

**Avaliação do potencial genotóxico e antioxidante do extrato do fruto
*Ardisia Elliptica*****Evaluation of the genotoxic and antioxidant potential of *Ardisia
Elliptica* Fruit extract**

DOI:10.34119/bjhrv2n6-070

Recebimento dos originais: 10/11/2019

Aceitação para publicação: 10/12/2019

Luana Dalla Brida

Graduação em Nutrição

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.

E-mail: luanadallabrida@outlook.com

Tauini Gagiola Soares

Graduação em Nutrição

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.

E-mail: luanadallabrida@outlook.com

Josiane de Carvalho Vitorino

Doutor em Ciências-Bioquímica.

Instituição: Universidade Federal do Paraná.

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.

E-mail: jvitorino@univali.br

Joanna Sievers

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.

E-mail: joannasievers@gmail.com

Angela Malheiros

Doutor Química Orgânica

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina.

Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.

E-mail: angela@univali.br

Andreatta Matias

Graduação em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade do Vale do Itajaí.
Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.
E-mail: vmatias@univali.br

Adriana Bramorski

Doutor em Ciências dos alimentos.
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina.
Endereço: Rua Uruguai, 458, Itajaí (SC), 88302901.
E-mail: adrianabramorski@gmail.com

RESUMO

O gênero *Ardisia* pertencente à família *Primulaceae*, apresenta compostos fitoquímicos biologicamente ativos como peptídeos, saponinas, isocumarinas quininas e alquilfenóis, sendo considerado boa fonte de compostos promotores de saúde e potentes fitofarmacêuticos, porém pouco se conhece sobre a toxicidade desta planta. Assim, o estudo objetivou verificar a atividade antioxidante e genotóxica dos extratos etanólicos do fruto maduro e verde da *A. elliptica*. Os extratos diluídos nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 50 µg/ml foram submetidos a proteção do plasmídeo pBSK II e ao Ensaio Cometa. Os resultados revelaram que nenhuma das concentrações dos extratos apresentaram aumento significativo de danos ao DNA quando comparado ao controle PBS. Quanto à atividade antioxidante, as concentrações de 1000, 500 e 250 µg/mL do extrato do fruto maduro apresentaram capacidade protetora ao DNA. Em contrapartida, o extrato do fruto verde, apenas na concentração de 1000 µg/mL revelou boa proteção gênica. Conclui-se que os extratos apresentaram baixo potencial genotóxico, portanto, promissores em relação a sua proteção em comparação com um antioxidante sintético. Entretanto, considerando a falta de pesquisas sobre o potencial genotóxico *in vivo* desta planta, são necessários estudos para completar a avaliação de segurança e potenciais farmacológicos.

Palavras chaves: *Primulaceae*; *Ardisia elliptica*; atividade antioxidante, genotoxicidade.

ABSTRACT

The genus *Ardisia* belonging to the family *Primulaceae* presents biologically active phytochemical compounds such as peptides, saponins, isocumarins quinine and alkylphenols, being considered good source of health promoting compounds and potent phytopharmaceuticals, but little is known about the toxicity of this plant. Thus, the study aimed to verify the antioxidant and genotoxic activity of the ethanolic extracts of the mature and green fruit of *A. elliptica*. The extracts diluted at concentrations of 2000, 1000, 500, 250 and 50 µg / ml were subjected to Plasmid Protection pBSK II and Comet Assays. The results revealed that none of the extract concentrations showed a significant increase of DNA damage when compared to the PBS control. As for the antioxidant activity, the concentrations of 1000, 500 and 250 µg / mL of the mature fruit extract presented a protective capacity to the DNA. In contrast, the green fruit extract, only at the

concentration of 1000 µg / mL, revealed good gene protection. It is concluded that the extracts presented low genotoxic potential, therefore, promising in relation to their protection compared to a synthetic antioxidant. However, considering the lack of research on the in vivo genotoxic potential of this plant, studies are needed to complete the safety assessment and pharmacological potentials

Key words: *Primulaceae*; *Ardisia elliptica*; activity antioxidant, genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica é milenar e seu uso vem crescendo nos últimos tempos. O Brasil é considerado um dos países com maior diversidade vegetal e muitas dessas espécies são usadas para fins medicinais.¹ Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais continuam a ser utilizadas como forma alternativa de tratamento em diversas partes do mundo decorrente do alto custo dos medicamentos industrializados, do difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural.^{2,3}

Os princípios ativos das plantas tem sido empregado na medicina caseira através do uso direto da planta na forma de infusões, chás, tinturas e pós.⁴ Porém, algumas dessas plantas que apresentam propriedades medicinais podem conter substâncias tóxicas, o que torna errado o conceito de que plantas são medicamentos naturais. Considerando tais implicações, torna-se necessário o conhecimento científico das características de determinadas plantas, bem como o seu potencial mutagênico, uma vez que as plantas vêm sendo usadas pela população, considerando ser natural e não tóxico, porém sem nenhum conhecimento dos seus efeitos em longo prazo, podendo, dependendo da dose e tempo de uso resultar em efeitos tóxicos e irreversíveis a células do organismo.⁵

Dentre as espécies vegetais que vêm sendo utilizadas na prevenção ou tratamento de doenças pode-se citar a família *Primulaceae* conhecida por apresentar diversas propriedades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória, antiviral, antitumoral e citotóxica.⁶ O gênero *Ardisia* pertencente a esta família, abrange uma diversidade de espécies, cultivadas em diferentes partes do mundo. A *Ardisia elliptica* objeto deste estudo, é originária de países como Índia, Sri Lanka, China, Taiwan, Ásia e encontrada em algumas regiões do Brasil. É uma planta que se desenvolve preferencialmente em locais úmidos e quentes, podendo ser encontrada em bosques, pântanos, florestas e manguezais.⁷ O fruto é comestível e possui sabor ligeiramente amargo e os brotos de folhas podem ser consumidos como vegetais crus ou cozidos.⁸ Na medicina tradicional dos países populares as folhas ou raízes são usadas por possuírem atividade antipirética,

por aliviar dores, e no tratamento de diarreia, intoxicação hepática, doenças pulmonares e doenças venéreas. Pelas comunidades tribais além de tratamento medicinal são usadas para pinturas corporais.⁹

Neste contexto, o estudo objetiva avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e antioxidante dos frutos de *Ardisia elliptica* podendo ampliar sua utilização, bem como, conhecer seu potencial na proteção contra danos ao DNA celular.

2 METODOLOGIA

2.1 PREPARO DA AMOSTRA

A espécie *Ardisia elliptica* foi identificada pelo Prof.º Oscar Benigno (Universidade do Vale do Itajaí) e pelo Prof. André Gasper (Fundação Universidade de Blumenau – FURB). A exsicata foi depositada no herbário Dr.º Roberto Miguel Klein (FURB) sob o número 48795. Os frutos verdes e maduros foram secos em estufa a 40 °C, moídos em multiprocessador (granulometria 2,0 mm) e submetidos ao processo de maceração a frio, durante quatro dias, utilizando como solvente extrator o etanol 98 %.

2.2 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE

Para avaliação do efeito genotóxico do extrato etanólico do fruto maduro e verde da *A. elliptica* foi utilizado o ensaio cometa em condições alcalinas (pH > 13),¹⁰ considerada uma técnica simples e sensível para a análise de danos no DNA em todos os tipos de células.¹¹ Deste modo, para o ensaio de genotoxicidade foi coletado sangue total em EDTA, colocado em contato com os extratos em diferentes concentrações diluídas em solução tampão fosfato (PBS) (2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL e 50µg/mL). Por se tratar de um teste comparativo é necessário à presença simultânea de um controle negativo e outro positivo para os experimentos,¹² como parâmetro de comparação foram utilizados o PBS (controle negativo) e o metil-metanosulfonato – MMS (controle positivo). O MMS [80µM] foi utilizado como substância genotóxica padrão, pois, o controle positivo deve induzir danos de todos os níveis no DNA, causando cometas de classe 1 a 4 em todas as amostras.¹³ Assim, considerando tal princípio, o composto MMS é utilizado como controle positivo, por ser capaz de causar fragmentação cromossômica maciça, quebra de dupla-hélice do DNA, induzir mutações pontuais de substituição de bases e recombinação genética.^{14, 15}

Para a contagem dos cometas foram preparadas duas lâminas e 50 células em cada, a fim de somar 100 células por concentração. As lâminas foram lidas em duplicata, em

microscópio óptico no aumento de 400x. Cada célula, considerada cometa, foi classificada segundo protocolo de DiPaolo,¹⁶ onde atribuindo-se classe 0 à célula intacta, isto é, sem danos ao DNA; classe 1 à célula com dano mínimo; classe 2 à dano moderado; classe 3 à dano intenso e classe 4 à dano máximo, onde todo o DNA encontra-se degradado. Células apoptóticas não foram consideradas na contagem.

Considerou-se para análise estatística os escores gerados por cada lâmina, um índice de dano que corresponde ao total de produtos da multiplicação de cometas *versus* a sua classe, que foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Escore} = (n^{\circ} \text{ de células classe } 0 \times 0) + (n^{\circ} \text{ de células classe } 1 \times 1) + (n^{\circ} \text{ de células classe } 2 \times 2) + (n^{\circ} \text{ de células classe } 3 \times 3) + (n^{\circ} \text{ de células classe } 4 \times 4)$$

Também foi calculada a Porcentagem de Classes de Dano (PCD) e Frequência de Danos. A PCD foi computada como a porcentagem de ocorrência de cada classe no total de cometas contabilizados:

$$\text{PCD} = (n^{\circ} \text{ de determinada classe} \cdot 100) / n^{\circ} \text{ total de cometas}$$

A Frequência de Danos foi calculada como a porcentagem de todos os cometas de classe 1 a 4, em relação ao total de cometas contados.

$$\text{Frequência de Danos} = [(n^{\circ} \text{ total} - n^{\circ} \text{ classe } 0) \cdot 100] / n^{\circ} \text{ total}$$

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para os testes de proteção gênica frente à exposição ao radical AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato] foram utilizados os extratos etanólicos do fruto verde e maduro da *A. elliptica* nas concentrações de 2000 ug/ml, 1000 ug/mL, 500 ug/mL, 250 ug/mL, e 50 ug/mL. O plasmídeo utilizado como modelo foi o pBSK II (400ng/reacção). Como controles foram utilizados o trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) um composto antioxidante lipossolúvel com estrutura semelhante ao α -tocoferol (forma ativa da Vitamina E),^{17, 18} o tampão fosfato (PBS) e o agente estressor AAPH [(40 mM)]. Após o período de incubação as reações com DNA plasmidial foram interrompidas pela adição de tampão de corrida (EDTA 0,25 M, glicerol 50 % e azul de bromofenol 0,01 % - pH 8,0). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) contendo brometo de etídeo (0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 1 h a 90 V em tampão TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM - pH 8,0).¹⁹

O AAPH por ser solúvel em água e sua taxa de geração de radicais livres ser facilmente controlada e medida, tem sido amplamente utilizado como um iniciador de radicais livres para estudos biológicos. A presença desses compostos oxidantes é capaz de provocar rupturas do DNA e modificar a estrutura do plasmídeo pBSK II da forma de superenovelado para uma estrutura circular ou linear, dependendo das quebras ocorridas em fita simples ou dupla do DNA.¹⁷ Assim, este ensaio permite a avaliação da atividade antioxidante do composto em estudo e possível efeito protetor desses extratos frente a possíveis danos causados em DNA de plasmídeo PBSK II pela exposição ao radical AAPH.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados com médias e desvios padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA), unicaudal, sendo que as diferenças significativas entre as amostras foram determinadas pelo teste de *Tukey-Kramer*. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa *Graph Pad Prism* versão 5.0, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO

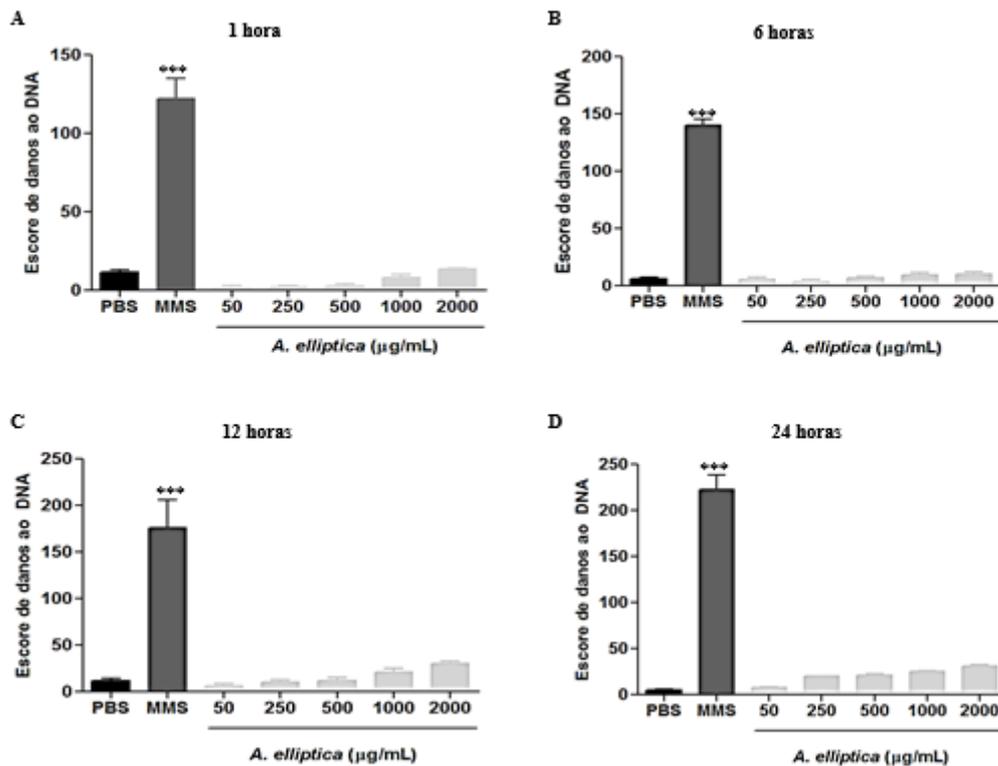
Frequentemente, os organismos vivos são expostos a substâncias mutagênicas, as quais podem causar danos celulares e afetar processos vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, causando alterações cromossômicas, e podendo desencadear processos carcinogênicos e morte celular, por esses danos ocasionados ao material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas.²⁰ Investigações dos tipos de danos que são causados ao DNA e dos processos de reparo que ocorrem, têm fornecido informações valiosas sobre os processos de envelhecimento, genética humana e câncer e ainda, fornece informações sobre a possível toxicidade de compostos.¹⁰

Os dados deste estudo (Figura 1) revelaram que em nenhuma das diferentes concentrações (2000 µg mL, 1000 µg mL, 500 µg mL, 250 µg mL, 50 µg mL) do extrato etanólico do fruto maduro da *A. elliptica* resultaram em aumento significativo de danos ao DNA de leucócitos humanos em relação ao grupo controle negativo (PBS) independentemente do tempo de exposição.

O controle negativo (PBS) e demais concentrações dos extratos do fruto maduro apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,001$) quando comparado com o controle

positivo (MMS), sugerindo que os extratos apresentaram ação protetora contra o dano do DNA.

Figura 1. Escores de dano do extrato etanólico do fruto maduro da *A. elliptica* expostos a diferentes tempos e concentrações.

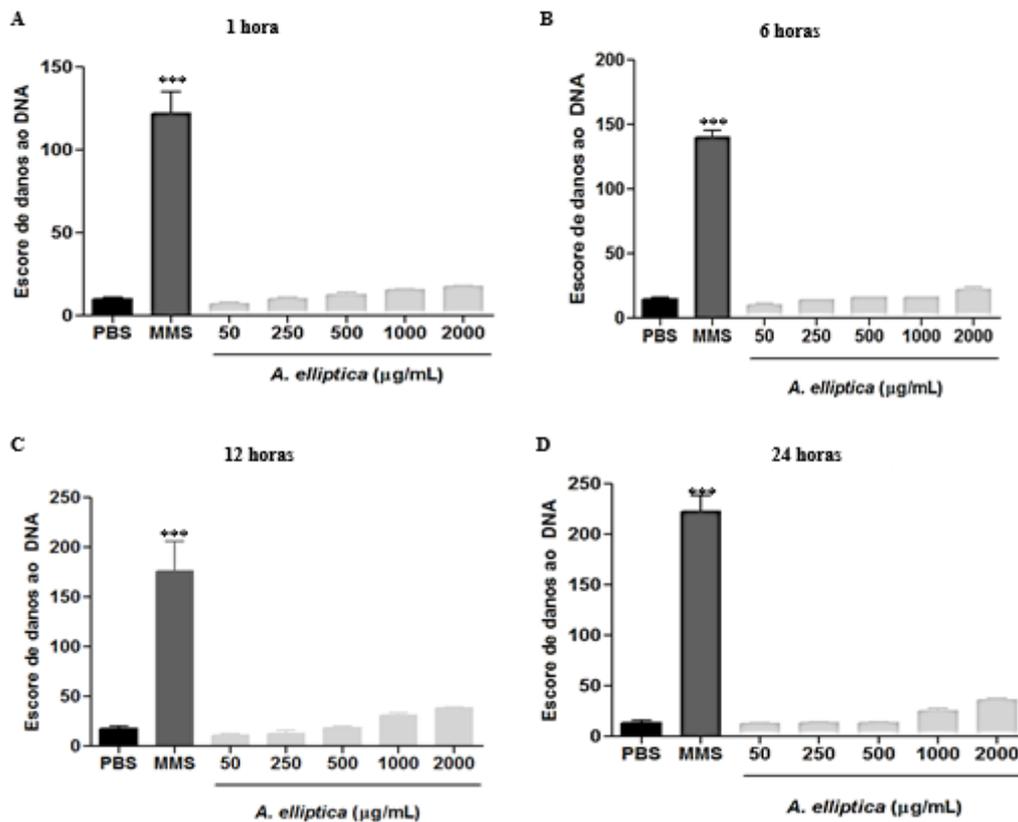


*** Significância após análises de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Embora não tenha apresentado diferenças estatísticas nos distintos tempos de exposição e concentrações, observa-se que todas as concentrações do tempo de 24 horas apresentaram índices de dano superiores ao PBS, porém nos tempos de 6 e 12 horas, os maiores índices de dano observados corresponderam as concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL quando comparados ao controle negativo.

Os resultados do extrato etanólico do fruto verde da *Ardisia elliptica* (Figura 2) apresentaram-se semelhantes ao extrato do fruto maduro. As células expostas ao extrato etanólico do fruto verde em diferentes concentrações (2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL) e tempos de exposição (1 h, 6 h, 12 h, 24 h) não apresentaram diferenças estatísticas significativas, quando comparados ao controle negativo (PBS). Quando comparadas com controle positivo (MMS) foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), entre o controle negativo (PBS) e todas as concentrações e tempos diferentes do extrato do fruto verde

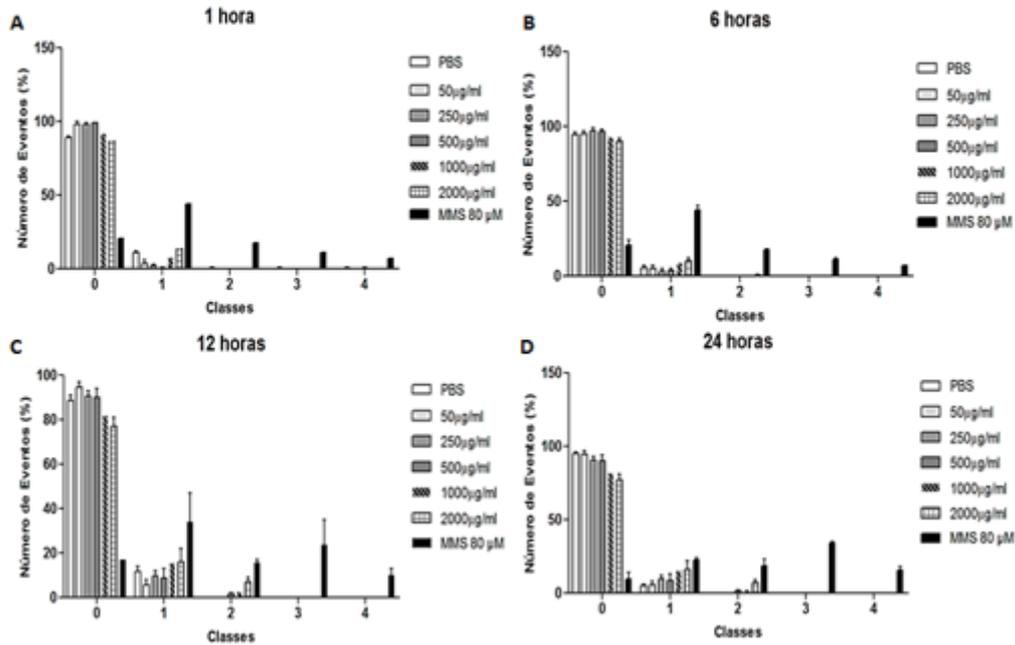
Figura 2. Escores de dano do extrato etanólico do fruto verde da *A. elliptica* expostos a diferentes tempos e concentrações.



*** Significância após análises de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Assim, pode-se sugerir que o dano presente nestas amostras, bem como no PBS, estão relacionados à fatores externos e não ao composto testado. Diferente do extrato maduro, somente as concentrações de 1000 ug/mL e 2000 ug/mL no tempo de 24 horas do extrato verde da *A. elliptica* apresentaram índices de dano superiores quando comparadas com as outras concentrações e ao PBS. Nas Figuras 3 e 4 estão apresentadas as porcentagens de classes de dano do extrato etanólico do fruto maduro e verde da *A. elliptica* nas diferentes concentrações e tempos de exposição.

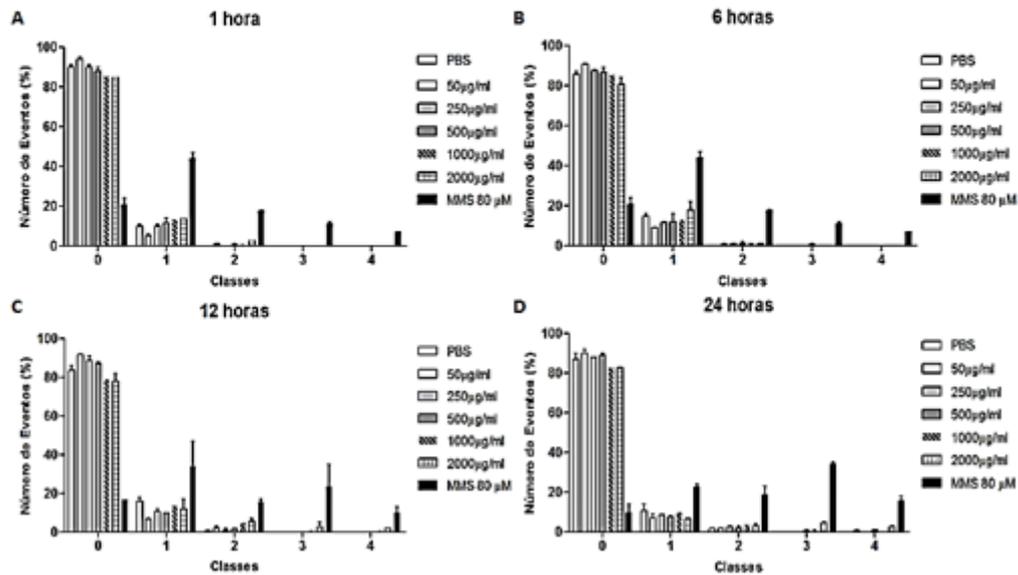
Figura 3. Porcentagem de classe de danos representada pelo número de eventos (%) do extrato etanólico do fruto maduro da *Ardisia elliptica* em diferentes concentrações e tempos de exposição.



Os resultados demonstram que no extrato etanólico do fruto maduro ocorreu predomínio da classe 0, independentemente de concentração e tempo de exposição, não havendo, portanto, na grande maioria, presença de cauda nos nucleóides. Entretanto, observou-se que na concentração de 2000 µg/mL de todos os tempos houve pequeno número de cometas da classe 1 em relação às demais nas concentrações, assemelhando-se ao PBS, e se diferenciando do MMS, o que reforça a baixa toxicidade deste extrato.

No extrato do fruto verde (Figura 4), observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na classe de cometas, prevalecendo também a classe 0, independente do tempo de exposição e concentração. Percebe-se ainda semelhança aos resultados encontrados no extrato do fruto maduro, onde a concentração de 2000 µg/mL em todos os tempos de exposição, apresentaram pequena proporção de cometas da classe 1, quando comparado as demais concentrações, mantendo-se semelhantes ao controle negativo (PBS), e estatisticamente distintos do MMS ($p < 0,001$).

Figura 4. Porcentagem de classe de danos representada pelo número de eventos (%) do extrato etanólico do fruto verde da *Ardisia elliptica* em diferentes concentrações e tempos de exposição.



Ao analisar os números de eventos em cada concentração e diferentes tempos de exposição, no extrato etanólico do fruto maduro e fruto verde da *A. elliptica*, verificou-se o predomínio de células da classe 0, sugerindo que este extrato tem baixa toxicidade ao DNA de leucócitos humanos nas concentrações superiores.

A análise de frequência de dano é um parâmetro importante de avaliação, pois permite conhecer o percentual de cometas danificados em relação ao total de cometas. As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados quanto a avaliação deste parâmetro.

Apesar do aumento da frequência de danos nas diferentes concentrações e tempos de exposição do fruto maduro, não se constatou diferenças significativas ($p > 0,05$) nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h quando comparado com o controle negativo (PBS). Porém, no tempo de exposição de 1 hora as concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL e 50 µg/mL foram estatisticamente diferentes ($p < 0,1$) do controle negativo, o que confirma a baixa toxicidade deste composto, por apresentar percentuais de dano inferior ao controle negativo.

Tabela 1. Frequência de danos do fruto maduro da *Ardisia elliptica* em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Exposição (h)	Percentual dano (%)						
	PBS	MMS	50ug	250ug	500ug	1000ug	2000ug
1	11 ^a	80 ^c	2 ^b	2 ^b	1 ^b	8 ^{a,b}	14 ^a
6	4 ^a	80 ^b	4 ^a	8 ^a	7 ^a	8 ^a	10 ^a
12	9 ^a	83 ^b	10 ^a	14 ^a	18 ^a	21 ^a	23 ^a
24	14 ^a	91 ^b	16 ^a	16 ^a	17 ^a	19 ^a	21 ^a

Letras diferentes na linha indicam diferenças estatísticas entre as concentrações estudadas.

A concentração de 2000 ug/mL apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,01$) em relação as concentrações (500 ug/mL, 250 ug/mL e 50 ug/mL) quando comparadas com o controle negativo. Evidencia-se que à medida que o tempo de exposição aumenta também há um aumento das frequências de danos em todas as concentrações quando comparadas com o controle negativo (PBS). Todas as concentrações e tempos de exposição foram significativamente diferentes ($p < 0,001$) quando comparados ao controle positivo (MMS).

Tabela 2. Frequência de danos do fruto verde da *Ardisia elliptica* em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Exposição (h)	Percentual dano (%)						
	PBS	MMS	50ug	250ug	500ug	1000ug	2000ug
1	10 ^a	80 ^b	6 ^a	10 ^a	12 ^a	15 ^a	16 ^a
6	12 ^a	80 ^b	14 ^a	16 ^a	15 ^a	15 ^a	20 ^a
12	14 ^a	83 ^b	13 ^{a,d}	17 ^{a,c,d}	21 ^{a,c,d}	19 ^{a,c}	20 ^{a,c}
24	11 ^a	91 ^b	11 ^a	15 ^a	17 ^a	17 ^a	18 ^a

Letras diferentes na linha indicam diferenças estatísticas entre as concentrações estudadas.

Diferente dos resultados encontrados no extrato fruto maduro da *A. elliptica*, o extrato do fruto verde apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,01$) entre as concentrações de 1000 ug/mL e 2000 ug/mL quando comparadas com a concentração de 50 ug/mL.

Porém, independentemente do tempo, todas as concentrações apresentaram diferença estatísticas quando comparado com o controle positivo (MMS) ($p < 0,0001$).

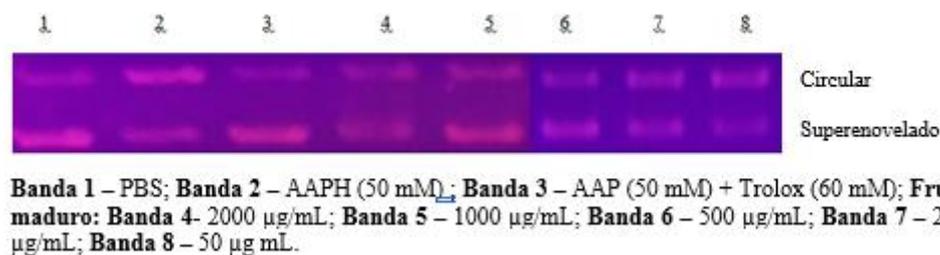
Observa-se resultados semelhantes quando comparado com o fruto maduro, pois independente do tempo há um aumento no percentual de dano, conforme aumento da concentração do extrato (dose dependente), o que pode estar relacionado a compostos que em concentrações mais altas tem certa toxicidade, ainda que considerada muito baixa em todas as concentrações.

3.2 AVALIAÇÃO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para verificar se o extrato possui atividade antioxidante foi induzida a quebra das fitas do DNA com o agente estressor gerador de radicais AAPH, composto solúvel em água, e utilizado em estudos de EROs, devido a sua capacidade oxidante. A conversão da forma superenovelada do plasmídeo para as formas circular ou linear tem sido utilizada como um índice de danos no DNA. A formação da forma circular do DNA é indicativo de quebras de cadeia simples e a formação de um forma linear do DNA é indicativo de quebras de cadeia dupla.²¹

De acordo com a Figura 5 e 6, a banda inferior de cada linha representa a presença do DNA superenovelado e a banda superior representa o DNA plasmidial em formato circular, indicando quebra da fita de DNA plasmidial.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose de pBSK II (4ng/ml) após tratamento com extrato etanólico do fruto maduro da *A. elliptica*.

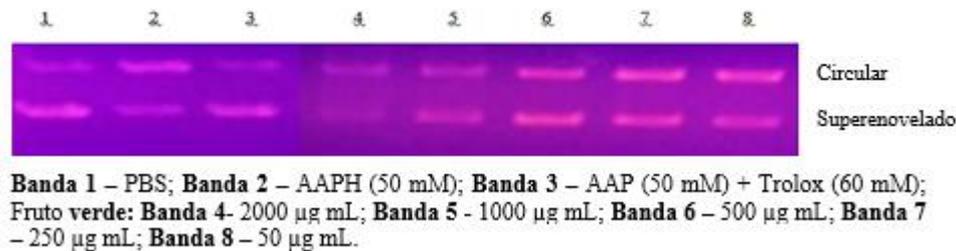


As concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL do extrato etanólico do fruto maduro da *A. elliptica* apresentaram capacidade protetora ao DNA, semelhante ao controle Trolox® (controle positivo). As concentrações de 2000 µg/mL e 50 µg/mL apresentaram diminuição da capacidade protetora ao DNA, com mais expressão de DNA plasmidial em formato circular (quebra de uma fita do DNA), do que superenovelado quando comparado com o controle positivo (AAPH). A concentração superior parece apresentar toxicidade, podendo ter contribuído para a resposta menor de proteção, por outro lado, comparando com as demais concentrações, a concentração de 50 µg/mL, por possuir menor concentração de composto, apresentou menor capacidade protetora frente ao estressor. Não foram observadas as formas lineares do plasmídeo.

O extrato etanólico do fruto verde da *A. elliptica* (Figura 6) apresentou resultados diferentes quanto a proteção do DNA plasmidial quando comparado ao extrato do fruto maduro, apenas a concentração de 1000 µg/mL revelou proteção gênica comparando com o trolox (banda 3), pois resultou em forte inibição da conversão do DNA superenovelado

para a forma circular ou linear. Já as concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL e 50 µg/mL apresentaram menor proteção frente ao estressor.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose de pBSK II (4ng/ml) após tratamento com extrato etanólico do fruto verde da *A. elliptica*.



A concentração de 2000 µg/mL parece ser tóxica ao DNA, pois este se apresenta na forma circular tendendo a forma linear, o que pode confirmar toxicidade nesta concentração. De acordo com o gel de eletroforese em cada faixa, a banda inferior é devido à presença do DNA supercooidal e a banda superior ao DNA circular. Não foi observada a banda linear (quebra da dupla fita de DNA) em nenhum dos experimentos (maduro e verde).

4 DISCUSSÃO

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única (SCGE) é uma técnica eficiente e amplamente utilizada para quantificar e analisar lesões no DNA, detectando efeitos do reparo em células individualizadas de mamíferos.²² Várias pesquisas demonstram que este modelo possui capacidade de prever agentes mutagênicos e carcinogênicos que afetam as células vivas, confirmando papel positivo na detecção de genotoxicidade para avaliação de risco.^{23, 24, 25} Estudos realizados por Matsumoto et al.,²⁶ e Ventura et al.,²⁷ mostraram sensibilidade do ensaio cometa na detecção de danos em células simples, o que confirma a eficiência deste teste em avaliações de genotoxicidade e antigenotoxicidade de vários agentes.

No presente estudo, o ensaio cometa revelou que os danos ao DNA causados pelas diferentes concentrações dos extratos etanólicos do fruto maduro e verde não variaram entre si. O efeito genotóxico do extrato do fruto maduro no sangue periférico nas concentrações 500 µg/mL, 250 µg/mL e 50 µg/mL nos tempos de 6, 12 e 24 horas foram menores que o causado pelo controle negativo (PBS). Por outro lado, no fruto verde apenas nas concentrações de 250 µg/mL e 50 µg/mL observou-se efeito genotóxico menor que o controle, nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Independente do extrato, os resultados

sugerem importante efeito antigenotóxico desta planta em respostas a diferentes concentrações e tempos de exposição. Resultados similares foram encontrados por Mendonça et al.,²⁸ que encontraram efeito genotóxico menor da planta em estudo quando comparado com o controle negativo, que muitas vezes foi superior aos extratos estudados. A efetividade da aplicação da técnica do ensaio cometa para verificação de genotoxicidade pode ser confirmada em inúmeros estudos, como Sulczewski et al.,²⁹ **que encontraram toxicidade nas concentrações 300 e 500 µg/mL do extrato aquoso de *Adiantum lorentzii* (Pteridaceae) em linfócitos humanos**; Papke et al.,³⁰ investigaram as atividades genotóxicas e antigenotóxicas do extrato etanólico dos frutos de *Morinda citrifolia*, *in vivo*, utilizando o teste cometa em sangue periférico, e constataram efeito protetor contra danos oxidativos através do teste cometa *ex vivo*; Maistro et al.,³¹ demonstraram por meio de ensaio cometa que o extrato etanólico da *Casearia sylvestris* nas concentrações de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL e 500 µg/mL não apresentaram potencial genotóxico. Por fim, corroborando com a autenticidade do método, Santin et al.,³² ao avaliarem a genotoxicidade do extrato etanólico das folhas de *Piper aduncum* em células de medula óssea de ratos constataram baixa toxicidade do extrato.

Considerando que nos últimos anos, as plantas têm atraído grande interesse científico por se tratar de uma alternativa na medicina complementar e na produção de fármacos e fitoterápicos,³³ as espécies vegetais têm sido amplamente investigadas pelo seu potencial antioxidante.³⁴ Assim, pode-se inferir que os estudos toxicológicos *in vitro* além de diminuir custos, obtêm respostas rápidas, permite reduzir erros, limita o número de variáveis experimentais e otimiza os ensaios pré-clínicos.^{35, 36} Deste modo, este teste apresenta metodologia positiva sobre os testes bioquímicos e cito-genéticos, podendo utilizar pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão.³⁷

Os polifenóis têm sido bem estudados como excelentes antioxidantes e bons neutralizadores de radicais livres. Estes compostos poderiam interagir diretamente com os radicais do DNA e repará-lo pelo mecanismo de transferência de elétrons.³⁸ Conforme pesquisas, é possível confirmar a atividade antioxidante do gênero *Ardisia* em relação a processos inflamatórios,³⁹⁻⁴² em lipoproteínas de baixa densidade;⁴³ na propriedade anticoagulante;⁴⁴ em adenocarcinoma de mama humano;⁴⁵ e na inibição atividade bacteriana.^{46, 47}

Assim, os resultados revelaram que esta planta apresenta baixo efeito genotóxico e, nas concentrações entre 1000 ug/mL e 500 ug/mL podem atuar como agente antioxidante, reduzindo os danos ao DNA. A oxidação causada por alguns agentes

estressores presentes no ambiente são capazes de provocar diversas patologias, entre elas o câncer, visto que a maior causa de danos nas células é a redução de elétrons que, em excesso, causam efeitos deletérios ao DNA. A descoberta dos efeitos maléficos das espécies reativas de oxigênio (EROS) impulsionou a descoberta de substâncias capazes de minimizar esses efeitos em células vivas.⁴⁸ Portanto, é indiscutível a busca de novos compostos que possam atuar como agentes antioxidantes neste processo celular contínuo.

Com isso, o ensaio cometa realizado com os extratos etanólicos do fruto verde e maduro da *A. elliptica* demonstraram baixo potencial genotóxico, devido aos baixos Índices de Dano (ID) e de Frequência de Dano (FD), quando comparado ao seu controle positivo; bem como seu potencial antioxidante, o que permite estender sua aplicação em outras pesquisas que possam confirmar e ampliar a utilização desta planta como um alimento ou fitoterápico na prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas não transmissíveis.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É indiscutível a importância da avaliação da toxicidade dos compostos presentes nas plantas, visando reduzir os possíveis efeitos tóxicos, principalmente quando utilizadas por períodos prolongados. Os extratos etanólicos dos frutos verde e maduro da *A. elliptica* apresentaram baixo potencial genotóxico e resultados promissores em relação a sua proteção quando comparados a um antioxidante sintético. Levando em consideração a falta de pesquisas sobre o potencial genotóxico *in vivo* desta planta, torna-se indispensável mais estudos para complementar a avaliação de segurança, a fim de conhecer melhor seus potenciais farmacológicos antes de ser considerada uma planta de aplicação terapêutica.

REFERÊNCIAS

- Abranches, M. V. *Plantas Medicinais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição*. Sistemas Ebook: Viçosa, 2009.
- Turolla, M. S. R.; Nascimento, E. S.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2006**, *42*, 289.
- Iserhard, A.R.M.; Budó, M.L.D; Neves, E.T.; Badke, M.R.; *Rev. Bras. Enferm.* **2009**, *13*, 22
- LorenzI, H.; Matos, F.J.A.; *Instituto Plantarum.* **2002**, 396

- Vieira, A.; Guimarães, M.A.; David, G.Q.; Karsburg, I.V.; Campos, A.R.; *Rev. Trop. Ciênc. Agr.Biol.* **2009**, *3*, 8.
- Al-Mekhlafi, N. A.; Shaari, K.; Abas, F.; Kneer, R.; Jeyaraj, E.J.; Stanslas, J.; *Phytochem.* **2012**, *80*, 42.
- Lim, T. K. *Ardisia Elliptica. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Fruits*, Nova Iorque: Springer Nature, 2012.
- Franco, M.F.; Narasimhan, D.; *Indian J. Tradit. Knowl.* **2009**, *8*, 645.
- Kobayashi, H.; Mejia, E.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 347.
- Singh, N.; McCoy, M.; Ticer, R.; Schneider, E.; *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184.
- Cemeli, E.; Baumgartner, A.; Anderson, D.; *Mutat. Res.* **2008**, *681*, 5.
- Ribeiro, L. R.; Marques, E. K. *Rev. Inic. Cient. Ulbra*, **2003**, 21.
- Vasquez, M. Z.; Frotschl, R.; *Genet. Toxicol. Test.* **2016**, 345.
- Horváthová. E.; Slameňová, D.; Hlinčíková. L.; Mandal, T. K.; Gábelová, A.; Collins, A.R.; *Mutat. Res.* **1998**, *409*, 3.
- Lundin, C.; North, M.; Erixon, K.; Walters, K.; Jenssen, D.; Goldman, A.S.; Helleday, T.; *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3799.
- DiPaolo, C. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006
- Wei, Q.; Zhou, B.; Cai, Y.J.; Yang, L.; Liu, Z.L.; *Food Chem.* **2006**, *96*, 90.
- Zakharova, O.D.; Frolova, T.S.; Yushkova, Y.V.; Chernyak, E.I.; Pokrovsky A.G.; Pokrovsky, M.A.; Morozov, S.V.; Sinitsina, O.I.; Grigor'ev, I.A.; Nevinsky, G.A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 127.
- Freifelder, D.; Trumbo, B.; *Biopolymers.* **1969**, *7*, 627.
- Costa, R. M.A.; Menk, C.F.M.; *Biotechnol: Cienc. Desenv.* **2000**, *3*, 24.
- Andrade, V. M.; Freitas, T. R.O.; Silva, J.; *Mutat. Res.* **2004**, *560*, 57.
- Silva, R. M; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2016.
- Recio, L.; Hobbs, C.; Caspary; Witt, K.L.; *J. Toxicol. Sci.* **2010**, *35*, 149.
- Rothfuss, A.; Honma, M.; Czich, A.; Aardema, M.J.; Burlinson, B., Galloway, S.; *Mutat. Res.* (2011), doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.12.005.
- Kimura, A.; Miyata, A.; Honma, M.A.; *Mutagenesis*, **2013**, *28*, 583.
- Matsumoto, S.T.; Mantovani, M.S.; Malagutti, M.; Dias, A.; Fonseca, I.; Marin-Morales, M.A. *Genet. Mol. Biol.*, **2006**, *29*, 148.
- Ventura, B.C.; Angelis, D.F.; Marin-Morales, M.A.; *Pestic. Biochem. Physiol.* **2008**, *90*, 42.

- Mendonça, E.D; Silva, J.; Santos, M.S.; Carvalhoo, P.; Ortmann, C.F.; Picada, J.N.; Reginatto, F.H.; Ferraz, A.B.F.; *J. Ethnopharmacol.*, **2016**, *193*, 214
- Sulczewski, F. B.; Machado, A. K.; Cruz, I. B. M.; Pigatto, A. G. S.; Sagrillo, M. R.; Krause, L. M. F.; *Discipl. Scient.*, **2014**, *15*, 11.
- Papke, D. K. M.; Santos, F.S.; Pires, T. R.; Gonçalves, G. C.; Ferraz, A.G.; Moraes, G.P.; Ferraz, A. B.F.; Grivicich, I.; Picada, J. N.; *Rev. Inic. Cient. Ulbra*, **2016**, *14*, 19.
- Maistro, E.L;Carvalho, J.; Mantovani, M.S.; *Toxicol. in vitro*. **2004**, *18*, 42.
- Santin, J. R.; **Silveira, A.; Muller, E.; Claudino, V.; Cruz, A. B.; Burguer, C.; Freitas, R. A.; Malheiros, A.**; *J. Med. Plants Res*. **2011**, *5*, 4475.
- Zajmi, A; Hashim, N.M.; Noordin, M.I.; Khalifa, S.A.; Ramili, F.; Ali, H.M.; *PLoS One* (2015), doi: 10.1371/journal.pone.0128157.
- Madaleno, I. M.; *Pharmacogn. Commun.* **2015**, *5*, 29.
- Hartung, T.; Daston, G.; *Toxicol. Sci.*, **2009**, *111*, 233.
- Bednarczuk, V.O.; Verdam, M. C. S.; Miguel, M. D.; Miguel, O.G.; *Visao Acad.*, **2010**, *11*, 43.
- Silva, J.; *Genet. escola*. **2007**, *2*, 30.
- Anderson, R.F.; Fisher, L.J.; Hara, Y.; Harris, T.; Mark, W.B.; Melton, L.D.; *Carcinogenesis*. **2001**, *22*, 1189.
- Aragão, G. F.; Carneiro, L. M. V.; Junior, A. P. F.; Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Viana, G. S. D.; *Pharm. Biol.*, **2007**, *45*, 343.
- Melo, C.M.; Carvalho, K. M.M.B.; Neves J.C.S.; Morais, T.C.; Rao, V.S.; Santos, L. A.; Brito, G. A. C.; Chaves, M. H.; *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 4272.
- Oliveira, F. A.; Vieira-Junior, G. M.; Chaves M. H.; Almeida, F. R. C.; Santos, K. A.; Martins, F. S., Silvia; R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.; *J. Plant. Med.*, **2004**, *70*, 780.
- Navarrete, A.; Trejo-Miranda, J. L.; Reyes-Trejo, L.; *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 383.
- Andrikopoulos, N. K.; Kaliora, A. C.; Assimopoulou, A. N.; Papapeorgiou, V. P.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 501.
- Jianhong, C.; *Tese de Doutorado*, National University Of Singapore, Cingapura, 2012.
- Moongkamdi, P.; Kosem, N.; Luanratana, O. Jongsomboonkusol, S.; Pogpan, N.; *Fitoterapia*, **2004**, *75*, 375.
- Phadunkit, M.; Luanratana, O.; *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 693.
- Nor, Z. M.; Al-Abd, N. M.; Mansor, M.; Zajmi, A.; Hasan, M.S.; Azhar. F.; Kassim, M.; *J. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 569.

Alves, C. Q.; David J. M.; David, J. P.; Bahia, V.; Aguiar, R. M. *Quim. Nova.* 2010