedicação. Essa prática está baseada na atribuição de uma “naturalidade inócua” aos produtos naturais, o que pode colocar em risco a saúde do consumidor (BALBINO & DIAS, 2010; MAZZARI, PRIETTO, 2014).

Diante disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolveu uma normativa, “Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004”, para um controle geral do uso de fitoterápicos. Está resolução exige, por exemplo, a identificação, o padrão de qualidade, provas de eficácia e padronizações das informações dos fitoterápicos (BRASIL, 2004). No entanto, apesar desse controle, a utilização destes medicamentos feitos a base de plantas ainda suscita dúvidas, quanto aos seus efeitos tóxicos.

Recentemente, está sendo observado um aumento significativo no consumo de frutos da espécie *Lycium barbarum*, conhecido popularmente como goji berry, como medicamento fitoterápico, devido às suas propriedades benéficas e aos efeitos positivos que conferem à saúde humana, como aumento da fertilidade masculina (LUO et al. 2006), redução da fadiga e aumento da resistência (LUO, 2002), neuroproteção (AMAGASE & FARNSWOTH, 2011), potencial dermoprotetor (ZHAO et al, 2005) e melhoras na retinopatia diabética (CAVAZIM & FREITAS, 2014), além das suas propriedades antioxidantes reconhecidas (MING et al., 2009; DONNO et al., 2014)

Esta planta, originária da China, Tibet e outras partes da Ásia, é um arbusto decíduo e frutífero, que pertence à família *Solanaceae* (ZHONG; SHAHIDI; NACZK, 2012). Ela vem sendo cultivada, há mais de 2500 anos (RIBEIRO, MAIA, FRANCO, 2016), como um dos alimentos funcionais mais populares no Oriente, principalmente na China (DONG et al., 2012). Os seus frutos são constantemente utilizados para elaboração de formulações, preparos de chás

e até mesmo para o consumo, *in natura*, como suplemento alimentar (ADAMS et al., 2006; POTTERAT, 2010; ANVISA, 2015).

Alguns estudos realizados com o goji berry trazem informações sobre os possíveis efeitos secundários, relacionados ao potencial alergênico do fruto desta planta, que foram desenvolvidos por alguns pacientes. Dentre as reações observadas após o consumo das bagas de goji berry, estão os sintomas alérgicos simples, como urticária, edema, rinite aguda e dispneia, até reações complexas, como choques anafiláticos, (BALLARIN et al., 2011; CARNÉS et al., 2013; MARTINS et al., 2014). Outras informações sobre *L. barbarum* mostram que esta planta apresenta uma interação farmacocinética grave, potencializando a ação do anticoagulante Varfarina. Assim, esse fitoterápico tem um efeito semelhante a drogas antiplaquetárias, podendo ocasionar um aumento do tempo de sangramento, epistaxe, equimoses, hematomas e sangramento anal. Isto ocorre porque o goji berry inibe a P4 2C9, enzima metabolizadora primária da Varfarina®, resultando, conseqüentemente, na diminuição da biotransformação do medicamento e no prolongamento do tempo da protrombina (LEUNG et al., 2008; RIVERA et al., 2012).

Assim, há uma necessidade eminente de estudos sobre os efeitos adversos e toxicológicos do *L. barbarum*, uma vez que a utilização inadequada desse produto, pode ocasionar distúrbios graves, devido á pré-existência de fatores de risco como o uso concomitante com outros medicamentos (MAIA et al, 2011; CARNEIRO & COMARELLA, 2016).

Dentre os diversos testes indicados para avaliar a toxicidade de biomateriais, os realizados com células mantidas em cultura apresentam vantagens e eficácia, por serem modelos biológicos padronizados; serem desenvolvidos sob condições controladas de cultivo, que garantem a avaliação apenas da ação do agente investigados; e por não terem interferentes externos à célula, como alterações de temperatura, pH e estresse do organismo. Também são recomendados como método *in vitro* suficientemente informativos, particularmente para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, assim como para análise de alvos farmacológicos (MIGITA, 2012). Além disso, estudos com culturas celulares são considerados mais rápidos, sensíveis e facilmente reprodutíveis (ROGERO et al., 2003).

Frente ao exposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico do *L. barbarum*, assim como sua capacidade de induzir danos oxidativos em células de adernocarcinoma de mama humano (MCF-7). Para essas análises foram desenvolvidos os ensaios do MTT, do cometa, do micronúcleo com bloqueio de citocinese, além de quantificações das atividades das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e

Glutathione S-transferase (GST) e dos níveis da Glutathione reduzida (GSH) e da peroxidação lipídica (TBARS).

2. Metodologia

2.1. Fitoterápico testado

O extrato de *Lycium barbarum*, distribuído pela Galena Farmacêutica®, foi adquirido em uma farmácia de Rio Claro- SP. Para a realização dos ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade e de estresse oxidativo com a linhagem celular MCF-7, foram preparadas diferentes concentrações de *L. barbarum*, baseadas nas informações toxicológicas contidas na ficha de segurança do produto, fornecida pela Galena Farmacêutica®. Todas as concentrações foram diluídas em meio de cultura DMEM e preparadas no momento em que os bioensaios foram realizados.

2.2. Metil Metanosulfonato (MMS)

A solução aquosa de Metil metanosulfonato-MMS (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), uma substância reconhecidamente eficaz na indução de aberrações cromossômicas e micronúcleos (RANK; NIELSEN, 1997), foi utilizada, neste trabalho, na concentração de 4×10^{-4} M diluído em PBS, como controle positivo.

2.3. Bioensaios realizados com a linhagem celular MCF-7

As células de câncer de mama humano MCF-7 (ATCC® HTB-22™) foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, mantidas congeladas em LN₂ no Laboratório de Mutagênese Ambiental (Departamento de Biologia da Unesp de Rio Claro). No momento da utilização nos bioensaios, elas foram cultivadas em meio DMEM (Meio Dulbecco MEM), suplementado com 10 % de soro bovino fetal, em frascos de cultivo celular (25 cm²), com ventilação, sendo mantidas em temperatura controlada (37 °C), em estufa de CO₂ (5 %) e umidade controlada (80 %).

2.3.1. Teste do MTT

A citotoxicidade dos extratos de *L. barbarum*, determinada neste estudo pelo teste do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide- CAS n. 298-93-1, Sigma), foi realizado em placas de ELISA de 96 poços, de acordo com o protocolo estabelecido por Mosmann (1983), com algumas modificações. Foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células por poço, em um volume total de 100 µL de meio com soro, exceto nos poços referentes ao branco, onde foi adicionado apenas

o meio de cultura. As placas foram incubadas, por um período de 24 horas, em estufa de CO₂ (5 %) a 37 °C.

Após esse período de incubação, o meio foi retirado dos poços, sendo então adicionados nestes poços 200 mL dos diferentes tratamentos (0,5 g/L; 0,1 g/L; 0,15 g/L; 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L), previamente preparados com meio de cultura sem soro, sendo cada tratamento disposto em uma fileira da placa. Nos poços destinados ao controle negativo (CN), foram adicionados meio de cultura sem soro e nos poços destinados ao controle positivo (CP), solução de Triton X-100 (1 %).

Decorrido o tempo de 24 horas, foram retirados os tratamentos dos poços e adicionado 150 µL de MTT, diluído em PBS, na concentração de 1 x 10⁻⁶ mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas, em estufa a 37 °C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados, em cada poço, 100 µL de dimetil sulfoxido (DMSO). As placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Multiskan FC – Thermo Scientific®), filtro de 540 nm.

2.3.2. Tratamento para o ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade

As células MCF-7 foram submetidas às concentrações de *L. barbarum*, que apresentaram viabilidade celular superior a 80 % (0,2 g/L; 0,4 g/L e 0,6 g/L), conforme determinado previamente pelo teste de Teste do MTT. O controle negativo foi realizado com a adição de 50 µL de PBS no meio de cultura e o controle positivo de 50 µL da solução de MMS (4x10⁻⁴ M). Os tratamentos foram realizados, em triplicata, por um período de 24 horas.

2.3.3. Ensaio do cometa e viabilidade celular

O ensaio do cometa, realizado para avaliar o potencial genotóxico dos extratos de *L. barbarum*, foi feito de acordo com o protocolo estabelecido por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com algumas modificações. Foram semeadas 5 x 10⁵ células por frascos de cultura de 25 cm². Os frascos foram incubados por 24 horas a 37 °C e mantidos em estufa de CO₂ (5 %), em atmosfera úmida, para estabilização das células. Na sequência, as células foram expostas, por mais 24 horas aos tratamentos e, em seguida, coletadas. As suspensões celulares obtidas foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com o azul de tripan. Para esta avaliação, foram misturados, em criotubos, 20 µL da suspensão celular com 20 µL de Azul de Trypan, de acordo com a metodologia descrita por Salvadori et al. (2003). Foram quantificadas 100 células por tratamento, a fim de obter o percentual das células vivas (brancas) e células mortas (azuis).

Após a contagem da viabilidade celular, 20 µL de cada suspensão celular foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C. Estas misturas foram dispostas em lâminas previamente revestidas com agarose normal e recobertas com lamínula. Para a remoção das lamínulas, as lâminas foram solidificadas a 4 °C por, aproximadamente, 15 minutos. Em seguida, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas expostas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), no escuro, a 4 °C, pelo período mínimo de 1 hora.

Decorrido o período de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. Em seguida, as lâminas foram submetidas a eletroforese a 39 V, 300 mA (~0.8 V / cm), durante 20 minutos. Logo após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba para serem neutralizadas em tampão Tris (0,4 M cloridrato de Trizma, pH 7,5), fixadas em etanol absoluto, durante 10 minutos, e armazenadas a 4 °C, até o momento da análise.

As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$, barreira: $\lambda = 520 \text{ nm}$) por meio da adição de 50 µL de GelRed[®] (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada). Foram analisados ao acaso, em objetiva de 40x, 100 nucleóides por frasco (duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 300 nucleóides/tratamento. Os danos no DNA foram estimados pela intensidade da cauda do cometa, medida no software Comet Assay IV. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e a análise de significância realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA ($p < 0,05$), para comparar os danos entre as células tratadas com extratos de *L. barbarum* e o controle negativo.

2.3.4. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

A avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos dos extratos de *L. barbarum* foi realizada por meio do ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC), de acordo com o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. Para o ensaio, foram semeadas 5×10^5 células em frascos de cultura de 25 cm², mantidos por 24 horas em atmosfera úmida, em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, período este necessário para a estabilização celular. Em seguida, as células foram submetidas aos tratamentos, por mais 24 horas e lavadas com PBS. O meio foi trocado por meio novo, acrescido de 3 µg/mL de citocalasina B, onde permaneceram por 28 horas, para a obtenção de células binucleadas. Após

esse período, as células foram coletadas, tratadas com solução hipertônica de citrato de sódio (1 %), fixadas com formol (40 %) e Carnoy (3 etanol :1 ácido acético). Para o preparo das lâminas, as células foram centrifugadas, a suspensão celular ressuspensa em 0,5 mL de Carnoy e gotejada sobre lâminas recobertas com um filme de água, a 4 °C. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com Giemsa 5 %, por 8 minutos.

As análises foram realizadas em microscópio de luz (objetiva de 100x), contabilizando 2.000 células binucleadas por frasco (duas lâminas com 1.000 células binucleadas cada), totalizando 6.000 células por tratamento. Dentre esse total de células binucleadas analisadas, foi contabilizado, separadamente, as células binucleadas normais e as portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares.

Os critérios utilizados para as análises foram descritos por Fenech et al. (2003), onde são selecionadas células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração.

2.3.5. Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)

Outra avaliação realizada com a cultura celular MCF-7, submetidas aos diferentes tratamentos com *L. barbarum* e expostas à CitoB, foi a do Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC). Este índice, onde são contabilizadas 500 células por frascos (totalizando 1500 células/tratamento), indica o número médio de ciclo celulares que as células passaram, durante o período de exposição à CitoB. O IPBC é, de acordo com a OECD 487 (2012), utilizado para calcular a proliferação celular, cuja fórmula está apresentada a seguir:

$$IPBC = \frac{(M1) + (2x M2) + (3x M3)}{N}$$

Onde: M1 = células com 1 núcleo;
M2= células com 2 núcleos;
M3 = células com multinucleadas;
N = número de células analisadas (OECD 487, 2012).

Os resultados obtidos neste ensaio foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e a análise de significância foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (p<0,05), pos hoc Dunnet, comparando os resultados observados nas células tratadas com extratos de *L. barbarum* com os do controle negativo.

2.3.6. Avaliação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado pela mensuração das atividades das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Glutathione-S-transferase (GST), além dos níveis de Glutathione reduzida (GSH) e do nível de peroxidação lipídica (TBARS). Para esta análise, foram semeadas em 12 frascos de cultura de 25 cm², 1x10⁶ células, sendo 3 destes destinados aos testes CN e 9 frascos às diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum* (0,2 g/L; 0,4 g/L e 0,6g/L). Após o tempo de estabilização de 24 horas, as células MCF-7 foram lavadas com PBS gelado, retiradas dos frascos com o auxílio de “scraper”, transferidas para criotubos de 1,5 mL e armazenadas em nitrogênio líquido, para posteriores análises. Essa suspensão celular, mantida no gelo, foi sonicada, por duas vezes, em PBS a uma frequência de 5 kHz durante, aproximadamente, 10 segundos, por duas vezes, no aparelho QSonica Sonicators (modelo Q55). As análises foram realizadas, em triplicata, em placas de 96 poços. Todos os ensaios foram quantificados em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan.

2.3.6.1. Avaliação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de autooxidação do pirogalol, conforme descrito por Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. O ensaio foi realizado com 20 µl da suspensão celular sonicada, 200 µl de tampão TRIS- HCl (25 mM) com EDTA (1 mM), pH 8,5 e 20 µl de pirogalol (15 mM), incubados a 25 °C, durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 200 µl de HCl 1N e mensurada em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan a 440 nm. A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto.

2.3.6.2. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS)

A determinação da quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi feita segundo Buege e Aust (1978), com algumas adaptações. Foram utilizados 800 µl da suspensão celular sonicada, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67 %), 10 µl de NaOH (10 M) e 500 µl de H₃PO₄ (20 %). Essa mistura foi fervida em banho-maria por 15 minutos e resfriada em gelo. Na sequência, foi adicionado 1,5 mL de n-butanol e a solução foi vigorosamente agitada, para extração do cromógeno. A fase orgânica foi separada por centrifugação e a absorvância foi lida em espectrofotômetro Infinite[®] M200 Pró – Tecan a 535 nm. A concentração de TBARS foi calculada usando $\lambda_{535} = 149.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na equação:

$$[\text{TBARS (mmol/Lx } 10^{-9})] = \frac{\text{Abs}}{\lambda} \times 1000000000$$

2.3.6.3. Avaliação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974), com algumas modificações. A mistura analisada foi constituída de 200 µL de tampão fosfato a (0,1 M, pH 7.4); 30 µL de GSH (0,1 mM); 20 µL de CDNB (0,1 mM) (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno); e 20 µL da suspensão celular sonicada. O aumento na absorbância foi monitorado minuto a minuto, por um período de 5 minutos, em espectrofotômetro Infinite® M200 Pró – Tecan a 340 nm. O resultado foi expresso em absorbância/ minuto.

2.3.6.4. Avaliação da atividade da glutathiona (GSH)

Os níveis de GSH foram quantificados por meio dos procedimentos descritos por Ellman (1959), com algumas adaptações. Foram adicionados 200 µL da suspensão celular sonicada em um mesmo volume de ácido tricloroacético 20 % (TCA), contendo 1 mM de EDTA. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente, para precipitação das proteínas e, em seguida, foi centrifugada por 5 minutos a 4.500 rpm. Foram retiradas amostras de 100 µL do sobrenadante, que foram adicionadas a 100 µL de tampão TRIS- HCl (25 mM) com EDTA (1 mM), pH 8,2 e 20 µL DTNB (10 mM) (5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)). A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro Infinite® M200 Pró – Tecan a 412 nm, imediatamente após 15 minutos de exposição ao DTNB. A concentração de GSH foi calculada pela equação:

$$[\text{GSH (mmol/L)}] = (\text{Abs}_{\text{final}} - \text{Abs}_{\text{inicial}}) \times 1,57 \text{ (mM)} \text{ (ALLAMEH et al., 1997)}.$$

2.3.6.5. Análise estatística do estresse oxidativo

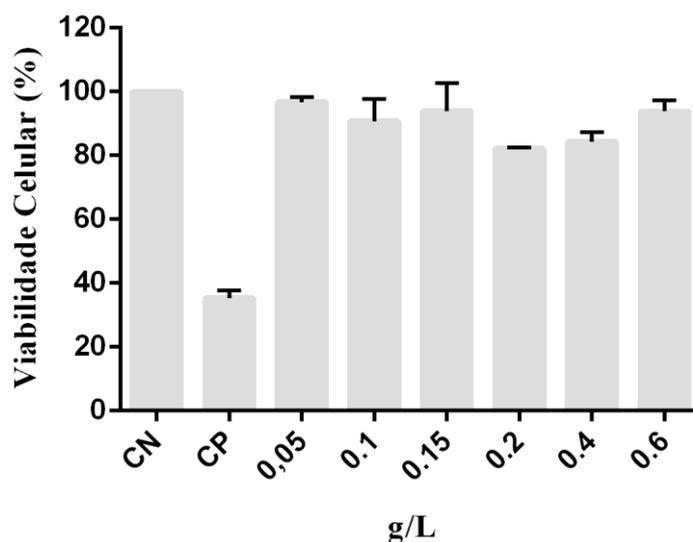
Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-wilk e, de acordo com a distribuição dos dados (normal ou não). Foi então realizado o teste estatístico adequado, paramétrico (ANOVA/Dunnet) ou não paramétrico (Kruskal-wallis/ Dunn)

3. Resultados

3.1. Teste do MTT

Os resultados referentes ao efeito citotóxico, avaliados pelo teste do MTT em células de mamífero (MCF-7), mostraram que as concentrações expostas por 24 horas de ao extrato de *L. barbarum* (05 g/L; 0,1 g/L; 0,15 g/L; 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L), não foram citotóxicas, pois as células expostas a elas apresentaram uma viabilidade celular superior a 80 % (Figura 1).

Figura 1: Viabilidade celular, avaliada pelos testes de MTT em células MCF-7 expostas a diferentes concentrações do extrato de *Lycium barbarum*.



CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo.

3.2. Ensaio do cometa

Os níveis de danos primários no DNA de células MCF-7, expostas às diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*, foram avaliados pelo ensaio do cometa. Foi observado um aumento significativo do parâmetro intensidade da cauda do cometa, para todas as concentrações testadas, sugerindo um efeito genotóxico para o extrato deste fitoterápico (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados do ensaio do cometa, realizado com a linhagem celular MCF-7, após exposição das células a diferentes concentrações do extrato de *Lycium barbarum*

	CN	CP	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L
Intensidade da cauda	3,10 ± 0,57	51,13 ± 2,53*	34,03 ± 3,53*	31,3 ± 3,5*	10,8 ± 1,3*
Viabilidade Celular	99%	90%	93%	96%	95%

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; MN: Micronúcleo; *p<0,05 estatisticamente significativo

3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Os efeitos mutagênicos das diferentes concentrações (0,2; 0,4 e 0,6 g/L) do extrato de *L.barbarum* foram avaliados pelas frequências de MN, brotos nucleares e pontes

nucleoplasmáticas, presentes em células binucleadas da linhagem MCF-7. Os resultados demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa dos parâmetros analisados, para todas as concentrações testadas do *L. barbarum* (Tabela 2), sugerindo um possível efeito protetor deste extrato para as células testadas.

Tabela 2: Frequências de anormalidade nucleares e de micronúcleos (MN) observadas em células MCF-7, expostas a diferentes concentrações do extrato de *L. barbarum*

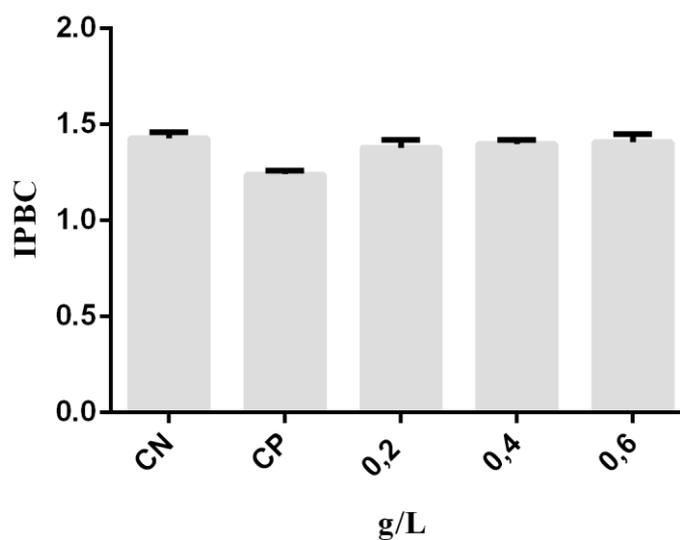
Tratamento	Broto	Ponte	MN
CN	1,1 ± 0,23	0,2 ± 0,05	1,0 ± 0,18
CP	4,1 ± 0,12*	0,9 ± 0,10*	2,4 ± 0,47*
0,2 g/L	0,9 ± 0,12*	0,1 ± 0,08*	0,3 ± 0,10*
0,4 g/L	0,6 ± 0,08*	0,1 ± 0,04*	0,2 ± 0,05*
0,6 g/L	0,3 ± 0,08*	0,0 ± 0,08*	0,1 ± 0,06*

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; MN: Micronúcleo; *p<0,05 estatisticamente significativo

3.3.1. Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)

O IPBC, obtido nos ensaios que avaliaram o índice de proliferação celular, induzido pelo extrato de *L. barbarum* em as células MCF-7, não demonstraram nenhuma diferença significativa, quando comparados ao controle negativo (Figura 2).

Figura 2: Efeito proliferativo observados em células da cultura celular MCF-7, expostas a diferentes concentrações do extrato de *Lycium barbarum*

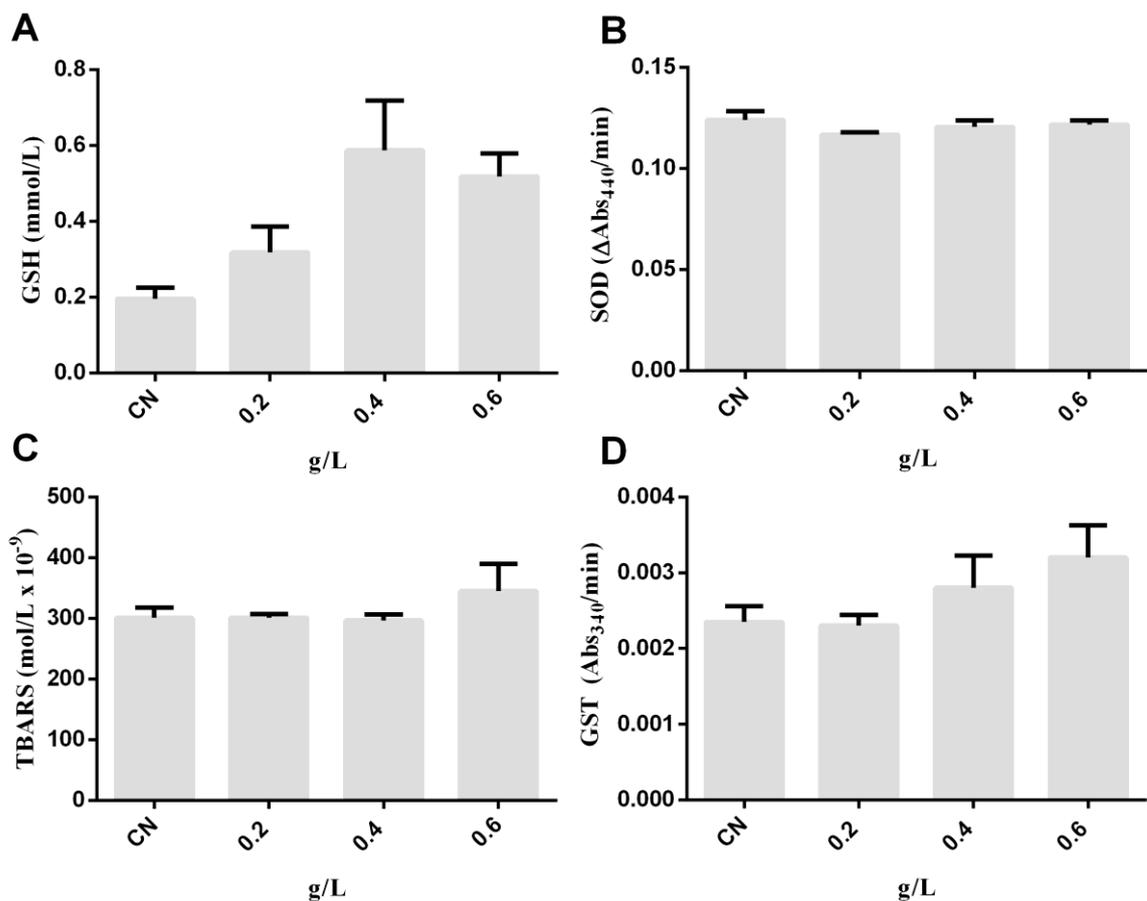


CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo.

3.4. Avaliação do estresse oxidativo

Para investigar a influência dos extratos de *L. barbarum* sobre o mecanismo de defesa antioxidante das células MCF-7, foram quantificadas as atividades das enzimas SOD e GST, assim como os níveis de GSH e TBARS. Os resultados sugerem ausência de indução do estresse oxidativo, pois não houve diferença significativa para nenhum dos tratamentos realizados com as concentrações testadas do fitoterápico, quando comparadas com os resultados do CN (Figura 3).

Figura 3: Efeitos sobre os níveis de Glutathiona Reduzida - GSH (A); Superóxido Dismutase - SOD (B); espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (C); Glutathiona S-transferase – GST (D), da cultura celular MCF-7 expostas, por 24 horas, a diferentes concentrações do extrato de *Lycium barbarum*.



4. Discussão

Na literatura, ainda não existem dados publicados sobre o potencial genotóxico e mutagênico do extrato de *L. barbarum* para a linhagem celular MCF-7, nas concentrações

indicadas para uso diário. Sendo assim, o presente estudo traz dados inéditos sobre o efeito destas concentrações sobre esta linhagem celular.

Os resultados do teste do MTT demonstraram ausência de citotoxicidade para todas as concentrações testadas do goji berry. A escolha das concentrações 0,2 g/L; 0,4 g/L e 0,6 g/L, testadas sob as células MCF-7, por 24 horas (UHL HELMA; KNASMÜLLER, 1999), para avaliar o potencial genotóxico, mutagênico e indutor de estresse oxidativo do *L. barbarum*, foi baseada nas dosagens recomendadas para o uso diário deste fitoterápico.

Neste estudo, foi avaliado o potencial genotóxico do *L. barbarum* pelo ensaio do cometa, o qual exige, para maior confiabilidade dos resultados, testes prévios para estimar as concentrações que mantêm uma viabilidade celular maior que 80 % (ANDERSON; PLEWA, 1998; TICE et al., 2000). Assim, foram realizados ensaios prévios de viabilidade com azul de Trypan, que mostraram que todas as concentrações testadas apresentaram viabilidade celular superior a 90 %, o que possibilitou a realização do ensaio do cometa.

O ensaio do cometa é uma técnica fácil e sensível para detectar quebras de fita simples de DNA e sítios alcalilábeis em células individuais (COLLINS et al., 2008). Por isso, esta técnica é amplamente utilizada para avaliar, *in vitro*, a genotoxicidade de vários químicos, com diversos tipos celulares, normais ou transformadas, incluindo células humanas ou animais (DAUER et al., 2003).

Neste estudo, foi utilizado o parâmetro intensidade da cauda para avaliar os níveis de danos genotóxicos em células MCF-7, após exposição das mesmas nas concentrações de 0,2 g/L; 0,4 g/L e 0,6 g/L de *L. barbarum*. Este parâmetro é, segundo Olive (1999) e Collins (2008), indicado para avaliação dos efeitos genotóxicos de xenobióticos, por ser sensível na detecção de quebras de fita simples e de fita dupla do DNA. Os resultados de genotoxicidade dos tratamentos realizados com o goji berry foram estatisticamente diferentes em relação aos do CN, sendo todas as concentrações testadas genotóxicas para as células MCF-7. Este potencial indutor de quebras do DNA indica que o goji berry possui princípios ativos capazes de interagir com o material genético desta linhagem celular.

De uma forma geral, os mecanismos antitumorais registrados para quinonas (ASCHE, 2005; OL'GA et al., 2011; FELIPE, 2014) podem estar relacionados com a interferência dessas substâncias no ciclo celular, na inibição da topoisomerase e na geração de espécies reativas de oxigênio. Estes danos podem ser detectados pelo ensaio do cometa, pois, segundo Tice et al. (1990), este teste é indicado para verificar danos induzidos no DNA por intercalantes (como as quinonas). Sendo assim, o ensaio do cometa foi aplicado para detectar lesões genômicas que

poderiam estar envolvidas com mutações genéticas (TICE et al. 2000), caso não fossem reparadas.

Nossos resultados de genotoxicidade do extrato de *L. barbarum* em células MCF-7 são corroborados pelas citações de He et al. (2012), que registraram, para a mesma linhagem celular, efeito antitumorígeno, derivado de quebras no DNA, que os autores atribuíram a efeitos de polissacarídeos ácidos presentes no wolfberry, um outro nome popular do goji berry. Wawruszak et al. (2015), verificaram, em testes *in vitro*, realizados com células de câncer de mama T47D, que o goji berry apresentou um potente efeito anticancerígeno, dado pela inibição da proliferação celular.

Sendo assim, podemos sugerir que os danos causados ao DNA, observados pelo ensaio do cometa, em células de câncer de mama humano (MCF-7), possam ser devido à ação antitumorogênica/anticancerígena das quinonas presentes no extrato de *L. barbarum*, pois as quinonas, frequentemente, apresentam efeitos antitumoral (ASCHE, 2005; OL'GA et al., 2011; FELIPE, 2014), citogenotóxicos (COSTA, 2012).

Vários componentes bioativos foram identificados em extratos de *L. barbarum*, como por exemplo carotenoides, polissacarídeos, ácidos fenólicos (flavonoides, quinonas e cumarinas), aminoácidos (betaína), β -sitosterol, oligoelementos, vitaminas, quinonas e outros componentes (AMAGASE & FARNSWORTH, 2011).

As quinonas são compostos orgânicos considerados produtos da oxidação de fenóis, pertencentes ao grupo de substâncias orgânicas semivoláteis, onipresentes na natureza. Elas possuem como principal característica estrutural, a presença de duas unidades carbonílicas (C=O) conjugadas com, pelo menos, duas ligações duplas, gerando assim, um sistema cíclico de seis membros, conhecido como unidade quinoide (EVANGELISTA et al., 2012; SIMÕES et al., 2016).

Estes compostos, classificados de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura (SELVA, 2010; FERREIRA, 2013), possuem vital importância para os organismos, incluindo nesses os seres humanos. As principais fontes biogênicas das quinonas são as folhas, galhos, raízes e frutos de vegetais superiores (MONKS et al., 1992; FERREIRA et al., 2010; SOUSA 2012).

Diversas atividades biológicas são relacionadas às quinonas, como a ação anti-inflamatória (ALMEIDA et al., 1990; LAUBE et al., 2009; SANTOS, 2012); antifúngica (TANDON et al., 2010; ÍBIS et al., 2011) e antitumoral (ASCHE, 2005; OL'GA et al., 2011; FELIPE, 2014). Esta última, entretanto, desperta interesse tanto farmacológico quanto toxicológico, uma vez que vários fármacos clinicamente importantes na terapia do câncer

contêm o núcleo quinona (como as antraciclina, mitoxantrona e saintopina), apresentando excelente atividade anticâncer (FOYE, 1995; MONKS; JONES, 2002; ARAÚJO 2009; LU et al., 2013). Contudo, o mecanismo de ação antitumoral das quinonas ainda não está totalmente esclarecido, pois há vários modos de ação pelos quais elas exercem sua atividade, sendo desconhecido o mecanismo mais relevante para a indução de danos celulares (ASCHE, 2005; MARINHO FILHO, 2012; FARIAS, 2014). O seu principal alvo da ação citotóxica é o DNA, no qual algumas quinonas atuam como agentes intercalantes ou como inibidores de enzimas essenciais para a duplicação da molécula e biossíntese de nucleotídeos. Também podem formar conjugados intermediários, os quais são poderosos agentes alquilantes (COSTA, 2012).

Como o ensaio do cometa não detecta lesões específicas no DNA, realizamos uma investigação adicional, por meio do teste de MN com bloqueio de citocinese, uma vez que este teste é capaz de revelar a ação de agentes clastogênicos (promotores de quebras cromossomos) e aneugênicos (indutores de aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MAC GREGOR et al., 1987). Além disso, o teste de MN com bloqueio de citocinese permite a avaliação de diversos parâmetros decorrentes de quebras e rearranjos cromossômicos, que persistem, pelo menos, por um ciclo mitótico (SCOLASTICI et al., 2008).

A avaliação da presença de MNs é considerado o principal parâmetro de avaliação do teste de mutagenicidade. Essas estruturas são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos acêntricos (ação clastogênica) ou de cromossomos inteiros (ação aneugênica), que se perderam durante o processo de divisão celular (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Outras estruturas observadas no teste do MN foram as pontes e os brotos nucleares. As análises realizadas no presente estudo revelaram uma diminuição significativa da presença dessas estruturas celulares, para todas as concentrações testadas do extrato de *L. barbarum*. Segundo Kammann et al. (2001), as lesões detectadas no cometa podem ser consideradas pré-mutagênicas, pois estas são passíveis de reparo. Desta forma, podemos inferir que os danos genotóxicos observados no ensaio do cometa foram reparados.

Há quatro hipóteses conjuntas sugeridas para a diminuição dos brotos e pontes observadas neste estudo. A primeira, consiste no aumento os níveis de GSH, detectados nos ensaios do estresse oxidativo. Mesmo esse aumento não se mostrando estatisticamente significativo, ele parece estar diretamente envolvido com o processo de detoxificação de xenobióticos. A GSH é um tripeptídeo sintetizado pelo organismo, a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, que exerce um importante papel na proteção celular (YOU; PARK, 2010; CRUZ, 2016). A GSH liga-se covalentemente, pela ação enzimática da glutathione S-transferase (GST)

a diferentes tipos de drogas, resultando num complexo GSH-conjugado. Este complexo é eliminado para o meio extracelular, pela ATPase S-conjugado de GSH ou bomba GS-X, a qual está localizada na membrana plasmática (ROCHA, 2015). Assim, o aumento nos níveis de GSH poderiam representar uma resposta adaptativa aos danos genotóxicos produzidos pela ação anticancerígena das quinonas presentes no extrato de *L. barbarum*, no sentido de proteger os organismos contra danos genéticos. Nossa hipótese baseia-se no aumento da GSH para intensificação da destoxificação celular, visando a eliminação do xenobiótico para o ambiente extracelular, por meio do efluxo da droga, impedindo, conseqüentemente, sua ação completa nesta célula. Assim, sugerimos uma possível resistência celular ao composto testado, pois vários trabalhos identificaram a correlação entre altos níveis intracelulares de GSH e resistência a diversos quimioterápicos que possuem quinonas em sua formulação, como as antraciclinas (NAVARINI, 2007; DE CARVALHO & LOCATELLI, 2012; ROCHA, 2015).

A segunda hipótese baseia-se na característica de resistência ao estresse oxidativo da linhagem MCF-7 (CHAU et al., 1998; SALUSTIANO et al., 2010). Dessa forma, também podemos sugerir que esta resistência conferiu uma citoproteção para estas células, uma vez que, impediu a fixação de danos e a apoptose celular, características estas do mecanismo de ação de muitos agentes anticancerígenos, relacionados com a produção de espécies oxidativas (ROS).

A terceira hipótese envolve o sistema de reparo celular. Após a indução do dano no DNA, as células detectam a injúria genotóxica e reduzem a velocidade da progressão do ciclo celular, para permitir que o reparo possa ocorrer (BARTEK & LUKAS, 2007; ROSA, 2008). São desencadeados pontos de controle do ciclo celular que levam a inibição do ciclo celular e/ou da morte da célula (FARIAS, 2014). Entretanto, essa restrição do ciclo celular facilita a checagem bioquímica para o reparo do dano do DNA. (ELLEDGE, 1996; TANG et al., 2012). Assim, acreditamos que houve inibição do ciclo celular, o que permitiu a checagem mais eficiente das lesões e, conseqüentemente, ao reparo dos danos genotóxicos sofridos, efeitos esses também confirmados por alguns autores (MANSOUR et al., 1994; BRANDSTETTER, 2006; CAMPOREZ, ALMEIDA, MARÇAL, 2013).

Por fim, a quarta hipótese refere-se a mecanismos de resistência à quimioterápicos de células tumorais. Neste estudo, verificamos que houve um mecanismo de resistência das células MCF-7, que acreditamos ter sido dado pela ação antioxidante das mesmas. Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados (genotoxicidade, mutagenicidade e de estresse oxidativos), pudemos observar que os efeitos genotóxicos induzidos pelo *L. barbarum* não foram eficazes para a fixação desses danos (sem efeito mutagênico) nem para a indução de morte celular, sendo, inclusive, benéfico para a promoção de reparo dos danos.

Em resumo, o presente trabalho mostrou, pelo ensaio do cometa, que os extratos de *L. barbarum* induziram danos no DNA de células de câncer de mama humano (MCF-7), corroborando com outros estudos que sugerem uma ação anticancerígena (MAO et al., 2011) para esse extrato vegetal. Entretanto, essas células tumorais mostraram resistência à fixação dos danos genotóxicos promovidos por este fitoterápicos, que não decorreram em eventos mutagênicos e tampouco para a morte celular.

Frente aos resultados obtidos neste estudo, fica evidente a necessidade e a importância de mais pesquisas com esse fitoterápico, que possam estimar o potencial fitoterápicos dos compostos desta planta. Nossos resultados reforçam as citações de Wawruszak et al. (2015), de que o *L. barbarum* apresenta um possível potencial quimiopreventivo para o tratamento do câncer de mama.

5. Conclusão

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que as concentrações testadas de *L. barbarum*, induziram efeitos genotóxicos, provavelmente devido a ação das quinonas sobre a linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7). Porém, os danos genotóxicos não se fixaram sob a forma de mutações nessas células. A genotoxicidade observada para o goji berry, sobre cultura de células MCF-7, pode ser um indicativo de um possível efeito quimiopreventivo contra o câncer de mama, pois o extrato desta planta induziu quebras no DNA de células originárias de adenocarcinoma marmário humano. Contudo, como nossos resultados foram obtidos sob sistema *in vitro*, não podemos extrapolar, diretamente, os efeitos observados nesta análise, para a espécie humana.

O extrato de goji berry não induziu citotoxicidade e nem mutagenicidade em células da linhagem celular de mana MCF-7, resultado este que, se associados com outras investigações citogenotocológicas, realizadas por outros autores, pode inferir um possível efeito anticancerígeno para esse extrato.

Nossos resultados contribuem para uma maior compreensão sobre o mecanismo de ação do extrato de *L. barbarum* sobre as células humanas, mas também apontam para uma necessidade de realização de mais estudos sobre os efeitos dessa planta, para que esta possa ser mais explorada quanto ao seu possível potencial fitoterápico e quimiopreventivo.

6. Referências Bibliográficas

ADAMS, M.; WIEDENMANN, M.; TITTEL, G.; BAUER, R. HPLC-MS Trace Analysis of Atropine in *Lycium barbarum* Berries. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p.279-283, 2006.

ALEXANDRE, R.F. **Fitoterapia baseada em evidências: exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina**. [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.

ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mechanisms of ageing and development**, v. 95, n. 1-2, p. 71–79, 1997.

ALMEIDA, E. R., SILVA FILHO, A. A., DOS SANTOS, E. R., & Lopes, C. A. C. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 239-241, 1990.

AL-SABTI K.; METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

AMAGASE H. FARNSWORTH N.R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji). **Food Research International** 2011; 44(7):1702–17.

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67–73, 1998.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico n. 66/2015. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+66%2C+01+de+junho+de+2015/43dbb7ac-d9ea-45ac-ac4f-af615b103d9d>>. Acesso em 21/08/17.

ARAÚJO, A. J. **Estudo das propriedades citotóxica da nor-β-lapachona e seu derivado nitrofenilamino em células HL-60**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2009.

ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 5, p. 449-467, 2005.

BALBINO, E.E., DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2010;20:992-1000.
BALLARIN, S.M; MATAS, M.A.L; ABAD, D.S.; CINTO, N.P.; CARNÉS J. Anaphylaxis Associated With the Ingestion of Goji Berries (Lycium barbarum). **J Investig Allergol Clin Immunol**. 2011; 21(7):567-70.

BARTEK, J; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Curr Opin Cell Biol**, 2007. 238-245.

BRANDSTETTER, L.R.G. **Perfil de ativação das MAP quinases ERK 1/2 no intestino delgado de equinos submetidos à isquemia e reperfusão**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

BRASIL, 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004*. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. *Methods and Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAIRES JÚNIOR, L. C. **O efeito da radiação emitida por telefones móveis sobre a via das MAPK's, o hipotálamo, a hipófise e adrenal, memória e ansiedade em ratos Wistar, (Rattus norvegicus Berkenhout, 1769)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 2014.

CAMPOREZ, João Paulo Gabriel; ALMEIDA, Felipe N.; MARÇAL, Anderson C. Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 12, n. 2, 2013.

CARNEIRO, A. L. C.; COMARELLA, L. Principais interações entre plantas medicinais e medicamentos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 9, n. 5, p. 4-19, 2016

CARNÉS, J., LARRAMENDI, C. H., FERRER, A., HUERTAS, A. J., MATAS, M. A. L., PAGÁN, J. A., NAVARRO, L. A., ABUJETA, J. L. G., VICARIO, S., PEÑA, M. Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to Goji berries (*Lycium barbarum*). **Food Chemistry**, v.137, p.130-135, 2013.

CHAU Y, SHIAH S, DON M, KUO M Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radic Biol Med**, 1998.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.

COSTA, A. M. **Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogos do lapachol/** Arinice de Menezes Costa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

CRUZ, K. S. **Otimização numérica da produção de glutathione por saccharomyces cerevisiae utilizando subprodutos industriais.** 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016

DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMÜLLER, S.; MERSCHSUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of Hamamelis virginiana L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HepG2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, New York, v. 63, pp. 199-207, 2003.

FENECH, R., M.; SALVADORI, D.M.F. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. IN: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.). **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ed. ULBRA (2003) 201-223.

DE CARVALHO, D. R.; LOCATELLI, C. Avaliação da atividade antitumoral in vitro e antimetastática in vivo do tetradecil galato. **Ágora: revista de divulgação científica**, v. 16, n. 2esp., p. 424-434, 2012.

DONG, J. Z., GAO, W. S., LU, D. Y., & WANG, Y. Simultaneous extraction and analysis of four polyphenols from leaves of lycium barbarum l. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 914-931, 2011.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (Lycium spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, p. 6–20, jun. 2014.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science** 274:1664–1672, 1996.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

EVANGELISTA, L. C., FREITAS DE BRITO, M. F. F., COSTA DE SOUZA, N. C., DE JESUS PPINHEIRO, R. J., DE MOURA, I. R., & MARQUES DA SILVA, M. D. J. Prospecção fitoquímica do extrato aquoso e hexânico das folhas da lavandula officinalis. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação.** 2012.

FARIAS, M. S. **Dano ao DNA, citotoxicidade, efeito antiproliferativo e antitumoral de 1, 4-naftoquinonas substituídas.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.

FELIPE, K. B. **Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de Casearia sylvestris e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.

FERREIRA, M. P. S. B. C. **Atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas frente a fungos oportunistas e dermatófitos e ensaios preliminares de seus mecanismos de ação.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

FERREIRA, S. B., GONZAGA, D. T. G., SANTOS, W. C., ARAÚJO, K. G. L., FERREIRA, V. F. β - Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**. v.2,n 2, p. 140, 2010.

CAVAZIM, F., P.; FREITAS, G. As propriedades antioxidativas do goji berry no auxílio à melhora do centro de acuidade visual, com abordagem em tratamentos da retinopatia diabética. **UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, 2014

FOYE, M. O. *Cancer Chemotherapeutic Agents*. Washungton, D.C.: **American Chemical Society**, 1995.

GAFNER, S., WOLFENDER, J. L., NIANGA, M., STOECKLI-EVANS, H., & HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1315-1320, 1996.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HE, N., YANG, X., JIAO, Y., TIAN, L., & ZHAO, Y. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 978-989, 2012.

IBIS, C., TUYUN, A. F., OZSOY-GUNES, Z., BAHAR, H., STASEVYCH, M. V., MUSYANOVYCH, R. Y. & NOVIKOV, V. Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen-and sulfur-containing hetero-1, 4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5861-5867, 2011

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. (2001). A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research, Amsterdam**. v. 498, p. 61-77, 2001.

KLEIN T., LONGHINI R., BRUSCHI M.L., MELLO J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**. 2009, 30(3):241-248.

LAUBE, T., BERNET, A., DAHSE, H. M., JACOBSEN, I. D., & SEIFERT, K. Synthesis and pharmacological activities of some sesquiterpene quinones and hydroquinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 4, p. 1422-1427, 2000.

LEUNG H, HUNG A, HUI AC, CHAN TY. Warfarin overdose due to the possible effects of *Lycium barbarum* L. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:1860-2.

LIU, C., KEVIN, K., LI, J., SAKYA, S. Synthetic approaches to the 2003 new drugs. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 10, p. 1105-1125, 2004.

LU, J. J., BAO, J. L., WU, G. S., XU, W. S., HUANG, M. Q., CHEN, X. P., & WANG, Y. T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 13, n. 3, p. 456-463, 2013.

LUO Q, LIA Z, HUANGA X, YANA J, ZHANGB S, CAIA YZ. *Lycium barbarum* polysaccharides: Protective effects against heat-induced damage of rat testes and H₂O₂-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats. **Life Sciences** July 2006;79(7):613–21

LUO, Q., LI, Z., YAN, J., ZHU, F., XU, R. J., CAI, Y. Z. *Lycium barbarum* Polysaccharides Induce Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells and Inhibits Prostate Cancer Growth in a Xenograft Mouse Model of Human Prostate Cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 695–703, 2009.

LUO, Q.; YAN, J.; ZHANG, S. Isolation and purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and its antifatigue effect. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 31, p. 118-119, 2002.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat Res.**, v. 189, p. 103-112, 1987.

MAIA, L. F. et al. Plantas medicinais e hipertensão. **Farmácia Revista**. P 24-25, Fev-Mar, 2011.

MANSOUR, S. J.; MATTEN, W. T.; HERMANN, A. S.; CANDIA, J. M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE WOUDE, G. F.; AHN, N. G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science, Stanford**, v. 265, n. 5174, p. 966-970, 1994.

MARINHO FILHO, José Delano Barreto. **Participação das vias atm/atr e c-myc/gsh nos efeitos antitumorais da cordiaquinona J induzidos pelo estresse oxidativo**. 2012. Tese de Doutorado.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTINS, G., SUSSAI, G., BATISTA EVANGELISTA COIMBRA, C. C., & RUIZ SCHLICHTING, C. L. Toxicidade do goji berry (*Lycium barbarum*). **UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, 2014.

MAZZARI, A. L. D. A.; PRIETO, J. M. Monitoramento de interações farmacocinéticas entre plantas medicinais e fitoterápicos e os medicamentos convencionais pelo sistema de farmacovigilância brasileiro. **Infarma**, v. 26, p. 193-198, 2014.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

MING M, GUANHUA L, ZANHAI Y, GUANG C, XUAN Z. Effect of the *Lyciumbarbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. **Food chemistry journal Elsevier**. 15 April 2009;113(4):872-77.

MONKS, T. J., HANZLIK, R. P., COHEN, G. M., ROSS, D. GRAHAM, D. G. Contemporary Issues in Toxicology. **Quinone Chemistry and Toxicity**. Toxicology and Applied Pharmacology. v. 112, p. 2, 1992.

MONKS, T. J.; JONES, D.C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimes, quinone metgides, and quinone-thioethers. **Curr. Drug Metabol.**, v.3, p. 425-438, 2002.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**. 65, 55-63, 1983.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NATARAJAN, A.T., DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, 6, 399-403, 1991.

NAVARINI, A. L. F. **Avaliação do efeito de Chalconas sintéticas sobre a linhagem celular B16F10 de melanoma**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Farmácia, 2007.

OL'GA, D. Z., OVCHINNIKOVA, L. P., GORYUNOV, L. I., TROSHKOVA, N. M., SHTEINGARTS, V. D., & NEVINSKY, G. A. Cytotoxicity of new polyfluorinated 1, 4-naphthoquinones with diverse substituents in the quinone moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 1, p. 256-260, 2011.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANFITH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Exptl. Cell Res.**, v. 198, p. 259-260, 1999.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity. **Planta Medica**, v.76, p. 7–19, 2010.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutat. Res.**, v. 390, p. 121–127, 1997.

RIBEIRO BRUNING, M. C.; BITTENCOURT GONZALEZ MOSEGUI, G.; MANSO DE MELO VIANNA, Cid. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, 2012.

RIBEIRO, G. F.; MAIA, F. B.; FRANCO, J. Prospecção Fitoquímica, Doseamento de Compostos Fenólicos Totais e Ácido Ascórbico e Avaliação de Atividade Antioxidante de Extrato Seco de Goji Berry. **XXIV SEMIC, Seminário de Iniciação Científica PUCR, 2016**. Disponível em < https://cip.pucpr.br/eventos/semi_c/16/resumo_template.php?id=0009703>. Acesso em 21/08/17.

RIVERA C.A., FERRO C.L., BURSUA A.J., GERBER B.S. Interaction Between *Lycium barbarum* (Goji) and Warfarin: A Case Report. **Pharmacy Practice**. 2012; 32(3):50-3.

ROCHA BRITO, A. G., DE FREITAS, C. L., DA COSTA GALVÃO, R., NUNES, J. T., DA SILVA, J. L., DA SILVA EMILIANO, M. D., & SANTOS, R. S. Fitoterapia: uma alternativa terapêutica para o cuidado em Enfermagem-relato de experiência. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 4, n. 4, p. 15-20, 2014.

ROCHA, C. R. R. **Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais**. [Tese. (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2015.

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

ROSA, R. M. **Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do diseleneto de difenila em células de mamíferos**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. 2008.

SALUSTIANO, E. J., NETTO, C. D., FERNANDES, R. F., DA SILVA, A. J., BACELAR, T. S., CASTRO, C. P.; COSTA, P. R. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational new drugs**, v. 28, n. 2, p. 139-144, 2010.

SANTOS, E. A. **Estudo da atividade citotóxica da alfa-lapachona e seu derivado tetrahidropirano**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012

SHEN L., DU, G. Lycium barbarum polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathways. **Life Sciences** 91 (2012): 353-57.

SCOLASTICI, C.; ALVES DE LIMA, R. O.; BARBISAN, L. F.; FERREIRA, A. L. A.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 510–514, 2008.

SELVA, T. M. G. **Estudos eletroquímicos da lausona (2-hidroxi-1,4 naftoquinona) e derivados da 1,4 – naftoquinona com atividade moluscicida**. 67 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SENS, M. M. **O uso popular das plantas medicinais no leste da ilha de Santa Catarina e a medicina ayurvédica-um estudo comparativo**. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Medicina. Departamento de Saúde Pública 2005.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. Artmed Editora. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191, 1988.

SOUSA, E. T. **Quinonas no ar atmosférico: determinação, concentrações e correlações entre as fases vapor e particulada**. 2012. 117 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador.

TANDON, V. K., MAURYA, H. K., VERMA, M. K., KUMAR, R., & SHUKLA, P. K. 'On water' assisted synthesis and biological evaluation of nitrogen and sulfur containing hetero-1, 4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2418-2426, 2010.

TANG, W. M., CHAN, E., KWOK, C. Y., LEE, Y. K., WU, J. H., WAN, C. W., CHAN, S. W. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of Lycium barbarum fruit. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 307-314, 2012.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** 35, 206-221, 2000.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutat. Res.**, v. 441, n. 2, p. 215–224, 1999.

WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN B. H. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from Lycium barbarum L. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 184–192, 2010.

WAWRUSZAK, A., CZERWONKA, A., OKŁA, K., & RZESKI, W. Anticancer effect of ethanol Lycium barbarum (Goji berry) extract on human breast cancer T47D cell line. **Natural product research**, v. 30, n. 17, p. 1993-1996, 2016.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1356–1362, 2010.

ZHAO, H. Lycium barbarum glycoconjugates: effect on human skin and cultured dermal fibroblasts. **Phytomed**, 12: 131-137, 2005.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Hui : **Food Science and Technology** : Dried Fruits : Phytochemicals and Health Effects. Somerset, USA: John Wiley & Sons, p.133-141, 2012.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Por meio dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, realizados com concentrações indicadas para o uso diário de *Lycium barbarum*, pode-se concluir que:

- O *L. barbarum* não apresentou potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para a espécie *A. cepa*. Entretanto, o nutracêutico apresentou um potencial antígenotóxico e animutagênico, com promissoras porcentagens de redução de danos (%RD), os quais podem ser atribuídas a sua constituição rica em diversos antioxidantes;

- Os ensaios realizados com células HepG2 mantida em cultura, não mostraram efeitos genotóxicos nem mutagênicos para o *L. barbarum*. Porém, foram observados efeitos antígenotóxicos e antimutagênicos, os quais podem ser associados aos resultados do ensaio do cometa e do MN, bem como ao aumento dos níveis de GSH registrados;

- Os ensaios realizados com as células MCF-7 mantidas em cultura, indicaram um efeito genotóxico do *L. barbarum*. Contudo, pela ausência de efeito mutagênico desse fitoterápico sobre essas células, podemos concluir que esses danos genotóxicos observados não foram fixados nas células MCF-7.

- As células MCF-7 foram mais sensíveis que as células HepG2 e como esta linhagem é não metabolizadora, podemos associar os efeitos observados aos próprios componentes do *L. barbarum*;

- O ensaio do cometa e do MN, realizados em sistemas *in vitro*, demonstraram ser eficientes e complementares nas avaliações genotóxicas, antígenotóxica, mutagênica e antimutagênica do fitoterápico estudado;

- Quanto o potencial oxidativo do *L. barbarum*, avaliado em ambas linhagens celulares (HepG2 e MCF-7), é possível inferir que o fitoterápico pode influenciar nos níveis de GSH. As atividades enzimáticas da SOD e GST e os níveis de TBARS não foram comprometidos, o que permite inferir ausência de indução de estresse oxidativo pelo extrato desta planta;

- A utilização de diferentes sistemas testes e biomarcadores contribuíram para uma análise significativa do potencial protetivo do *L. barbarum*. Assim, este estudo contribuiu com dados importantes para melhor conhecimento das propriedades nutricionais e protetoras do DNA dos componentes presentes no extrato de *L. barbarum*, bem como dos potenciais farmacológicos dessa planta para uso como alimento funcional e na medicina. Portanto devem ser desenvolvidos outros tipos de ensaios (por exemplo, bioquímicos e fisiológicos) que possam completar as informações aqui apresentadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, R.F.; MEGALLA, A. M.; MOHARRAM, K.M.; ABDEL-GAWAD, T.H.I.; SHERIF, M. A. L.; EL-SYED; LOTTIFY, A. E. Cytological effects of fungal metabolites produced by fungi isolated from Egyptian poultry feedstuffs. **J. Basic Microbiol.**, 29: 131-139. 1989.

ABIFISA, Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico. Suplemento alimentar e promoção da saúde. 2007. Disponível em :<<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em 17/01/2017

ALEMAN, C. C. **Manejo de irrigação em diferentes fases de desenvolvimento da Calendula officinalis L.** 2015. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.

ALEXANDRE R.F. **Fitoterapia baseada em evidências: exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina.** [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.

AL-SABTI K.; METCALFE C. D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

AL-SABTI, K. Allium test for air and water borne pollution control. **Cytobios, Cambridge**, v.59, p. 71-78, 1989.

AL-SABTI, K.; KURELEC, B. Chromosomal aberration in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorination by-products. **Archives of Environmet Contamination and Toxicology**, New York, v.34, p. 80-88, 1985.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, J. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331 – 1341, 2002.

ALVES A.R., SILVA M.J.P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem, USP**. 2003; 37(4):85-91.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: Histórias, Problemas e Perspectivas. UFF. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.5, n.3, p. 450-513, 2013.

AMAGASE H., SUN B., BOREK C. Lycium barbarum (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. **Nutr Res** 2009; 29: 19–25.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji). **Food Research International**, v. 44, p. 1702-1717, 2011.

- AMAGASE, H.; NANCE, D. M. A Randomized, Double-Blind, PlaceboControlled, Clinical Study of the General Effects of a Standardized Lycium barbarum (Goji) Juice, GOCHI,T.M. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 14, n. 4, p. 403-412, 2008.
- ANDRADE, C.R.B. **Estudo botânico e fitoquímico das folhas de zanthoxylum caribaeum lam (rutaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais, 2014.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J., Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v.560, p.57-67, 2004.
- ANDRIÃO, M.A.; PEREIRA, F.C.S.; MARTINS, M.I.E.G.; SACRAMENTO, L.V.S. 2010 – Estimativas de custo de produção e rentabilidade de plantas medicinais: carqueja cultivada no município de Cajuru, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.40, p.16-26.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. **Interface- Comunicação Saúde Educação**, v. 17, n. 46, p. 615-33, 2013.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.CP. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, p.81-88, maio/agosto 2000.
- ARORA, K.; NAMRATA, S.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. Evaluation of Genotoxic Risks Due to Temporal Changes in Soil Urea: Using *Allium cepa* L. Root Tip Bioassay. **Cytologia**, v. 79, n. 1, p. 85-93, 2014.
- ARRIGONI, O.; BITONTI, M.B.; COZZA, R.; INNOCENTI, A.M.; LISO, R.; VELTRI, R. Ascorbic acid effect on pericycle cell line in *Allium cepa* root. **Caryologia**, v. 42, p. 213-216, 1989.
- ARRUDA, A. C. C. **Avaliação da toxicidade subcrônica e reprodutiva do extrato seco de pericarpo de passiflora edulis variedade flavicarpa degener em ratos**. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR DE FITOTERÁPICOS, SUPLEMENTO ALIMENTAR E DE PROMOÇÃO DA SAÚDE - **ABIFISA**. Fitoterápicos: uma tendência natural. 2014. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 17/01/2017.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 444-447, jul./set. 2007.
- BAKARE, A. A.; ADEYEMI, A. O.; ADEYEMI, A.; ALABI, O. A.; OSIBANJO, O. Cytogenotoxic effects of electronic waste leachate in *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 65, p. 94-100, 2012.

- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.
- BALLARIN S.M, MATAS M.A.L., ABAD D.S., CINTO N.P., CARNÉS J. Anaphylaxis Associated With the Ingestion of Goji Berries (*Lycium barbarum*). **J Investig Allergol Clin Immunol**. 2011; 21(7):567-70.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARBOSA, L. C. R. S. Análise da importância do uso racional de plantas medicinais e seu controle microbiológico. **Pindamonhangaba -SP: FAPI Faculdade de Pindamonhangaba**. 2013.
- BATISTA, M.; BARATA, T. O papel dos fitoquímicos na Quimioprevenção do Câncer. **Monografia orientado por Dr. Themudo Barata. Faculdade de ciências da nutrição e alimentação da universidade do porto, porto**, 2010.
- BEDNARCZUK, V.O; VERDAM, M.C.S ; MIGUEL, M.D ; MIGUEL, O.G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez./2010.
- BELLINI, M.; ANGELI, L.; MATUO, R.; TEREZAN, A.; RIBEIRO, L.; MANTOVANI, M. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 355-360, 2006.
- BENLLOCH, M.; MURIACH, M.; CASTELLANO, G.; PELLUZ, F. J. S.; GARCIA, E. G.; BELLVER, M. F.; ROMERO, F. J. *Lycium Barbarum* and Human Health. Canadá: **Springer Science**, p. 153-154, 2015.
- BENSKY, D., GAMBLE, A. GOU,Q. Z. Chinese Herbal Medicine, **Materia Medica** (pp. 333–334). (revised ed). Seattle, Washington: Eastland Press, Inc, 1993.
- BERRIDGE, M., HERST, P., & TAN, A. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, 11(05), 127– 152.
- BESSA, G. de O. **Avaliação da atividade angiogênica e do potencial de cicatrização do látex de *Euphorbia tirucalli* (aveloz)**. 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.
- BIAN, L., SHE, X.; WANG, Y. (1996). Morphological study of CCl₄ induced liver damage of mouse and its treatment with *Lycium barbarum* polysaccharides. **Ninxia Journal of Medicine**, 18(4), 196–198.
- BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 165f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826–833, 2011.

BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and Salmonella typhimurium. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 120, p. 174-83, 2015.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on Allium cepa cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-83, 2016.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v. 12, n. 12, p. 123-30, 1999.

BORGES, F. F. V. **Atividades antimutagênica, antigenotóxica e anticitotóxica de Silybum marianum (L.) Gaertn e sua influência na expressão de genes de resposta a danos no DNA.** 2015.

BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology.** 2 ed., Estados Unidos: Plenum Publishing Corporation, p. 1-432, 1987.

BRYAN, J. K., COSTA, D., GIESE, N., NUMMY, K., RAPP, C., SEAMON, E Goji (Lycium spp) in natural standard monograph. Natural Standard Inc, 2008.

CAO, G. W.; YANG, W. G.; DU, P. Observação dos efeitos da terapia LAK / IL-2 combinada com polisacarídeos *Lycium barbarum* no tratamento de 75 pacientes com câncer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi (Chin J Oncol)*. 1994; 16 428-431

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; BOCCIO, P. D.; FEDERICI, L.; ILIO, C. D. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. *Aquatic Toxicology*, v. 90, p. 48-57, 2008.

CARNEIRO, C. C., VÉRAS, J. H., GÓES, B. R., PÉREZ, C. N., & CHEN-CHEN, L. Mutagenicity and antimutagenicity of *Salacia crassifolia* (mart. Ex. Schult.) G. Don. evaluated by Ames test. *Brazilian Journal of Biology*, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

CARRARA D.P. Possangaba: o pensamento médico popular. **Marica**: Ribro Soft; 1995.

CARVALHO A.C.B., NUNES D.S.G., BARATELLI T.G., Netto E.M. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos**. T & C Amazônia. 2007;11:26-32.

CARVALHO, M.C.G.; PIRES, R.L.; FLORINDO, W.S.; CAVALCANTI, A.S.S. Evidências para o uso de *Indigo naturalis* no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. *Natureza on line*, v.8, n.3, p.127-131. 2010. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/06_CarvalhoMCGetal_127131.pdf>. Acesso em 25/01/2018.

CARVALHO, T. U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). *Métodos de Estudo da Célula*. Rio de Janeiro: **FENORTE/UENF.**, v. 2, p. 45-58, 1996.

CASTELLANO, O. **Introdução à fitoterapia: teoria e prática**. Coordenadoria de Atividades Culturais, São Paulo: EDUSP; 1981.

CAVALCANTE, A. C. P.; DA SILVA, A. G. Levantamento etnobotânica e utilização de plantas medicinais na comunidade Moura, Bananeiras-PB. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 2, p. 3225-3230, 2014.

CAVAZIM, P.; FREITAS, G. As propriedades antioxidativas do goji berry no auxílio à melhora do centro de acuidade visual, com abordagem em tratamentos da retinopatia diabética. **UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, 2014.

CAVAZIM, P. F.; FREITAS, G. As propriedades antioxidativas do goji berry no auxílio à melhora do centro de acuidade visual, com abordagem em tratamentos da retinopatia diabética. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, [S.l.], v. 20, n. 2, jan. 2018. ISSN 2178-2571. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1585>>. Acesso em: 24/01/2018.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. *Quím. Nova* [online]. 1998, vol.21, n.1, pp.99-105.

CHANG, H. M.; BUT, P. P. H. Gouqizi. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, vol. 2. (pp. 852–854)Singapore: **World Scientific**, 2001.

- CHAUHAN, J.K.S.; SUNDERARAMAN, V. Effect of substituted ureas on plant cells. I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v.55, p. 91-98. 1990.
- CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ Exp Bot.**, v. 42, p. 181–189, 1999
- CHEN, W.; Cheng, X.; Chen, J.; Yi, X.; Nie, D.; Sun, X.; Qin, J.; Tian, M.; Jin, G.; Zhang, X. Lycium barbarum polysaccharides prevent memory and neurogenesis impairments in scopolamine-treated rats. **PLoS One**; 9(2): e88076, 2014.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. p. 273.
- CONNELL, H.; MARANAN, W. J. Powerful Paleo Superfoods: The Best Primal-Friendly Foods for Burning Fat, Building Muscle and Optimal Health. USA, p. 11-12, 2014.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 376-376, 2014.
- CORREIA, C. C. M. **As plantas medicinais: o resgate da sabedoria popular**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca do Curso de Especialização em Educação do Campo da Universidade Federal do Paraná. Como requisito parcial para obtenção do grau de especialista, 2015.
- COSTA, M. A. **Validação de formulário de notificação de eventos adversos a plantas medicinais e fitoterápicos**. 2013. 87 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2013.
- COSTA, N. F. **Uma abordagem diferenciada sobre fitoterápico com alunos de ensino médio**. Trabalho Final apresentado ao Departamento de Ensino de Ciências e Biologia, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.
- COSTA, R.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M.; JORDÃO, B. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assay. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 118, pp. 86-93, 2008.
- DEVEZA, C. **Consumo de Fitoterápicos no Distrito de Viana do Castelo**. 2014. Tese de Doutorado, 2014.
- DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M.G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation, **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. B, p. 1070- 1085, 2014.
- DUARTE, S. L. F. Constituintes químicos de *Phyllanthus acuminatus* Vahl (**Phyllanthaceae**): isolamento, caracterização estrutural e atividades biológicas. 2013.

ELDIN S., DUNFORD A. **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. São Paulo: Manole; 2001.

ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. 2011 – Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui – RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.121-128.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 229-245, 2003.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat Res**, n. 504, n. 1-2, p. 131-6.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent – trifluralin herbicide. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu; 2008.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.

FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* in wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water**, v. 8, p. 291–298, 1993.

FOOD INGREDIENTS BRASILEL. Alimentos vs doenças, 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/132.pdf>> Acessado em: 11/01/2018.

FORTIN, B. S. **Xenobióticos, desintoxicação e a sua relação com a alimentação, nutrição e saúde**. 2014. 36 f. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Juiz de Fora, 2014.

FOTAKIS, G., & TIMBRELL, J. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, 160(2), 171–177.

GADELHA, C. S.; JUNIOR, V. M. P.; BEZERAA, K. K. S.; PEREIRA, B. B. M.; MARACAJÁ, P.B. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; ŽEGURA, B.; NOVAK, M.; NUNIĆ, J.; BAJREKTAREVIĆ, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIĆ M. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 15, p. 14739-50, 2016.

GALILI, O.; VERSARI, D.; SATTLER, K. J.; OLSON, M. L.; MANNHEIM, D.; MCCONNELL, J. P.; CHADE, A. R.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 292, n. 2, p. H904-H911, 2007.

GAN, L.; ZHANG, S. H.; LIU, Q.; XU, H. B. Um complexo de polissacarídeo-proteína de *Lycium barbarum* upregula a expressão de citocinas em células mononucleares de sangue periférico humano. **Eur J Pharmacol**. 2003; 471 217-222

GÖMÜRGEN, A. N.; MUTLU, F. S. Bozcuk, Effects of polyamines (Putrescine, spermidine and spermine) on root tip mitosis and chromosomes in *Allium cepa* L. **Cytologia**, v. 70, n. 2, p. 217–224, 2005.

GONG H, SHEN P, JIN L, XING C, TANG F. Efeitos terapêuticos do *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) em irradiação ou quimioterapia induzida mielossupressores induzidos. **Radiopharm Cancer Biother**. 2005; 20 155-162

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutat. Res.**, v 310, p. 175–185, 1994.

GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. S110-S118, 2004. Supplement 1.

GUILHERMINO, J. F.; QUENTAL, C.; BOMTEMPO, J. V. Sistema de inovação em fitomedicamentos: os desafios da gestão para o desenvolvimento de fitomedicamentos a partir da biodiversidade brasileira. **Revista Fitos**, v. 7, n. 3, p. 169-184, 2012.

GUILLOUZO, A. Liver cells models in vitro toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v.106, p.511-532, 1998.

- GULLO C., PEREIRA C. De volta à inquisição. **Revista Isto É** 1998 set; p. 128-130.
- GUTIERREZ, Deliene Fracete. **Plantas medicinais, cultura e saúde nos quintais rurais do Vale do Mucuri**. 2015. Dissertação de Mestrado. UFVJM.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases – the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.
- HARA, R. V. **Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia-SP**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista- UNESP. Rio Claro, 2012.
- HARBORNE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. springer science & business media, 1998.
- HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H. J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 843–858, 2001.
- HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 123, p. 61–118, 1983.
- HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J. M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; CARVAJAL LÓPEZ, L.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20–24, 2012.
- HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; GOÑI, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1182–1189, 2011.
- HOLST, C.M.. OREDSSON, S.T. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.379-387, 2005.
- HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluente. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2090–2095, 2009.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 277, p. 91-138, 1992.

IMS Health, 2011. The Global Use of Medicines: Outlook through 2011. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/ims/>>. Acesso em: 17/01/2018.

INBARAJ, B. S., LU, H., KAO, T. H.; CHEN, B. H. (2010, Feb 5). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 51(3), 549–556 Epub 2009 Sep 11.

INBARAJ, B. S.; LU, H.; HUNG, C. F.; WU, W. B.; LIN, C. L.; CHEN, B. H. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 47, p. 812 -818, 2008.

JACOCIUNAS, L. V.; DE ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M.; DE ABREU, B. R. R.; FERRAZ, A. D. B. F.; DA SILVA, J.; DIHL, R. R. Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis block micronucleus (CBMN) cytome assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 56-59, 2013.

JAGETIA, G.; ARUNA, R. Correlation of micronuclei-induction with the cell survival in HeLa cells treated with a base analogue, azidothymidine (AZT) before exposure to different doses of gama-radiation. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 139, pp. 33- 43, 2003.

JÄNICKE, R. U. (2009). "MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3." **Breast cancer research and treatment** 117(1): 219-221.

JIMÉNEZ, E. R.; CARRIL, E. P. U. Café I (*G. Coffea*). **Reduca Biología**, v. 7, n. 2, p. 113-132, 2014.

KAK, S.N.; KAUL, B.L. Interaction of hyperthermia with gamma rays in *Allium cepa* cells. **Indian J. Exp. Biol.**, 27: 98-99. 1989

KEANEY, J. F. J.; LARSON, M. G.; VASAN, R. S.; WILSON, P. W.; LIPINSKA, I.; COREY, D.; MASSARO, J. M.; SUTHERLAND, P.; VITA, J. A.; BENJAMIN, E. J. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, n. 3, p. 434-439, 2003.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M. JR.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VON DER HUDE, W.; WAKATA, A. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 167-72, 2002.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 86–99, 2011.

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver

cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1–3, p. 315–328, 2004.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 185–202, 1998.

KNOWLES, B.B., HOWE, C.C. AND ADEN, D.P. (1980) Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. **Science**, 209, 497-499.

KOHEN, R., GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, p.149-157, 2000.

KOHEN, R., NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v.30, p.620-650, 2002.

KOMISSAROVA, E.V., SAHA, S.K., ROSSMAN, T.G. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 202, p.99-107, 2005.

KRATZ, J. M., TERRAZAS, C. B., MOTTA, M. J., REGINATTO, F. H., SIMÕES, C. M. Determinação da composição química e dos perfis de dissolução in vitro de medicamentos à base de Ginkgo biloba disponíveis no mercado brasileiro. **Lat Am J Pharm**, v. 27, p. 674-680, 2008.

KUMAR, D.; SINHA, S.P. Threshold dose of cytogenetic toxicity of Lindane, Malthion and Metacid in *Allium cepa* root-tip cells. **Cytologia**, v. 54, p. 547-552. 1989.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211–221, 2006.

LEFFA, D. D. **Efeito corretivo do consumo dos sucos de acerola (*Malpighia Emarginata* DC.) sobre parâmetros bioquímicos e genotóxicos em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria.** 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutat. Res.**, v. 650, p. 80–86, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutat Res.**, v. 682, p.71–81.

- LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, p.2148-2155, 2011.
- LEWINSKA, A.; LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 781-786, 2007.
- LI, G; SEPKOVIC, W; BRADLOW, H. L.; TELANG, N. T., WONG, G. Y C. *Lycium barbarum* inibe o crescimento de células de câncer de mama humanas positivas ao receptor de estrogênio alterando favoravelmente o metabolismo do estradiol. **Nutr Cancer**. 2009; 61 408-414
- LI, X. M. Efeito protetor dos polissacarídeos de *Lycium barbarum* no estresse oxidativo induzido por estreptozotocina em ratos. **Int J Biol Macromol**. 2007; 40 461-465
- LIMA-SARAIVA, S. R. G.; SARAIVA, H. C. C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; SILVA, J. C.; DAMASCENO, C. M. D., ALMEIDA, J. R. G. S.; AMORIM, E. L. C. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no brasil: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 1, n. 1, 2015.
- LIU, J.; SONG, E.; LIU, L.; MA, X.; TIAN, X.; DONG, H.; SONG, Y. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicology in Vitro**, v.26, p.841-8, 2012.
- LIU, X; SUN, J.; LI, H.; ZHANG, L.; QIAN, B. **Extração e isolamento do componente ativo em frutos de *Lycium barbarum* para inibir a proliferação de células PC3 in vitro**. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. 2000; 25 481-483 (CAN 134: 263473).
- MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat Res.**, v. 189, p. 103-112, 1987.
- MAIESE, K.; MORHAN, S. D.; CHONG, Z. Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 4, n. 1, p. 63-71, 2007.
- MANSO, C. I. M. P. **Consumo de laxantes particularmente de Sene numa Farmácia do Nordeste Transmontano**. 2013. Tese de Doutorado.
- MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 22, n. 2, p. 1399-407, 2014.
- MAO, F., XIAO, B., JIANG, Z., ZHAO, J., HUANG, X.; GUO, J. (2011). Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. **Medical Oncology**, 28(1), 121-126.

MARANHÃO, H. M. L. **Atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica, hepatoprotetora e segurança de uso do extrato aquoso da casca do caule de Simarouba amara Aublet (simaroubaceae)**, Tese apresentada, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2014.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environ. Res.**, v. 94, p. 221–226, 2004.

MATSUCHITA, H. L. P.; MATSUCHITA, A. S. P. A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública. **UNICIÊNCIAS**, v. 19, n. 1, 2015.

MATSUCHITA, H. L. P.; MATSUCHITA, A. S. P. A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública. **UNICIÊNCIAS**, v. 19, n. 1, 2015.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, p. 148–158, 2006.

MATSUMOTO, S. T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, S. M.; MARIN-MORALES, M. M. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with Chromium, by the Comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n. 1, 2005.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr.**, v. 133, p. 933S-940S, 2003. Supplement 3.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic.** v. 56, p. 60–69, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13–18, 2011.

MAZZEO, D. E.; MATSUMOTO, S. T.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1030-6, 2013.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 60409–60455, 1969.

MCCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Rad. **Biol. Med.**, v. 26, p. 1034–1053, 1999.

MCGUIGAN, C., & LI, X. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of phenazine in two human cell lines. **Toxicology in Vitro**, 28(4), 607–615.

MELLO, J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. 821p.

MIYAJI, C.; POERSCH, A.; RIBEIRO, L.; EIRA, A.; CÓLUS, I. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in Hep-2 cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1555-1559, 2006.

MOCAN, A., ZENGİN, G., SIMIRGIOTIS, M., SCHAFBERG, M., MOLLICA, A., VODNAR, D. C., ROHN, S. (2017). Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, 32(1), 153-168.

MORANTES, J; PRIETO, C; LINHARES, E; RINCON, J; ARISTIZÁBAL, F; Análisis fitoquímico y de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. **Revista da Academia Colombiana de Ciências**, volume 31, suplemento 121, 2007, página 473.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1-2), 55–63.

MUNARI, C. C.; ALVES, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 22-28, 2010.

NAGUIB, N.Y.M. Organic vs. Chemical fertilization of medicinal plants: a concise review of researches. **Advances in Environmental Biology**, Madrid, v.5, n.2, p. 394-400, 2011.

NAJI-ALI, F.; HASSPIELER, B.M.; HAFFNER, D.; ADELI, K. Human bioassays to assess environmental genotoxicity: development of a DNA repair assay in HepG2 cells. **Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 44-448, 1994.

NARDI, C. M.; BONAPARTE, L. F. **Fitoterapia chinesa-breve histórico de uso complementar a tratamentos de saúde na medicina tradicional chinesa: revisão bibliográfica**. Monografia apresentada à Faculdade de Educação, Ciência e Tecnologia – UNISAÚDE/CENTRO DE ESTUDOS FIRVAL – como requisito a conclusão do Curso de Formação de Especialista em Acupuntura, 2014.

NASCIMENTO, L. D. **Uso de plantas no tratamento de doenças respiratórias na Comunidade Caiana dos Mares, Alagoa Grande, Paraíba**. 2014.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 3–16, 2002.

NETO, F. R. G.; Almeida, G.S.S.A.; Jesus, N.G.; Fonseca, M.R. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 4, p. 856-865, 2014.

NHI, G ; QI, Z., *Lycium Fruit*, Lycii Fructus. Disponível em<
<http://content.nhiondemand.com/moh/media/TCMH1.asp?objID=100832&ctype=tcmh#fn111585>>. Acesso em 17/01/2017.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.167-181, 2000.

NOGUEIRA M.J.C. Fitoterapia: a volta à natureza. *Enfoque* 1984; 12(1):8-11.

NUNES, E. A.; LEMOS, C. T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T. N.; OLIVEIRA, N. C. D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutatuin Research**, v.386, pp.39-67, 1997.

OLIVEIRA, H. W. C. Cerrado e plantas medicinais: algumas reflexões sobre o uso e a conservação. (Trabalho de Conclusão de Curso). **Licenciatura em Ciências Naturais da Universidade Federal de Brasília, Planaltina**, 2013.

OLIVEIRA, L.F.G.; GILBERT, B.; BÔAS, G.K.V.Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**, v.8, p.1-10, 2014.

OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; SILVA, A.; MATIAZI, H.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, L. Protective effect of B-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, pp. 41-52, 2008.

OMS - **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**. Quality control methods for medicinal plants methods. p. 41- 43, 1998, 122p.

OSMAN N. I., AWAL A., SIDIK N. J., ABDULLAH S. Antioxidant activities of in vitro seedlings of *lycium barbarum* (goji) by diphenyl picrylhydrazyl (dpph) assay. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 2012; 4(4):137-41.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, p. 291–298, 1984.

PANDA, K.K.; MAHESWAR, L.; PANDA, B.B. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. *Sci. Total Environ.*, v. 96, p. 281-296, 1990.

PATEL, S.; BAJPAYEE, M.; PANDEY, A. K.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 409–1418, 2007.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D.; Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.

PENG X, HUANG J, QI C, ZHANG Y X, TIAN G Y. Estudos sobre química e mecanismo imuno-modulador de um glicoconjugado de *Lycium barbarum* L. **Chin J Chem**. 2001; 19 1190-1197.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 63, pp. 1995-2018, 1998.

PIMENTEL, V., VIEIRA, V., MITIDIERI, T., FRANÇA F., PIERONI, J.P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. **Revista do BNDES, Rio de Janeiro**, n. 43, p. 41-89, 2015.

PIRES, V. A. **Efeito da planta vitex montevidensis na aterosclerose experimental: uma abordagem sobre o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico na indústria brasileira**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Medica**, n.76, v.1, p.7–19, 2010.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Medica**, n.76, v.1, p.7–19, 2010.

POWERS, S.K., CRISWELL, D., LAWLER, J., JI, L.L., MARTIN, D., HERB, R.A., DUDLEY, R. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.266, p. 375-380, 1994.

PRUDÊNCIO, R. **Levantamento etnofarmacológico de solidago chilensis meyen. “arnica-brasileira” (asteraceae)**. Monografia apresentada ao Setor de Pós-graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma- SC, 2012.

PUNTUREE, K., WILD, C.P., VINITKETKUMNEUN, U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.183-189 (2007).

- QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid.
- RANK, J.; LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acedine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 36, p. 13–18, 2002.
- RANK, J.; NIELSEN, M. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 17–24, 1994.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutat. Res.**, v. 390, p. 121–127, 1997.
- RAO, B.V. Cytological effects of *Pendimithalin* in *Allium cepa* root meristems. **Cell Chromosome Research**, v. 12, p. 57-59, 1989.
- RICHARD, J., BOERGERS, A., VOM EYSER, C., BESTER, K., & TUERK, J. Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 217(4-5), 1–9, 2013.
- ROBERTO, M. M. (2009). **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por meio de sistema-teste de *Allium* e células de mamíferos** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro.
- RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438-42, 2015.
- ROGERO, S. O., LUGÃO, A. B. , IKEDAB, T. I. , CRUZ, A.. S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials research**. v.6, n.3, 317-320. 2003.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.
- RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. B. Cummings (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595–621, 2002.
- SAITO, S. T., Cignachi, G., Gasparri, S., & Saffi, J.. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 3, 2016.

SANTANA, E. A. **Avaliação do potencial quimioprotetor de nanodispersão e extrato etanólico de mikania glomerata sprengel (asteraceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.

SANTOS, C.; VALE, C. V. D. **Avaliação do efeito dos extratos aquoso e metanólico da Schninus terebinthifolius, Raddi (Aroeira) sobre culturas de esplenócitos murinos e sobre a bactéria Corynebacterium pseudotuberculosis**. Tese. Universidade Federal da Bahia, Salvador- BA., 2013.

SANTOS, M. S. **Quercetina modula a sinalização do cálcio intracelular no coração**. 72 f.. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016. 2016.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, A.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, I.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 303–308, 2000.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista destaques acadêmicos**, vol. 5, n. 3, 2013.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista destaques acadêmicos**, vol. 5, n. 3, 2013.

SENGUPTA, K.; CHATTERJEE, S.; DEY, A. Catalytic H₂O₂ Disproportionation and Electrocatalytic O₂ Reduction by a Functional Mimic of Heme Catalase: Direct Observation of Compound 0 and Compound I in Situ. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 3, p. 1382-1388, 2016.

SENS, M. M. **O uso popular das plantas medicinais no leste da ilha de Santa Catarina e a medicina ayurvédica-um estudo comparativo**. 2005.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell Biol. Int.**, v. 27, p. 657–664, 2003.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v. 140, p. 1307–1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, v. 448, p. 81–90, 2000.

SILVA, A. M. R. C. **Estudo de utilização de fitoterápicos dispensados em um centro de saúde em Fortaleza-Ce: xarope de chambá (*Justicia pectoralis jacq var. stenophylla leonard*) 5% e pomada de confrei (*Symphytum officinale* L.) 5%**. Tese de Doutorado. Tese Universidades Federais do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Rural de Pernambuco, Fortaleza- PE, 2015.

SILVA, C. T.; MIRIAM, G. J. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult.** vol.66 no.1 São Paulo, 2014.

SILVA, E. L. **Estudo Químico-Biológico de *Dalbergia miscolobium* Benth (Fabaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

SILVA, G. T. **Contribuição para o conhecimento de espécies da família cactaceae: usos pela medicina popular e potencial terapêutico**. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), UFPB- Universidade Federal da Paraíba 2014.

SILVA, J. C. F.; DEGÁSPARI, C. H. Nutritional properties and adverse effects of “goji berry”-(*Lycium barbarum* L.). **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 3, 2014

SILVA, L. S. **Utilização de plantas medicinais e seus riscos na gestação: Orientações do enfermeiro quanto ao uso indiscriminado**. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Universidade Federal da Paraíba, 2014.

SILVA, M. A. P. **Interação medicamento-preparação à base de plantas medicinais**. Dissertação de mestrado, Universidade do Algarve, 2013.

SILVA, M.V.; RITTER. Plantas medicinais e tóxicas da reserva biológica do Lami, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, **Rev Bot**, v.57, p.61-73, 2002.

SIMÕES C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P; IRGANG, B.R.; STEHMANN, J.R. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. 5ª Edição, Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 174 p, 1998.

SIMÕES O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G P. C. J; MELLO, A. L. MENTZ, P. R. Petrovick, **Farmacognosia da planta medicamento**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, UFSC: Porto Alegre, 2003.

SIMSTEIN, R., M. BUROW, (2003). "Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system." **Experimental biology and medicine** 228(9): 995-1003.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175, 184-191, 1988.

SINZ, M.W. In vitro metabolism: hepatocytes. In: Woolf, T.F. (Ed.), **Handbook of Drug Metabolism.** New York: Marcel Dekker, 1999, p.401-424.

SLOCZYNSKA, K. et al. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 2, p. 273–285, mar. 2014.

SOUZA, I. C. **Uso da morfina no período gestacional e lactação: efeitos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central e comportamento.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

SOUZA, J.A.; MIRANDA, E.M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis.** Disponível em: <<http://www.cpafac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>> Acesso em 17/01/2017.

SOUZA, S. M. de. **Estudo fitoquímico e atividade citotóxica de extratos e frações de folhas de Austroplenckia populnea Reissek (Celastraceae).** 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

SOUZA, V. F., CAMPOS, A. G.; SILVA, J. L.; ROSA, P. S. Um diagnóstico sobre o estudo das plantas medicinais no ensino de ciências. **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, n. 3, 2016.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. 2010 – O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.435-440.

SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; Hartmann, A.; The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.

STURBELLE, R. T., PINHO, D. S. D., RESTANI, R. G., OLIVEIRA, G. R. D., GARCIAS, G. D. L., & MARTINO-ROTH, M. D. G. (2010). Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev. bras. farmacogn**, 20(3), 409-415.

TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, p. 151-172, 2003.

TANG W.M., CHAN E., KWOK C.Y., LEE Y.K., WU J.H., WAN C.W., CHAN R.Y., YU P.H., CHAN S.W. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. **Inflammopharmacology**. 2012; 20(6):307–314.

TANG, W.M.; CHAN, E.; KWOK, C.Y. Uma revisão dos efeitos anticancerígenos e imunomoduladores da fruta *Lycium barbarum*. **Inflammofarmacologia**. 2012; 20 (6): 307-314.

TEIXEIRA, J.B.P.; BARBOSA, A.F.; GOMES, C.H.C.; EIRAS, N.S.V. **A Fitoterapia no Brasil: da Medicina Popular à regulamentação pelo Ministério da Saúde**. 2012.

Disponível em: <<http://www.ufjf.br/proplamed/files/2012/04/A-Fitoterapia-noBrasil-da-Medicina-Popular%20-regulamenta%20A7%20A3o-peloMinist%20A9rio-da-Sa%20BAde.pdf>>. Acesso em 17/01/2017.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Gen. Mol. Biol.**, v. 26, p. 551–555, 2003.

THEISEN, Geovane Rafael et al. Implantação de uma horta medicinal e condimentar para uso da comunidade escolar. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental (Fechada para submissões por tempo indeterminado)**, v. 19, n. 1, p. 167-171, 2015.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Muta.** v. 626, p. 4–14, 2007.

TUROLLA, M. S. R., NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289 - 306, 2006.

UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 261–269, 2000.

VALE, C. R. **Avaliação da atividade tóxica, genotóxica e antigenotóxica de hymenaea courbaril l. em camundongos e drosophila melanogaster**. 116 f.. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic affects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 31–43, 1997.

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

VELOSO, C. P. **Biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos fitoterápicos. Medicina Herbal**. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/blog/nutricao-homo-obesus/semcategoria/medicina-herbal/> . Acesso em 17/01/2017.

VENSKE, D. K. R. **Efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida sobre parâmetros indicadores de resistência periférica à insulina, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA em ratos Wistar**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, 2010.

VENTURA, B.C.; DE ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pesticide **Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42–51, 2008.

VENTURA-CAMARGO, B. C; DE ANGELIS, D. F; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-32, 2016.

VENTURA-CAMARGO, B. C; DE ANGELIS D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-32, 2016.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environ. Contam. Toxicol**, v. 43, p. 284–291, 2002.

VIDAL K., BUCHELI P., GAO Q., MOULIN J., SHEN L.S., WANG J., BLUM S., BENYACOUB J. Immunomodulatory effects of dietary supplementation with a milk-based wolfberry formulation in healthy elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Rejuvenation Res**. 2012;15(1):89–97.

VIEIRA, É. de A. Potencial nutricional e antioxidante de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016. 2016.
VIEIRA, T. F. **Equilíbrio higroscópico da casca do café arábica**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação 2015.

VLASITS, J., JAKOPITSCH, C., BERNROITNER, M., ZAMOCKY, M., FURTMÜLLER, P. G., OBINGER, C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 500, n. 1, p. 74-81, 2010.

WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN B. H. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 184–192, 2010.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; BROCKMAN, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v.238, pp.57-85,1990.

WESTERINK, W.M.A.; STEVENSON, J.C.R.; HORBACH, G.J.; SCHOONEN, W.G.E.J. The development of RAD51C, cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutation Research**, v.696, p.21-40, 2010.

WU H, GUO H, ZHAO R. Efeito do polissacarídeo *Lycium barbarum* na melhoria da capacidade antioxidante e do dano do DNA em ratos NIDDM. **Yakugaku Zasshi**. 2006; 126 365-371

WU, J. N. (2005). Fructus Lycii/Barbary wolfberry fruit in An Illustrated Chinese material medica (pp. 402–403). New York, New York: Oxford University Press.

XIA, G. Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway. **Mol Med Rep**; 9(4): 1237-1241, 2014.

XIN, Y.F. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides against doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. **Phytother Res**; 26(5): 716-721, 2012.

XU, M., ZHANG, H., WANG, Y. (2002). The protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on alloxan-induced isolated islet cells damage in rats. *Zhong Yao Cai (Journal of Chinese Medicinal Materials)*, 25(9), 649–651.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1356–1362, 2010.

YUNES, R. A ;V. CECHINEL FILHO. **Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental**: In: R. A. Yunes, J. B. Calixto, Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó-SC, Argus, 523 p. 2001.

ZAJCHOWSKI, D. A., M. F. BARTHOLDI, (2001). "Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells." **Cancer research** 61(13): 5168- 5178.

ZEGURA, B., HEATH, E., CERNOSA, A., & FILIPIC, M. (2009). Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, 75(11), 1453–1460.

ZHANG M, CHEN H, HUANG J, LI Z, ZHU C, ZHANG S. Efeito do polissacarídeo de *Lycium barbarum* em células QGY7703 do hepatoma humano: Inibição da proliferação e indução da apoptose. **Life Sci.** 2005; 76 2115-2124.

ZHENG, G. Q., ZHENG, Z. Y., XU, X., & HU, Z. H. (2010). Variation in fruit sugar composition of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. of different regions and varieties. **Biochemical Systematics and Ecology**, 38(3), 275-284.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Hui : Food Science and Technology : Dried Fruits : **Phytochemicals and Health Effects**. Somerset, USA: John Wiley & Sons, p.133-141, 2012.

ZHU CP, ZHANG SH. *Lycium barbarum* polysaccharide inibe a proliferação de células HeLa induzindo apoptose. **J Sci Food Agric.** 2013; 93 (1): 149-156.

ZHU, J. Characterization and hypoglycemic effect off a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. **Carbohydr Polym;** 98(1): 8-16, 2013.

ZHU, Y. P. (1998). Gou Qi Zi. Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications (pp. 642–646). Amsterdam, **Netherlands**: Harwood Academic Publishers.

ZIECH, D.; FRANCO, R.; GEORGAKILAS, A. G.; GEORGAKILA, S.; MALAMOUMITSI, V.; SCHONEVELD, O.; PAPPAS, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemic-Biological Interactions**, v. 188, p. 334–339, 2010.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.