



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

Marina Letícia do Carmo Caxito

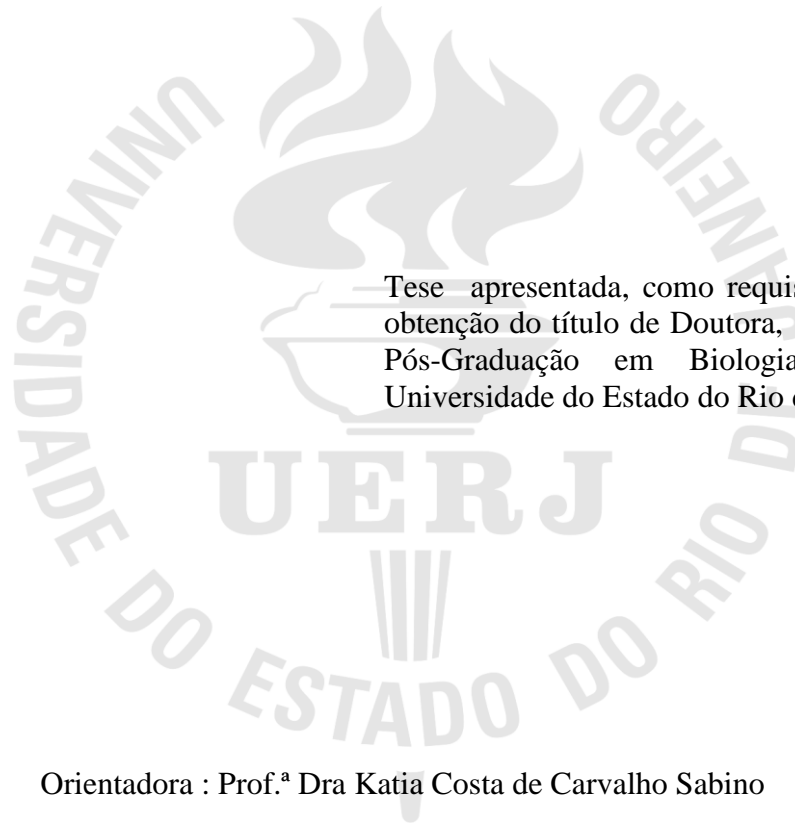
Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott

Rio de Janeiro

2016

Marina Letícia do Carmo Caxito

**Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de
Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott**



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

Orientadora : Prof.^a Dra Katia Costa de Carvalho Sabino

Rio de Janeiro

2016

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

C384

Caxito, Marina Letícia do Carmo.

Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott / Marina Letícia do Carmo Caxito.- 2016. 203f.

Orientadora: Katia Costa de Carvalho Sabino
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Taioba - Uso terapêutico - Teses. 3. Leucemia - Tratamento- Teses. I. Sabino, Katia Costa de Carvalho. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 633.88

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

Assinatura

Data

Marina Letícia do Carmo Caxito

**Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de
Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott**

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

Aprovada em (25 de fevereiro de 2016)

Orientadora:

Prof.^a Dra. Katia Costa de Carvalho Sabino
Instituto de Biologia Paulo Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Paulo Alcantara Gomes - UERJ

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

Prof. Dr. Eduardo Salustiano Jesus dos Santos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Cristiane Pimentel Victório
Universidade Estadual da Zona Oeste

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Paulo Alcantara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Alves Reis
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao
meu marido João
Paulo.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus e também à nossa Senhora. Lembro-me de uma pequena oração que me acompanhou durante o doutorado: “Inspirai ó senhor minhas ações e ajudai-me a realizá-las para que em vós comece e para que e vós termine tudo aquilo que eu fizer”. Em Deus comecei e agora termino agradecendo imensamente a ele por todas as bênçãos e graças que recebi. Tenho certeza que Deus cuidou de cada passo e agiu colocando muitas pessoas especiais em meu caminho.

Aos meus pais amados, Caxito e Rosânia, por tanto amor e ajuda de sempre. Por compreenderem minhas ausências e pelas incontáveis marmitinhas e incentivos. Que Deus os recompense, pois foi herança deles tudo o que conquistei. Agradeço também ao meu irmão por estar sempre ao meu lado torcendo por mim.

Ao meu avô Moacyr (*in memorian*), por todo amor e à minha vó Marina (*in memorian*), que carinhosamente me abraçava e orava muito para minha realização e conclusão do doutorado. Infelizmente a perdi durante este tempo, mas a trago comigo, que como uma mãe, será eterna em meu coração.

Ao meu amado João Paulo, presente de Deus, meu marido incentivador, patrocinador, amigo e companheiro de todas as horas. Não consigo imaginar esta caminhada sem ele. Aos nossos filhotes: Juquinha e John que não lerão esta mensagem, mas que com amor me ajudam a relaxar e a ter momentos de grande felicidade.

À minha família, aos compadres e aos amigos da igreja, pela amizade e orações, à Ângela, Gleide, Maria e em especial às minhas amigas Simone e Christiane, que sempre estiveram ao meu lado e que são também da família.

Agradeço também com carinho às minhas amigas Jéssica, Mônica, Michelle e Anete, que além de incentivadoras me ajudaram em muitos momentos na tese e hoje estão presentes em minha vida e me minhas orações.

À minha orientadora Katia, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, por ter acreditado neste projeto, e por todos os ensinamentos e puxões de orelha dados com carinho. Aprendi muito com você. Agradeço por sua grande dedicação e amizade durante o desenvolvimento desta tese. Antes de iniciar o doutorado orei muito a Deus para que encontrasse uma orientadora especial e sem dúvida, hoje vejo que ele fez a melhor escolha para mim. Obrigada.

À professora Marsen, pela sua acolhida de mãe no laboratório e super dedicação. Sempre pronta a ajudar e a ensinar muito a cada um de nós. Agradeço também pela revisão da tese e por suas importantes colaborações no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada por ser tão querida. Agradeço também à Professora Graça pela ajuda nas análises e experimentos de citometria. Por ser amiga, colaboradora e por todas as importantes dicas, tanto pessoais como profissionais.

À professora Cassia, que deu o pontapé inicial comigo coletando a taioba em Friburgo, preparando a exsicata e dando muito incentivo para o estudo. Mesmo com minhas ausências e correrias sempre esteve pronta a ajudar. Muito obrigada.

Ao professor Ricardo Kuster, que desde o início de minha caminhada na pesquisa sempre esteve presente ajudando e acreditando. Obrigada por ser este professor amigo e colaborador e pela colaboração nos estudos fitoquímicos.

Ao professor Andre Luiz Mencialha, pela colaboração nos experimentos de Biologia molecular, e à Isis e Juliana, pelo desenho de primers e ajuda. À professora Ivana e à doutoranda Isabel, do laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos (LaProNEB-UFRJ) pela ajuda nas análises fitoquímicas.

À toda a Equipe técnica do laboratório: Beto, Paulinho e Shirley, que com profissionalismo e carinho, são nossos anjos, ajudando a caminhada de cada projeto de pesquisa. São muito queridos. Agradeço também ao Gustavo e ao Orlando, e também aos outros técnicos que em experimentos fora do laboratório também me ajudaram.

A todos os membros do laboratório LIA-BPPN e aos amigos: Girlaine, Mariana, Nathália, Márcio, Thayane, Velozo, Gabi, Débora, Jéssica e Francis. Em especial à equipe dos “Katitos” Fernanda, Thiago e Rachell. Foi uma parceria maravilhosa e foram muitas ajudinhas. Com vcs o trabalho no laboratório foi bem mais leve e feliz. Fefê e Thiago vcs foram demais. Nunca esquecerei. Agradeço também à auxiliar de limpeza, dona Luci, pelo carinho e alegria de sempre.

À equipe da secretaria do programa de Pós graduação em Biologia Vegetal (PGBV) e em especial à secretária Vera, que durante este tempo foi muito querida e atenciosa. Sempre ajudando, e com muita calma conseguia me tranquilizar. Valeu mesmo.

À equipe da E.M. Bolívar pela acolhida e por entenderem toda a minha correria. Obrigada pela torcida e carinho.

À Faperj pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que me ajudaram de alguma forma para minha formação pessoal e profissional.

Tudo posso naquele que me fortalece

Paulo- 60-64 d.c. (Filipenses 4:13)

RESUMO

CAXITO, M. L. C. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. 2016. 224 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016.

A incidência crescente de doenças crônicas e câncer encontra-se relacionada com a má alimentação, além do alto nível de estresse, sedentarismo e envelhecimento. Neste sentido, os alimentos funcionais e nutracêuticos podem contribuir para a melhoria da qualidade e expectativa de vida. No Brasil, a espécie *Xanthosoma sagittifolium* (taioba), apresenta importante qualidade nutricional, porém é ainda subutilizada. O objetivo deste trabalho foi estudar a ação antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora *in vitro* do extrato hidroetanólico de folhas de *Xanthosoma sagittifolium* (EFXs) e suas frações, e a fitoquímica das amostras mais ativas. A ação antioxidante foi avaliada por ensaios colorimétricos e detecção de EROs pela sonda DCFH. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do MTT sobre linhagens celulares leucêmicas (K562 e Jurkat), de tumores sólidos (MCF-7, A549, PC-3), e células não tumorais (macrófagos RAW 264.7, fibroblastos NIH-3T3 e esplenócitos murinos). Também foram avaliados a apoptose (anexina-V-FITC), o ciclo celular (iodeto de propídio) e a produção de óxido nítrico (reação de Griess), além das subpopulações de linfócitos (anticorpos específicos fluorescentes) e expressão da proteína p21 (citometria de fluxo). Os níveis de mRNA de Bax e Ciclina A foram analisados por qPCR. O EFXs e suas frações hexânica (FHex), diclorometânica (FDCM), acetato de etila (FACeT) e aquosa (FAq) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e/ou espectrometria de massas com ionização por electrospray. O EFXs e a FACeT apresentaram alta neutralização do DPPH (63,8% e 70,5%, respectivamente, a 1 mg/mL), enquanto o EFXs, FACeT e a FAq reduziram a peroxidação lipídica (55,8%, 61,7% e 57,2%, respectivamente) e todas as amostras foram capazes de quelar íons ferrosos (>90%, a 1 mg/mL). Somente o EFXs reduziu os níveis intracelulares de EROs em células RAW 264.7 (77,8%, a 50 µg/mL), sem causar citotoxicidade. O EFXs (IC₅₀ = 95,46 µg/mL) e a FHex (IC₅₀ = 118 µg/mL) mostraram baixa atividade, sendo este efeito aumentado na FDCM (IC₅₀ = 63,1 µg/mL). Tanto o EFXs quanto a FDCM inibiram a proliferação de células Jurkat, reduzindo as células nas fases S e G₂/M, e aumentando em Sub-G₁ (85,9% e 56%, respectivamente), indicando associação com morte celular. Tais efeitos foram observados tanto na presença de redução do mRNA de ciclina A (FHex e Acido palmítico-AP) quanto aumento (FDCM). No entanto, a expressão de p21 foi aumentada pelo EFXs, FHex e FDCM em aproximadamente cinco vezes, além do AP, o que pode estar relacionado à indução de apoptose (aumento de células Anexina-V⁺). O nível de mRNA de Bax não foi alterado pelo tratamento com EFXs, FHex ou AP, e foi reduzido pela FDCM. O EFXs, FHex e FDCM inibiram a produção de NO (26,5%, 40,8% e 43,5%, respectivamente), TNF-α (40%, 22,5% e 26,4%, respectivamente), IL-10 (27,5%, 34,9% e 58,4%, respectivamente) e IL-1β (51,8%, 57,4% e 42,5%, respectivamente) por macrófagos RAW 264.7. Adicionalmente, o EFXs aumentou o percentual de linfócitos T CD8⁺ totais (46%) e de T CD8⁺CD69⁺ (ativos) (48%). O EFXs, FACeT e FAq apresentaram diglicosídeos de apigenina (flavona) como compostos majoritários, enquanto nas frações apolares o ácido palmítico foi majoritário, os quais devem estar contribuindo para os efeitos observados. O EFXs e suas frações não apresentaram toxicidade *in vitro* para células não tumorais. As folhas de taioba podem ser consideradas importantes fontes de compostos com ação imunomoduladora, antioxidante e antileucêmica, potencialmente benéficos para a manutenção da saúde e prevenção de doenças.

Palavras-chave: *Xanthosoma sagittifolium*. Antioxidante. Leucemia. Jurkat. IL-1. TNF-α

ABSTRACT

CAXITO, M. L. C. Phytochemical evaluation and anti antioxidant, anti leukemic and immunomodulatory activities of *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. 2016. 224f. (Plant Biology) - Roberto Alcantara Gomes Biology Institute, Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, 2016.

The increasing incidence of chronic diseases and cancer has been related to poor diet, high level of stress, sedentary lifestyle and aging. In this sense, functional foods and nutraceuticals have been improving health quality and life expectancy. In Brazil, the *Xanthosoma sagittifolium* species, known as taioba, presents many nutrients, however it is not widely used. The aim of this work was to study the antioxidant, antileukemic and/or immunomodulators *in vitro* effects of the hydroethanolic extract of *Xanthosoma sagittifolium* leaves (HEXs-L) and fractions, and the phytochemical aspects of active samples. The antioxidant action was measured by colorimetric methods and ROS detection by fluorescent probe DCFH-DA. Cytotoxicity was assessed by MTT assay on leukemic cell lines (K562 and Jurkat), solid tumors (MCF-7, A549, PC3) and non-tumor cells (macrophage line RAW 264.7, NIH-3T3 fibroblasts and murine splenocytes). The apoptosis (annexin V staining), cell cycle (propide iodide staining) and nitric oxide production (Griess reaction) were also evaluated, as well as lymphocytes subpopulation (specific fluorescent antibodies) and p21 protein expression, by flow cytometry. The mRNA levels of Bax and cyclin A were analyzed by qPCR. The HEXs-L and its hexanic (HexF), diclorometanic (DCMF), ethyl acetate (EtAcF) and aqueous (AqF) fractions were analyzed by high-performance liquid chromatography, gas chromatography mass spectrometry and/or electrospray ionization/mass spectrometry. The HEXs-L and AcETF showed high DPPH neutralization (63.8% and 70.5%, respectively, at 1 mg/mL), while the HEXs-L, EtAcF and AqF reduced lipid peroxidation (55.8%, 61.8% and 57.2%, respectively) and all samples were able to chelate ferrous ions (>90% at 1 mg/ml). Only HEXs-L reduced intracellular ROS levels in RAW 264.7 cells (77.8%, 50 µg/ml) without causing cytotoxicity. The HEXs-L (IC₅₀ = 95.5 µg/mL) and HexF (IC₅₀ = 118 µg/mL) showed low activity, and higher with DCMF (IC₅₀=63.1 µg/mL). Both HEXs-L and DCMF inhibited Jurkat cell proliferation, reducing cells in S and G₂/M phases, and increasing in sub-G₁ (85.9% and 56%, respectively), indicating cell death association. These effects occurred with both reduced cyclin A mRNA level (FHex and palmitic acid) or increased one (DCMF). Otherwise, the p21 protein expression was increased approximately five fold after incubation with HEXs-L, HexF and DCMF, beyond AP, which may be related to apoptosis induction (increased Annexin-V⁺ cells). The mRNA level of Bax was not changed by treatment with HEXs-L, HexF or AP, and it was reduced by DCMF. HEXs-L, HexF and DCMF inhibited NO production (26.5%, 40.8% and 43.5%, respectively), TNF-α (40%, 22.5% and 26.4%, respectively), IL-10 (27.5%, 34.9% and 58.4%, respectively) and IL-1β (51.8%, 57.4% and 42.5%, respectively) by macrophages RAW 264.7. In addition, the EFXs increase both the percentage of total T CD8⁺ (46%) and T CD8⁺CD69⁺ (active) (48%) lymphocytes. The HEXs-L, EtAcF and AqF showed diglucoside apigenin (flavone) as major compounds, while HexF and DCMF showed palmitic acid, which must be contributing to the observed effects. Highlighting, neither HEXs-L nor their fractions were toxic to non-tumor cells. Taioba leaves can be considered an important source of compounds with immunomodulatory, antioxidant and antileukemia action, potentially beneficial to health maintenance and disease prevention.

Keywords : Araceae. Nutraceutico. Taioba. Jurkat. IL-1. TNF-α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição geográfica da família Araceae.....	26
Figura 2-	Espécies comestíveis da família Araceae.....	27
Figura 3-	Espécies tóxicas da família Araceae.....	28
Figura 4-	Ácidos graxos presentes na família Araceae.....	29
Figura 5-	Folhas e flor de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> Schott.....	30
Figura 6-	Folhas de taioba comum (<i>X. Sagittifolium</i>) e taioba brava (<i>Colocasia antiquorum</i>).....	33
Figura 7-	Função do estresse oxidativo no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e câncer.....	36
Figura 8-	Efeitos protetores das substâncias bioativas dos vegetais.....	38
Figura 9-	Ação do sistema imune na eliminação das células tumorais.....	42
Figura 10-	Núcleo básico do flavonóide e algumas de suas sub-classes.....	47
Figura 11-	Reação entre o DPPH. e um antioxidante para formar DPPH.....	50
Figura 12-	Formação do complexo Fe II- Ferrozina vermelho.....	52
Figura 13-	Determinação de espécies reativas de oxigênio pela sonda DCFH-DA.	53
Figura 14-	Reação de Malonaldeído (MA) com ácido tiobarbitúrico (TBA).....	54
Figura 15-	Oxidação de compostos fenólicos e formação dos complexos molibdênio-tungstênio azuis.....	56
Figura 16-	Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.....	57
Figura 17-	Esquema de fracionamento do extrato hidroetanólico 70% de <i>X. sagittifolium</i>	60
Figura 18-	Atividade antioxidante do EFXs e frações pelo ensaio do DPPH.....	61
Figura 19-	Capacidade quelante de ferro (CQFe) do extrato hidroetanólico de folhas de <i>X. Sagittifolium</i> (EFXs) e suas frações.....	62
Figura 20-	Efeito do EFXs e FAq nos níveis de ROS em células RAW 264.7.....	63

Figura 21-	Efeito de amostras de <i>X. sagittifolium</i> na peroxidação lipídica de células RAW 264.7, pelo ensaio de TBARS.....	64
Figura 22-	Quantificação de substâncias fenólicas totais no extrato hidroetanólico de folhas de <i>X. sagittifolium</i> e suas frações.....	65
Figura 23-	Comparação do teor de flavonoides no extrato hidroetanólico de folhas de <i>X. sagittifolium</i> e suas frações com a quercetina,	66
Figura 24-	Espectros de massas do extrato bruto de <i>X. sagittifolium</i> com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	67
Figura 25-	Perfil cromatográfico do extrato de folhas de <i>X. Sagittifolium</i> , por HPLC-DAD.....	69
Figura 26-	Perfil cromatográfico da fração acetato de etila do EFXs, por HPLC-DAD.....	69
Figura 27-	Perfil cromatográfico da fração aquosa do EFXs, por HPLC-DAD.....	70
Figura 28-	Esquema do ciclo celular e a atuação de CDKs, ciclinas e inibidores.....	78
Figura 29-	Via intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose.....	81
Figura 30-	Diferentes estágios da carcinogênese.....	83
Figura 31-	Mecanismo da formação de cristais de formazan.....	93
Figura 32-	Representação esquemática da externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática.....	95
Figura 33-	Efeito citotóxico dos extratos de rizoma e de folhas de <i>X. sagittifolium</i> em linhagens celulares leucêmicas.....	101
Figura 34-	Efeito citotóxico de diferentes concentrações do ERXs e do EFXs em linhagens celulares leucêmicas.	102
Figura 35-	Efeito citotóxico do EFXs e suas frações em leucemia linfocítica Jurkat.....	103
Figura 36-	Efeito da concentração das frações apolares do EFXs na citotoxicidade sobre linhagens celulares leucêmicas.....	104
Figura 37-	Efeito da concentração do EFXs, FHex e FDCM na citotoxicidade sobre linhagens celulares de tumores sólidos.....	105
Figura 38-	Efeito do EFXs na proliferação das células leucêmicas Jurkat.....	106
Figura 39-	Efeito do EFXs e suas frações apolares sobre a viabilidade celular.....	107
Figura 40-	Efeito do EFXs sobre o ciclo celular da linhagem celular Jurkat.....	108

Figura 41-	Comparação do efeito do EFXs com o das frações apolares sobre o ciclo celular da linhagem celular Jurkat.....	108
Figura 42-	Efeito do EFXs na apoptose de células Jurkat, por marcação com Anexina V-FITC-PI.....	110
Figura 43-	Efeito do EFXs e frações na apoptose de células Jurkat, por marcação com Anexina.....	111
Figura 44-	Cromatograma da fração hexânica do EFXs, obtido por CG-EM.....	112
Figura 45-	Espectro de massas referente ao pico de Tempo de retenção (TR) de 16.77 min e área relativa de 26,53%, do cromatograma da fração hexânica de EFXs por CG-EM.....	113
Figura 46-	Cromatograma da FDCM, obtido por CG-EM.....	114
Figura 47-	Espectro de massas referentes aos picos majoritários do Cromatograma da FDCM por CG-EM.....	115
Figura 48-	Efeito citotóxico do palmitato de etila (A) e ácido palmítico (B) em linhagem leucêmica Jurkat.....	116
Figura 49-	Efeito citotóxico do EFXs, frações, ácido palmítico e palmitato de etila em linhagem celular não tumoral (fibroblastos NIH-373.....	117
Figura 50-	Efeito do EFXs, frações diclorometânica (FDCM), hexânica (FHex) e ácido palmítico (AP) na expressão do mRNA da ciclina A em células Jurkat, PCR em tempo real.....	118
Figura 51-	Efeito do EFXs, frações apolares, ácido palmítico e palmitato de etila na expressão da proteína p21, por citometria de fluxo.....	119
Figura 52-	Efeito do EFXs, frações apolares e ácido palmítico na expressão do mRNA da proteína pró-apoptótica Bax em células Jurkat, PCR em tempo real.....	120
Figura 53-	Mecanismos de ativação de macrófagos.....	135
Figura 54-	Doenças cujos desenvolvimentos encontram-se relacionados à inflamação crônica.....	137
Figura 55-	Diferentes faces da inflamação e seu envolvimento na tumorigênese....	138
Figura 56-	Representação química da reação de Griess.....	141
Figura 57-	Figura esquemática do imunoenensaio enzimático.....	145
Figura 58-	Efeito do extrato hidroetanólico de Xanthosoma sagittifolium (EFXs) e suas frações sobre linhagem macrofágica RAW 264.7.....	147

Figura 59-	Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (EFXs) sobre a linhagem celular macrófaga RAW 264.7.....	148
Figura 60-	Efeito das frações apolares diclorometano (FDCM) e hexânica (FHex) sobre células da linhagem RAW 264.7.....	149
Figura 61-	Efeitos do ácido palmítico (AP) e do palmitato de etila (PE) sobre a linhagem celular RAW 264.7. Produção de NO após tratamento com (A) Ácido palmítico. (B) Palmitato de etila.....	151
Figura 62-	Efeito do EFXs, frações apolares, ácido palmítico (AP) e palmitato de etila (PE) sobre a produção in vitro de IL-1 e/ou TNF- α por macrófagos RAW 264.7.	152
Figura 63-	Efeito do EFXs e frações apolares sobre a produção in vitro de IL-10 por macrófagos RAW 264.7.....	153
Figura 64-	Efeito dos compostos majoritários das frações apolares do EFXs sobre a viabilidade de linfócitos normais.	154
Figura 65-	Efeito do extrato bruto de taioba (EFXs) e das frações diclorometânica (FDCM) e hexânica (FHex) sobre a viabilidade de linfócitos normais...	155
Figura 66-	Efeito do EFXs em diferentes populações de linfócitos.	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Relação dos principais metabólitos secundários e suas características biológicas e/ ou químicas.....	21
Tabela 2-	Massa fresca e seca e rendimentos das três diferentes partidas de folhas de <i>X. Sagittifolium</i> utilizadas no preparo do extrato bruto.....	58
Tabela 3-	Massas e rendimentos das diferentes amostras obtidas de folhas de <i>X. Sagittifolium</i> durante o processo de fracionamento por partição líquido-líquido do extrato bruto hidroetanólico 70%.....	59
Tabela 4-	Análise fitoquímica de extrato bruto de taioba por ESI-MS.....	67
Tabela 5-	Principais ácidos graxos presentes na natureza.....	87
Tabela 6-	Sequências dos <i>Primers</i>	99
Tabela 7-	Populações e subpopulações de linfócitos e suas características.....	134
Tabela 8-	Atividades antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de extratos e frações de <i>X. Sagittifolium</i>	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AG	Ácido graxo
AGS	Ácido graxo sintase
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AP	Ácido palmítico
BHT	Hidroxitolueno butilado
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CQFe	Capacidade quelante de ions ferrosos
CG-MS	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de alta eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNase	Enzima que hidrolisa o DNA (desoxirribonuclease)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EFXs	Extrato bruto hidroalcolico das folhas <i>Xanthosoma sagittifolium</i>
ERXs	Extrato bruto hidroetanólico de rizoma de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> .
ESI-MS	Espectrometria de ionização por elétron spray acoplado à espectrometria de massas
FSC	“Forward side scatter” parâmetro do aparelho FACScan que determina o tamanho da partícula
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FeCl ₂	Cloreto ferroso

FAcET	Fração acetato de etila
FAq	Fração Aquosa
FDCM	Fração Dicloro
FHEX	Fração Hexano
IC50	Concentração que inibe 50% de um determinado efeito
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOM/FNB	Institute of Medicine/ Food and Nutrition Board
IL	Interleucina
LPS	Lipossacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol
MTX	Metotrexato
MDA	Malonaldeído
NO	Óxido Nítrico
NCI	National Cancer Institute (USA)
OMS	Organização mundial de saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Palmitato de etila
PI	Iodeto de propídio
RNAse	Enzima que hidrolisa o RNA (Ribonucelase)
RNS	Espécies reativas de nitrogênio do inglês (Reactive nitrogen species)
ROS	Espécies reativas de oxigênio do inglês (Reactive oxigen species)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	"Side scatter" parâmetro do aparelho do FACScan que determina a complexidade interna da partícula ou granulosidade
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral
WCRF	World Cancer Research Fund International
WHO	World Health Organization - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1.	ESPÉCIES VEGETAIS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	20
1.1	Alimentos funcionais e nutracêuticos	23
1.2	Família Araceae	25
1.3	<i>Xanthosoma sagittifolium</i> Schott	30
1.3.1	<u>Aspectos nutricionais</u>	31
1.3.2	<u>Aspectos farmacológicos</u>	32
1.3.3	<u>Aspectos toxicológicos</u>	32
1.4	Hortalças não convencionais	33
1.5	Atividade antioxidante	35
1.6	Atividade Antitumoral	38
1.7	Inflamação e câncer	40
2	OBJETIVOS	43
2.1	Geral	43
2.2	Específicos	43
3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Xanthosoma sagittifolium</i> schott	44
3.1	Introdução	44
3.2	Objetivos específicos	48
3.3	Material e Métodos	49
3.3.1	<u>Obtenção do extrato bruto e fracionamento</u>	49
3.3.2	<u>Avaliação da Atividade Antioxidante</u>	49
3.3.2.1	Método de neutralização do radical DPPH.....	49
3.3.2.2	Capacidade Quelante do Íon Ferroso.....	51
3.3.2.3	ROS intracelular por citometria de fluxo.....	52
3.3.2.4	Ensaio de peroxidação lipídica.....	54
3.3.3	<u>Caracterização química</u>	55
3.3.3.1	Dosagem de Substâncias Fenólicas Totais.....	55
3.3.3.2	Dosagem de flavonoides.....	56
3.3.3.3	Análise por espectrometria de massas com ionização por elétron spray	57
3.3.3.4	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	57
3.3.4	<u>Análise estatística</u>	58
3.4	Resultados	58
3.4.1	<u>Rendimentos da produção do extrato e partição líquido líquido</u>	58

3.4.2	<u>Ação antioxidante de amostras de <i>Xanthosoma sagittifolium</i>.....</u>	60
3.4.3	<u>Determinação da capacidade quelante de íons ferrosos.....</u>	61
3.4.4	<u>Efeito do EFXs e FAq na concentração intracelular de ROS.....</u>	62
3.4.5	<u>Efeito do EFXs e frações polares na peroxidação lipídica em células.....</u> <u>RAW 264.....</u>	63
3.4.6	<u>Caracterização química das amostras ativas de <i>X. sagittifolium</i>.....</u>	64
3.4.6.1	Determinação do teor de substâncias fenólicas totais.....	64
3.4.6.2	Dosagem de Flavonoides.....	65
3.4.6.3	Análise por espectrometria de massas com ionização por elétron <i>spray</i>	66
3.4.6.4	Análise por Cromatografia de Líquida de Alta eficiência (HPLC-DAD- UV).....	68
3.5	Discussão	70
3.6	Conclusões	76
4	ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA DE <i>Xanthosoma sagittifolium</i> Schott.....	77
4.1	Introdução	77
4.1.1	<u>Ciclo Celular</u>	77
4.1.2	<u>Apoptose</u>	79
4.1.3	<u>Câncer</u>	82
4.1.4	<u>Leucemia</u>	85
4.1.5	<u>Ácidos graxos e câncer</u>	86
4.2	Objetivos	90
4.3	Material e métodos	91
4.3.1	<u>Obtenção dos extratos hidroetanólicos de <i>X. sagittifolium</i> e fracionamento</u>	91
4.3.2	<u>Identificação dos compostos majoritários nas frações apolares do EFXs</u>	91
4.3.3	<u>Linhagem Celular</u>	91
4.3.4	<u>Tratamento das linhagens celulares com as amostras</u>	92
4.3.5	<u>Ensaio de citotoxicidade pelo MTT</u>	92
4.3.6	<u>Análise do ciclo celular</u>	93
4.3.7	<u>Ensaio de apoptose por marcação com Anexina-V</u>	94
4.3.8	<u>Análise da expressão gênica por PCR em tempo real</u>	95
4.3.8.1	Extração RNA.....	95
4.3.8.2	Quantificação de ácidos nucleicos.....	96
4.3.8.3	Tratamento com DNase.....	96
4.3.8.4	Transcrição Reversa (RT).....	97

4.3.8.5	Reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR).....	98
4.3.8.6	Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p21.....	99
4.3.8.7	Análise estatística.....	100
4.4	Resultados	101
4.4.1	<u>Efeito citotóxico de extratos de <i>X. sagittifolium</i> e frações do EFXs em linhagens celulares leucêmicas</u>	101
4.4.2	<u>Efeito do EFXs e frações apolares na proliferação e morte da linhagem celular leucêmica Jurkat</u>	106
4.4.3	<u>Análise das frações mais ativas por Cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas-CG-MS</u>	111
4.4.4	<u>Citotoxicidade do ácido palmítico e palmitato de etila sobre células Jurkat</u>	115
4.4.5	<u>Citotoxicidade do EFXs, frações, ácido palmítico e palmitato de etila sobre fibroblastos normais NIH/3T3</u>	116
4.4.6	<u>Estudo de possíveis mecanismos de ação antileucêmica de <i>X. sagittifolium</i></u>	118
4.5	Discussão	120
4.6	Conclusões	130
5	ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE <i>X. sagittifolium</i> Schott	131
5.1	Introdução	131
5.1.1	<u>Imunidade inata e adaptativa</u>	131
5.1.2	<u>Inflamação e inflamação crônica</u>	135
5.2	Objetivos específicos	139
5.3	Material e métodos	140
5.3.1	<u>Linhagem celular</u>	140
5.3.2	<u>Animais</u>	140
5.3.3	<u>Produção <i>in vitro</i> de NO por células RAW 264.7</u>	140
5.3.4	<u>Isolamento de esplenócitos</u>	141
5.3.5	<u>Cultura de macrófagos RAW 264.7 e linfócitos para ensaio de citotoxicidade</u>	142
5.3.6	<u>Ensaio de citotoxicidade</u>	142
5.3.7	<u>Análise de subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo</u>	143
5.3.8	<u>Quantificação dos níveis de citocinas por ensaio imunoenzimático</u>	143
5.3.9	Análise estatística.....	146

5.4	Resultados	146
5.4.1	<u>Estudos dos efeitos das amostras de <i>X. sagittifolium</i> na produção de óxido nítrico (NO) por células macrofágicas RAW 264.7 e citotoxicidade</u>	146
5.4.2	<u>Efeito do extrato bruto de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> e suas frações apolares sobre a produção de IL-1, TNF-α e IL-10 por macrófagos RAW 264.7</u>	150
5.4.3	<u>Efeitos do EFXs, FDCM, FHex e compostos majoritários destas frações sobre a viabilidade de linfócitos normais</u>	154
5.4.4	Efeitos do EFXs sobre diferentes populações de linfócitos.....	156
5.5	Discussão	157
5.6	Conclusões	168
6.	Considerações gerais	169
	CONCLUSÕES	174
	REFERÊNCIAS	175
	APÊNDICE - Artigo publicado.....	206

1 ESPÉCIES VEGETAIS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A natureza, com sua biodiversidade, é responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas destinadas à manutenção e sobrevivência humana, e o reino vegetal representa a maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura (Viegas *et al.*, 2006; Filho, 2010). A utilização de plantas medicinais e o consumo de alimentos funcionais é uma prática tradicional ainda existente em diversas comunidades de todo o mundo, e tem, inclusive, recebido incentivo da própria organização mundial de saúde (OMS). Além disso, vários fatores vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente os fatores econômicos e os sociais (Martins *et al.*, 2002; Dutra *et al.*, 2016). Atualmente, as regiões tropicais apresentam altos índices de devastação e representam a principal preocupação de conservacionistas. Assim, a valorização da diversidade biológica e da agregação de valor econômico aos produtos naturais provenientes dessa diversidade tornam-se de fundamental importância (Oliveira *et al.*, 2006; Özdemir e Alpınar, 2015). As plantas têm sido consideradas uma das fontes mais promissoras de novos princípios bioativos. Várias espécies vegetais, inclusive as pouco conhecidas, são utilizadas desde muito tempo pela população, quer seja nos países pobres quanto nos países desenvolvidos (Ogunwande *et al.*, 2005).

Atualmente, um grande número de grupos de pesquisa tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos vegetais, impulsionados pelos benefícios destes produtos sobre a saúde e bem-estar (Tam e Lim, 2015). Estes compostos bioativos são oriundos do metabolismo vegetal primário e secundário, que é constituído por duas vias: primária e secundária.

O metabolismo primário é responsável pela produção de produtos essenciais como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos lipídicos e proteínas, sendo o metabolismo secundário responsável pela produção dos metabólitos secundários (Gutzeit e Müller, 2014), como terpenos, alcaloides, polifenóis, etc. (Tabela 1). A ação medicinal das plantas advém de produtos do metabolismo secundário e primário (Monteiro *et al.*, 2005). Os metabólitos secundários apresentam distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, enquanto que metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo taxonômico (Verma e Shukla, 2015).

Tabela 1 - Relação dos principais metabólitos secundários e suas características biológicas e/ou químicas.

Classe	Definição	Propriedades
Alcaloides	Aminas básicas	Importantes fármacos (morfina, atropina, vincristina). Mais de 12.000 substâncias conhecidas
Flavonoides	Pigmentos dos vegetais (flores e frutos)	Anti-inflamatórios, antioxidantes
Óleos essenciais	Derivados do isopreno: terpenos oxidados e fenilpropanoides	Antimicrobianos, antiespasmódicos
Glicosídeos	Presença de açúcar	Mais de 10 classes e mais de 3000 substâncias conhecidas
Saponinas	Glicosídeos com característica de sabão	Vários grupos químicos. Alguns estão envolvidos no metabolismo de esteroides
Taninos	Polifenóis, a maioria precursora do ácido gálico	Substâncias adstringentes que atuam como antidiarreicos, hemostáticos e cicatrizantes.
Terpenoides	Derivados de unidades de cinco carbonos de isoprenos (10, 15, 20, 30, 40 e acima de 40)	Mais de 20.000 substâncias conhecidas; seis classes e estruturalmente heterogêneas

Fonte: Adaptado de Saad *et al.*, 2009.

Muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas nos vegetais, como por exemplo, a proteção contra herbívoros (herbivoria) e/ou contra infecção por microorganismos patogênicos. Também agem como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta/planta (Taiz e Zeiger, 2010). As rotas metabólicas deste metabolismo não são tão gerais quanto às do metabolismo primário e podem ser ativadas apenas durante alguns estágios particulares de crescimento ou desenvolvimento, em períodos de estresse causado por limitações nutricionais ou condições do meio ambiente ou ataque microbiano (Simões *et al.*, 2005).

Os extratos de plantas que contêm substâncias bioativas podem ser utilizados como “alimentos funcionais” ou para a produção de medicamentos e cosméticos. Os compostos bioativos geralmente são metabólitos secundários e são divididos em três categorias principais: Terpenoides (ou Isoprenoides), compostos contendo nitrogênio (alcaloides, glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos) e compostos fenólicos (fenilpropanoides e flavonoides) (Bonilla *et al.*, 2015; Verma e Shukla, 2015). A indústria alimentícia tem

intensificado a busca e identificação de compostos bioativos em alimentos, devido ao aumento do interesse dos consumidores por produtos mais saudáveis. Como exemplos, podemos citar os polifenóis presentes no vinho branco e tinto, a cafeína no café, o ácido clorogênico em casca de café, os derivados de quercetina de fontes vegetais, e glicorafanina, presente no brócolis (Bonilla *et al.*, 2015).

Considerando a perspectiva de obtenção de novos fármacos, os produtos naturais se diferenciam dos sintéticos sob o aspecto da diversidade molecular. Estima-se que somente 5 a 15% das espécies vegetais foram pesquisadas, restando assim, uma grande quantidade de produtos naturais bioativos inéditos para o desenvolvimento de novos fármacos (Filho, 2010). O potencial relevante deste arsenal químico para o desenvolvimento social e econômico de um país resulta em incentivos e a elaboração de novos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (Nisbet e Moore, 1997). Segundo a Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010, o conjunto de substâncias originadas no metabolismo primário e/ou secundário ou seus derivados, responsáveis pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal, é chamado de fitocomplexo. Lorenzi e Matos (2008) definem também este conceito, afirmando que o princípio ativo de um vegetal pode ser constituído de uma única substância ou de um complexo fitoterápico ou fitocomplexo, caracterizado por um conjunto de substâncias que atuam sinergicamente.

Segundo Barreiro e Bolzani (2009), as pesquisas de novos protótipos de fármacos e/ou fitofármacos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta que a diversidade micromolecular dos biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada como uma fonte de substâncias de interesse farmacológico. A maioria dos fármacos são micromoléculas bioativas, que exercem seu efeito terapêutico graças a interações específicas com uma macromolécula ou receptor. Recentemente, foi adotado o termo “plantas bioativas” e refere-se àquelas plantas que possuem compostos ou substâncias que interferem ou alteram o funcionamento orgânico de outros seres vivos (Silva *et al.*, 2013). Substâncias bioativas presentes em plantas tornaram-se populares como alternativas complementares no tratamento de doenças crônicas (Samir *et al.*, 2011). Além disso, medicamentos como Vimblastina e Camptotecina preparados a partir de substâncias bioativas de vegetais apresentam importante atuação na cura de doenças graves, incluindo câncer (Verma e Shukla, 2015). O crescente interesse para os produtos bioativos derivados de plantas ganhou atenção no mercado internacional, e tendo em vista que estas pesquisas são importantes para o desenvolvimento do país muitas políticas públicas se voltaram para este tema (Nogueira *et al.*, 2010).

1.1 Alimentos funcionais e nutracêuticos

Segundo Ferro (2008), o aumento da expectativa de vida e o consequente aparecimento de doenças crônicas como hipertensão, obesidade, aterosclerose, diabetes *mellitus*, câncer e osteoporose, tem gerado um cuidado crescente da população com a qualidade da alimentação. Este fato despertou o interesse por alimentos como os legumes, verduras, frutas e cereais que, além de fornecerem energia e nutrientes essenciais, apresentam constituintes não nutrientes que, se regularmente consumidos, podem efetivamente combater ou prevenir inúmeros problemas de saúde (Padilha e Pinheiro, 2004; Vidal *et al.*, 2012). Neste contexto, atualmente os nutracêuticos e os alimentos funcionais pertencem ao setor da economia que mais cresce na indústria de produtos de alimentos e cuidados pessoais. Este desenvolvimento é devido à perda da confiança do consumidor na dieta moderna, o envelhecimento da população e a uma melhoria global na conscientização da saúde e prevenção de doenças (Fibigr *et al.*, 2016). Dessa forma é importante diferenciar os conceitos de alimentos funcionais e de nutracêuticos, devido ao pouco conhecimento destes termos pela população. Estas informações contribuem para uma maior inclusão dos alimentos funcionais na dieta (Colla e Moraes, 2006).

Segundo a portaria número 398/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o alimento funcional é o alimento ou ingrediente com alegação de propriedades funcionais ou de saúde. Além de funções nutricionais básicas, deve produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, como também ser seguro para consumo sem supervisão médica. Além disso, a mesma portaria permite alegações de função e/ou conteúdo, para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas alegações que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. A legislação brasileira possui resoluções que definem a alegação de propriedade funcional e de propriedade de saúde para o alimento. O registro na ANVISA é obrigatório tanto para as substâncias bioativas e probióticos isolados, como para alimentos, com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, e para alimentos ou ingredientes novos, produzidos no Brasil ou importados (ANVISA, 2000; 2005).

Segundo Vidal e colaboradores (2012), o alimento funcional é constituído de nutrientes (vitaminas, minerais, fibras, proteínas, lipídios), e de componentes não nutrientes essenciais à prevenção e/ou tratamento de doenças. Outra definição é dada pelo Comitê de Alimentos e Nutrição, do Instituto de Medicina Internacional (IOM/FNB), que denomina alimentos funcionais como quaisquer alimentos ou ingredientes que possam proporcionar benefício à saúde, além dos nutrientes tradicionais que ele contém. Segundo Liu e

colaboradores (2003), os alimentos funcionais possuem características bem definidas e assim, obedecem a alguns critérios: devem ser alimentos consumidos na dieta normal/usual; apresentar em sua composição substâncias bioativas em alta concentração ou substâncias raras, mesmo que em menor concentração; preferencialmente devem ter efeitos positivos, além do valor nutritivo básico, aumentando o bem-estar e/ou reduzindo o risco de ocorrência de doenças, ou promovendo benefícios à saúde e aumentando a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental. Além disso, a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico.

Nutracêuticos são suplementos de dieta que proporcionam uma forma concentrada de um agente bioativo e são vendidos em apresentações semelhantes a medicamentos: pílulas, extratos, tabletes, etc. A *Food and Drug Administration* (FDA; <http://vm.cfsan.fda.gov>) regula suplementos dietéticos sob um conjunto de regras diferentes daquelas que cobrem alimentos convencionais e medicamentos. A fronteira entre nutracêuticos e alimentos funcionais nem sempre é clara. Quando um extrato fitoquímico está incluído numa formulação de alimento, por exemplo, 300 mg de extrato dissolvido em 1 L de suco, apresentando um potencial biológico novo, representa um alimento funcional. A mesma quantidade de extrato fitoquímico incluída numa cápsula irá constituir um novo nutracêutico (Dores *et al.*, 2014). Segundo Sarrías e colaboradores (2013), os nutracêuticos são produtos que proporcionam uma formulação concentrada (extrato, compostos isolados ou combinações) de uma ou mais substâncias bioativas, nutrientes ou não nutrientes, mas de origem alimentar, em uma dose que deve ultrapassar àquela que poderia ser obtida a partir do alimento em uma dieta balanceada. Podem ser citados como exemplo de nutracêuticos: cápsulas contendo extrato de uva com alto teor de resveratrol, que não é possível obter através de uma ingestão normal de uvas ou de vinho; extrato de tomate enriquecido com licopeno, para manter o colesterol do sangue em níveis normais; pílula com a luteína purificada, para retardar problemas de visão, ácidos graxos, carotenoides, suplementos alimentares, alimentos processados ou produtos herbais. Um nutracêutico também pode apresentar substâncias bioativas em doses alcançáveis através da dieta, mas esses compostos devem apresentar características específicas tais como uma formulação que possa melhorar sua biodisponibilidade (Sarrías *et al.*, 2013).

A redução do índice de doenças crônicas diminui os gastos com a saúde pública e melhora a qualidade e expectativa de vida da população. As políticas de saúde brasileiras referentes à alimentação e nutrição apresentam esta tendência e seguem as recomendações da estratégia global sobre dieta, atividade física e saúde, publicada pela OMS-Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004).

O maior uso de vegetais, frutas e cereais integrais na alimentação regular deve ser cada vez mais estimulado, já que grande parte dos componentes bioativos estudados encontra-

se nesses alimentos. As hortaliças representam uma das principais fontes de compostos bioativos da dieta, além dos nutrientes. Os vegetais fornecem não apenas variedade de cor e textura às refeições, mas também nutrientes importantes. As hortaliças têm pouca gordura e calorias, relativamente pouca proteína, mas são ricas em carboidratos e fibras, e fornecem níveis significativos de micronutrientes à dieta. Além disso, elas possuem compostos funcionais que beneficiam uma ou mais funções orgânicas, contribuindo para melhorar o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de doenças (Carvalho *et al.*, 2006).

1.2 Família Araceae

A família Araceae é subcosmopolita, com 117 gêneros e cerca de 4.000 espécies (Govaert *et al.*, 2011). Pertence à ordem Alismatales, um clado basal das monocotiledôneas (APGIII 2009) e tem como características a presença de espádice, com flores uni ou bissexuais, subentendida por uma espata, ambas apoiadas num pedúnculo longo ou curto (Coelho, 2010). Etimologicamente, o nome Araceae é derivado diretamente do grego antigo "aron", que significa colheita ou produtos do campo. As Araceae apresentam alta plasticidade morfológica e podem ser rastejantes, trepadeiras ou epífitas. A maioria habita lugares úmidos e sombreados em florestas tropicais, e variam de plantas de pequeno porte a espécies de porte arbustivo. Os frutos das aráceas são do tipo bagas suculentas, sendo raramente secos e duros (JBRJ-2014). Embora a família ocorra naturalmente em todos os continentes (Figura 1), a família Aracea, vulgarmente conhecidas como taiobas (*Xanthosoma* spp.) ou inhames (*Colocasia esculenta* Schott), constituem uma opção importante como fonte de alimentação suplementar e cultivo de subsistência (Paiva, 1993).

Figura 1- Distribuição geográfica da família Araceae



Fonte: www.jbrj.org.br, 2014.

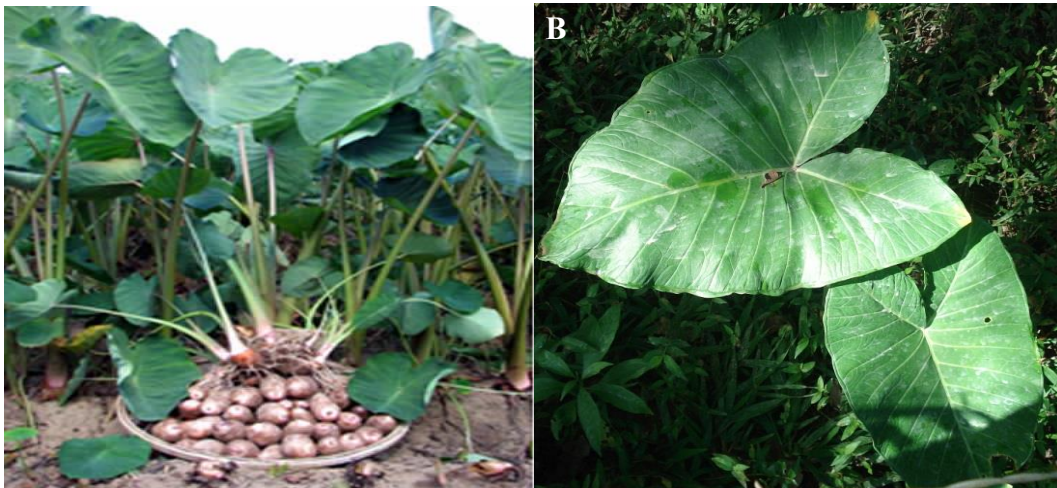
As folhagens de várias espécies dos gêneros *Monstera*, *Philodendron Schott* (*imbés*) e *Spathiphyllum* (*lírio-da-paz*) são utilizadas em ornamentação de exteriores e interiores. Existem ainda espécies com propriedades curativas, que têm sido usadas na medicina popular. Estas espécies são mais utilizadas para uso externo, como cataplasmas de folhas ou raízes moídas, folhas murchas aquecidas ou loções feitas por infusão ou decocção. Como exemplos podem ser citados as espécies *Xanthosoma auriculatum* Regel, cuja seiva é utilizada em feridas, os tubérculos de *Dracontium grayumianum* G.H. Zhu & Croat, que são usados por índios para o controle hemorrágico no parto, e o pedúnculo do inhame (*Colocasia esculenta* L. Schott), utilizado para estancar hemorragia, inclusive arterial (JBRJ-2014).

No Brasil, as espécies da família Araceae pertencentes aos gêneros *Colocasia* Schott e *Xanthosoma* Schott são cultivadas para fins alimentícios e apresentam grande potencial na indústria alimentar, devido às suas propriedades nutricionais (incluindo carboidratos e ácidos graxos), como também na indústria farmacêutica, devido aos seus benefícios medicinais. Os tubérculos das plantas da família Araceae armazenam grande quantidade de amido, em média de 22 a 40 %, e são considerados como fonte de carboidratos em muitos países da América do Sul (Pérez *et al.*, 2005). Ainda segundo estes autores, os tubérculos apresentam grande quantidade de água, o que dificulta sua conservação *in natura*, sendo indicado o seu processamento em forma de farinha. Algumas espécies da família têm sido tratadas como hortaliças não convencionais, isto é, apresentam distribuição limitada e restrita a determinadas localidades ou regiões, possuem importante função na alimentação e na cultura de populações tradicionais, no passado e na atualidade, e não estão organizadas em cadeias produtivas, não despertando ainda interesse comercial de empresas do ramo hortícola, ao contrário das hortaliças convencionais (BRASIL, 2010). Dentre estas espécies da família Araceae encontram-se o inhame ou taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), o mangarito (*Xanthosoma maffafa* Schott.) e a taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.) (Figura 2). Os rizomas são os

produtos consumidos no taro e no mangarito, enquanto na taioba são consumidas as folhas, refogadas ou escaldadas (Feltran, 2010). Ainda segundo este mesmo autor todas estas plantas apresentam riqueza mineral, com a presença de vitaminas e fibras. No entanto, contém compostos indesejáveis como oxalatos e inibidores de tripsina. Com o preparo correto estes são degradados e os rizomas e as folhas tornam-se excelentes alimentos.

Algumas espécies da família são consideradas tóxicas (Figura 3), pela presença, principalmente, de cristais de oxalato de cálcio, como é o caso do “comigo ninguém pode” (*Dieffenbachia* spp) e *Colocasia antiquorum* Schott. (taioba brava) (Ferreira *et al.*, 2006). Os cristais geralmente estão presentes em idioblastos (Mantovani *et al.*, 2010), em forma de drusas, ráfides ou monocristais.

Figura 2 - Espécies comestíveis da família Araceae



Legenda:(A) *Colocasia esculenta*; (B) *Xanthosoma sagittifolium*.

Fonte: Adaptado de site www.incaper.es.gov.br, 2015.

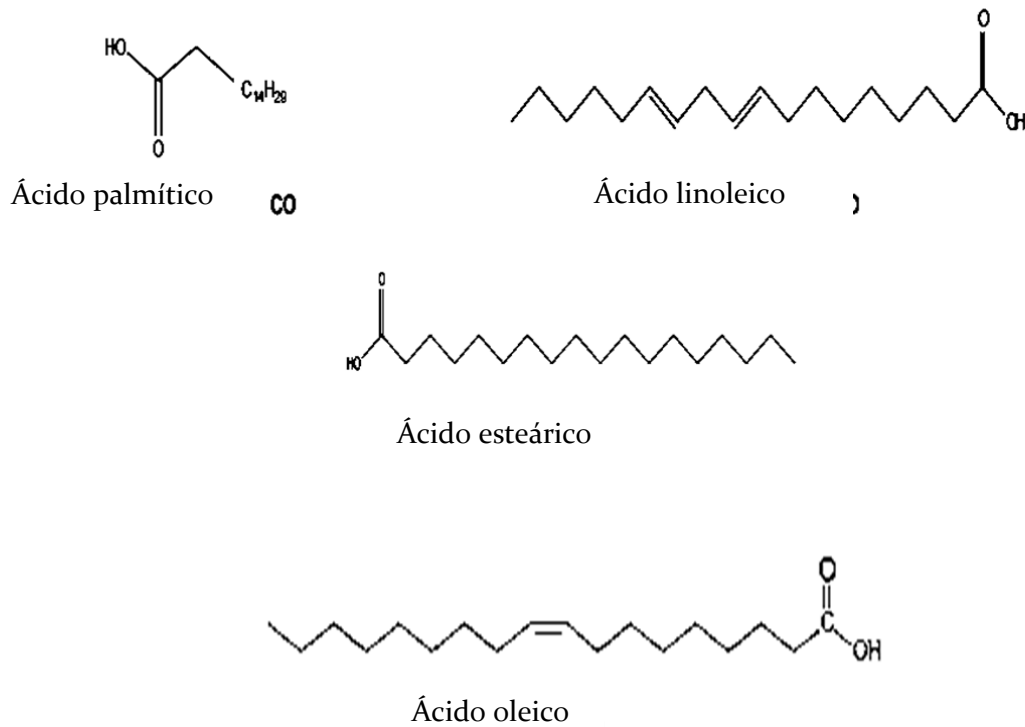
Figura 3- Espécies tóxicas da família Araceae



Legenda: (A) *Dieffenbachia picta* Schott (comigo ninguém pode); (B) *Colocasia antiquorum* Schott (taioba brava); (C) *Zantedeschia aethiopica* Spreng (copo de leite); (D) *Caladium bicolor* Vent (Tinhorão).
 Fonte: Adaptado de toptropicals.com/index.htm, 2014.

Com relação à fitoquímica, vários estudos indicam a presença dos ácidos graxos como o ácido linoleico, palmítico e esteárico (Figura 4) presentes no óleo das sementes de algumas espécies da família Araceae, como *Arum italicum* Miller e *Dracunculus vulgaris* Schott (Saglik *et al.*, 2002a e 2002b). Ácido linolênico, palmítico e linoleico de partes aéreas de *Arum palaestinum* Boiss (Farid *et al.*, 2015) e ácido oleico entre outros ácidos em extratos de *Typhonium flagelliforme* (Lai *et al.*, 2015). Adicionalmente, vários componentes químicos, incluindo alcaloides, lectinas, ácidos graxos, cerebrosídeos, óleos voláteis e fenilpropanoides foram identificados e isolados a partir de espécies do gênero *Pinellia*, da família Araceae (Ji *et al.*, 2014), além de flavonoides como luteolina, isoorientina e isovitexina isolados de *Arum palaestinum* Boiss (Farid *et al.*, 2015).

Figura 4- Ácidos graxos presentes na família Araceae



Fonte: adaptado de Saglik *et al.*, 2002 e Farid *et al.*, 2015.

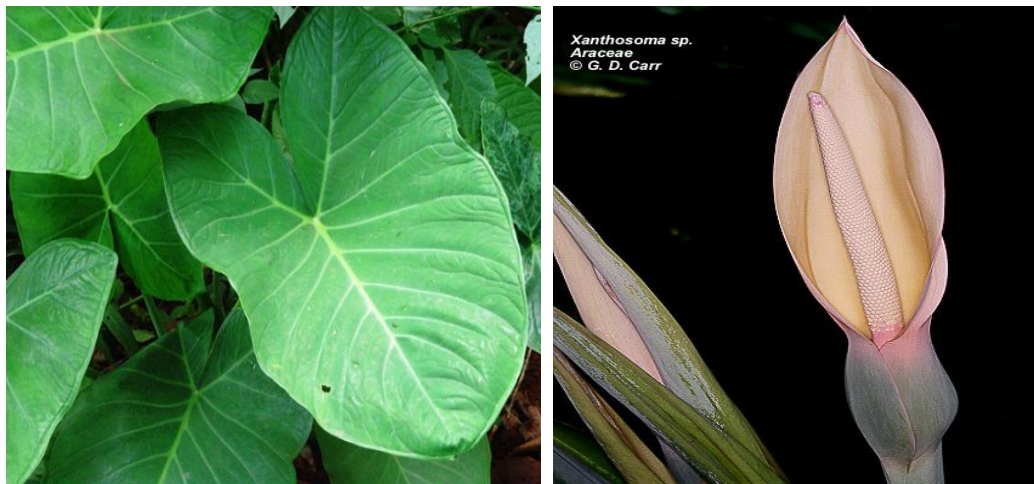
Devido à presença de diferentes componentes bioativos, muitas plantas da família Araceae apresentam efeitos farmacológicos. O inhame, por exemplo, apresenta atividade inibidora da síntese do colesterol (Sakano *et al.*, 2005), ação citotóxica em linhagem de câncer de cólon e efeito estimulante de linfócitos (Brown *et al.*, 2005), e por estes efeitos, é considerado um alimento funcional em muitos países. Bains e colaboradores (2005) isolaram uma lectina de *Sauromatum venosum* (Aiton) Kunth (Araceae), com atividade antiproliferativa em nove linhagens tumorais e atividade mitogênica em linfócitos murinos. Yeap e colaboradores (2007) mostraram que o extrato metanólico de *Rhaphidophora korthalsii* (Schott) foi capaz de estimular a proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) em 48 h e 72 h. A fração hexânica de *Typhonium flagelliforme* (Lodd) Blume induziu atividade citotóxica em carcinoma de pulmão, porém inibiu células não tumorigênicas como fibroblastos-BALB/c 3T3 (Lai *et al.*, 2008). Extratos de *Caladium bicolor*, outra planta da família Araceae apresentou atividade antidiarreica em testes *in vitro* e *in vivo* (Olanrewaju *et al.*, 2015).

Outra espécie desta família é a *Xanthosoma sagittifolium*, conhecida popularmente por taioba, que por possuir poucos estudos científicos demonstrados quanto aos seus constituintes fitoquímicos e efeitos farmacológicos, se tornou objeto de estudo deste trabalho.

1.3 *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott

Muitas espécies do gênero *Xanthosoma* são conhecidas popularmente como taioba e utilizadas pelo homem como alimento desde os tempos pré-colombianos, fazendo parte da alimentação básica de vários países (Lima, 2009), como *X. sagittifolium*, *X. atrovirens* e *X. violacium*. A espécie *X. sagittifolium* tem sido apontada como a espécie mais amplamente cultivada sob o nome vulgar de taioba, é uma hortaliça folhosa com importantes propriedades nutricionais, consumida como alimento em diversos estados brasileiros (Figura 5).

Figura 5- Folhas e flor de *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott



Fonte: www.botany.hawaii.edu, 2015.

Recentemente, Gonçalves (2011) apresentou um estudo taxonômico sobre as espécies cultivadas de *Xanthosoma*, no qual esclarece que o nome *X. sagittifolium* refere-se a uma espécie restrita ao Caribe. Neste mesmo trabalho, o autor descreveu a *X. taioba* E.G. Gonç., uma nova espécie cuja ocorrência é o Sudeste do Brasil, que corresponde à espécie mais comum de taioba cultivada no país. Este posicionamento taxonômico das espécies de *Xanthosoma* não é ainda completamente aceito. Andrade e colaboradores (2011) reconhecem ainda *X. sagittifolium* como o nome aceito para a espécie mais comum de taioba no Brasil. A identificação incorreta de espécies de Araceae que apresentam rizomas comestíveis pode gerar certa confusão uma vez que existem vários gêneros com esta característica como *Colocasia* Schott, *Alocasia* (Schott) G. Don e o próprio *Xanthosoma* Schott.

Nas últimas décadas, a busca de alimentos funcionais tem aumentado o interesse sobre as propriedades das plantas amazônicas, considerando que a maioria destes alimentos funcionais permanece desconhecida no Brasil e em outros lugares no mundo (Berto *et al.*, 2015). Na região amazônica, os rizomas de taioba são muito consumidos, uma vez que apresentam valor nutritivo semelhante ao do inhame, sendo ainda mais ricos em elementos

minerais. A taioba apresenta uma série de vantagens para cultivo, pois é uma folha resistente à ação de pragas e insetos, e apresenta baixo custo e facilidade do plantio (Morais *et al.*, 2006).

Com base no conhecimento popular, muitas pessoas afirmam que a cultura da taioba deveria receber maior incentivo, já que a qualidade das folhas como alimento é superior a do espinafre, em relação a sabor e nutrientes (Morais *et al.*, 2006). Segundo Camili e colaboradores (2012), a importância da taioba como componente da dieta humana está no fato de seu total aproveitamento (folhas, caules e bulbos).

1.3.1 Aspectos nutricionais

As folhas de taioba são nutricionalmente ricas e excelentes fontes de cálcio, fósforo, ferro, vitamina C, tiamina e niacina (Carvalho e Cordeiro, 1990). As folhas da taioba apresentam 143 kJ/100 g de energia, 89,2% de umidade e 2,9; 0,9; 5,4; 4,5 e 1,5 g de proteína, lipídios, carboidratos, fibra alimentar e cinzas, respectivamente. Para os minerais tem-se: 141; 38; 0,66; 53; 1,9; 1; 290; 0,16 e 0,6 mg/100 g, respectivamente, de cálcio, magnésio, manganês, fósforo, ferro, sódio, potássio, cobre e zinco. Quanto às vitaminas e outros fatores são encontrados: 0,10; 0,10 e 17,9 mg/100 g, respectivamente, de riboflavina, piridoxina e vitamina C, 8,55 mg/100 g de ácido oxálico, e em base seca, valor de 2,14 TIU/mg (unidade de inibidor de tripsina) (Pinto *et al.*, 2001).

As folhas frescas de taioba de todos os tipos de cultivo apresentam alto conteúdo de vitamina C. As folhas frescas provenientes de cultivo orgânico, no entanto, apresentaram conteúdo ainda maior de vitamina C e, para as folhas desidratadas, foi observado alto conteúdo de vitamina C tanto nas folhas de cultivo natural quanto orgânico (Morais *et al.*, 2006).

A taioba apresenta também um elevado teor de luteína, um carotenoide que possui potente atividade antioxidante. Além de prevenir a degeneração relacionada à idade (DMRI), previne a aterosclerose, a catarata, o câncer de cólon e outras patologias já relatadas na literatura (Nachtigall *et al.*, 2007).

Péres e colaboradores (2005) verificaram que o rizoma de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) apresenta um teor de fósforo superior aos encontrados para *Colocasia esculenta* e *Manihot esculenta* Crantz.

1.3.2 Aspectos farmacológicos

Arruda e colaboradores (2004) mostraram que a ingestão de folhas de *X. sagittifolium* apresentou efeito protetor contra o estresse oxidativo em ratos Wistar. Os mesmos autores demonstraram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* para o pó das folhas desta planta (Arruda *et al.*, 2005). Nesta espécie foi observada também atividade inibidora de protease (Prathibha *et al.*, 1995) e atividade antifúngica (Schmourlo *et al.*, 2005).

Com relação aos constituintes da taioba, tem sido descrita apenas a presença de lectinas nos tubérculos, o que parece ser comum nas espécies desta família (Mo *et al.*, 1999). As lectinas são glicoproteínas encontradas na natureza na forma livre ou ligadas à superfície da célula. O funcionamento das células T e a ativação das células B são influenciados por proteínas que podem ser obtidas através da dieta (Wichers, 2009), como por exemplo, as lectinas. A presença destas glicoproteínas na planta pode justificar a atividade imunológica observada em algumas espécies da família Araceae (Brow *et al.*, 2005), já que as lectinas apresentam atividade imunomoduladora, influenciando a transdução de sinal na ativação de células CD4, monócitos e macrófagos (Melo *et al.*, 2010). A espécie *Xanthosoma sagittifolium* apresentou ainda atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (Chen e Benny, 2007), considerados importantes agentes infecciosos.

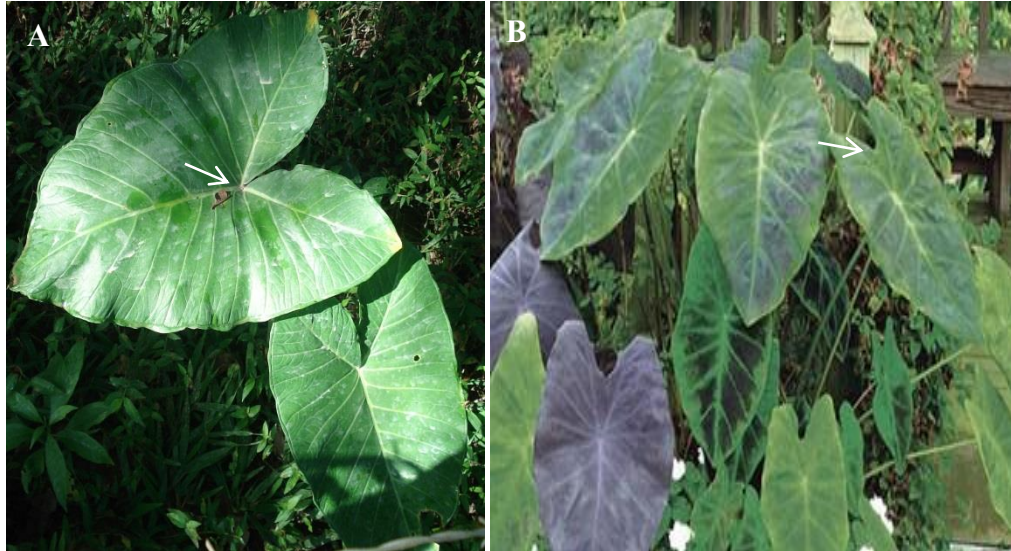
1.3.3 Aspectos toxicológicos

Existem poucos relatos na literatura sobre a toxicologia desta espécie. Quanto aos fatores antinutricionais da taioba, estes foram considerados aceitáveis e até mais baixos do que hortaliças convencionalmente muito utilizadas (Pinto *et al.*, 2001b). Entretanto, Essumang e colaboradores (2007) chamam atenção para o perigo de cultivo desta planta em locais de mineração. Foi verificado que tubérculos de culturas de *Xanthosoma sagittifolium* e *Colocasia esculenta* absorveram produtos químicos tóxicos do solo, já que os níveis de arsênio, cádmio e mercúrio encontrados nestes tubérculos foram maiores do que os recomendados pela Organização mundial de saúde. (OMS)

Devido à semelhança morfológica, a taioba (*X. sagittifolium*) é algumas vezes confundida com a taioba brava (*C. antiqorum*). A taioba brava é uma planta tóxica devido à grande quantidade de oxalato de cálcio, e a confusão taxonômica e consumo errado da espécie, por parte da população, pode representar um grande perigo. A principal diferença entre a taioba (*X. sagittifolium*) e a taioba brava (*Colocasia antiqorum*) está na inserção do

pecíolo na base da lâmina foliar, onde na taioba brava a inserção se dá a alguns centímetros da base da lâmina, enquanto na taioba, a inserção é bem na base da lâmina. (Figura 6).

Figura 6- Folhas de taioba comum (*X. Sagittifolium*) e taioba brava (*Colocasia antiquorum*).



Legenda: (A) Taioba comum e (B) taioba Brava. Setas- inserção do pecíolo. Adaptado de <http://www.missouribotanicalgarden.org>, 2015.

1.4 Hortaliças não convencionais

As hortaliças não-convencionais são aquelas que geralmente são inseridas na culinária e na cultura de determinadas regiões e portanto tem produção restrita, não entram em cadeia produtiva e geralmente não despertam o interesse comercial das empresas. Tais plantas apresentam altos níveis de ácido ascórbico e de minerais e poderiam ser incluídas na cadeia produtiva e seu consumo estimulado como ingrediente de dietas alimentares. Como exemplo de hortaliças não convencionais encontra-se a taioba (*Xanthosoma sagittifolium*), ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*), bertalha (*Basella alba* L. Syn e *B. rubra*) e beldroega (*Portulaca oleracea* L.) (Oliveira *et al.*, 2013). Em muitas hortaliças, são encontrados compostos antinutricionais, que podem causar danos à saúde, como o oxalato de cálcio. Almeida e colaboradores (2014) observaram que *Pereskia grandifolia* (groselha-da-américa) apresenta maior teor de ácido oxálico e o dobro do teor de cálcio que *Pereskia aculeata* (ora-pro-nobis). Nas farinhas de ora-pro-nobis o teor de ácido oxálico foi inferior ao da taioba. Em muitos locais o consumo da taioba é desaconselhado devido à presença de oxalato de cálcio em suas folhas. O ácido oxálico reduz a biodisponibilidade do cálcio, pois nos rins este mineral complexa com este ácido aumentando a excreção de oxalato de cálcio (Andrade *et al.*, 2013). Estudos realizados por Santos (2006) e Pinto e colaboradores (2001a) concluíram que a couve e a taioba não possuem a quantidade necessária de ácido oxálico para formar o complexo de oxalato de cálcio (Andrade *et al.*, 2013).

Por serem hortaliças mais rústicas e de fácil cultivo, as hortaliças não-convencionais podem ser utilizadas para abrir novas oportunidades de produção e comercialização. De maneira geral, mostram-se nutricionalmente superiores às hortaliças convencionais e também apresentam boa aparência e paladar (Cavalcanti *et al.*, 2015). A taioba apresenta alta produção de folhas e rizomas por unidade de área, e é considerada uma cultura típica de subsistência (BRASIL, 2010). Os rizomas podem ser utilizados na alimentação ou comercialização, o que aumenta a renda do produtor (Pinto *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2014). Segundo o manual de hortaliças não convencionais (Brasil, 2010), a taioba é uma planta de fácil cultivo respondendo bem a uma ampla faixa de condições ambientais. Quando a temperatura cai abaixo de 20°C pode ocorrer dormência das folhas. O cultivo é indicado para solos ricos em matéria orgânica, porém a planta se adapta bem a solos de baixada e ao encharcamento. A produção de hortaliças no Brasil é ainda dependente de pequenos produtores rurais que atendem a população urbana. Mesmo a produção das hortaliças “alternativas” ou “não convencionais” encontra-se em pequenas propriedades e seu manejo é tecnicamente insuficiente para produção de consumo em grande escala (Reifschneider e Lopes, 2015). Com o aumento populacional e com intensas variações climáticas, que interferem na produção agrícola, existe ampla demanda para variabilidade e aumento de opções de hortaliças e outros alimentos. As hortaliças não convencionais apresentam maior dinâmica fisiológica e resistem às mudanças climáticas severas, podendo suprir o mercado consumidor atual e futuro. Estudos indicam que o aumento do consumo de hortaliças não convencionais aumenta as oportunidades para o desenvolvimento de uma horticultura mais sustentável (Almeida *et al.*, 2014). A taioba tem um cultivo restrito apesar de apresentar alto valor nutricional e farmacológico. A divulgação e propagação de hortaliças negligenciadas, como a taioba, aumentaria a oferta no mercado de alimentos com alto valor nutritivo e medicinal (Reifschneider e Lopes, 2015).

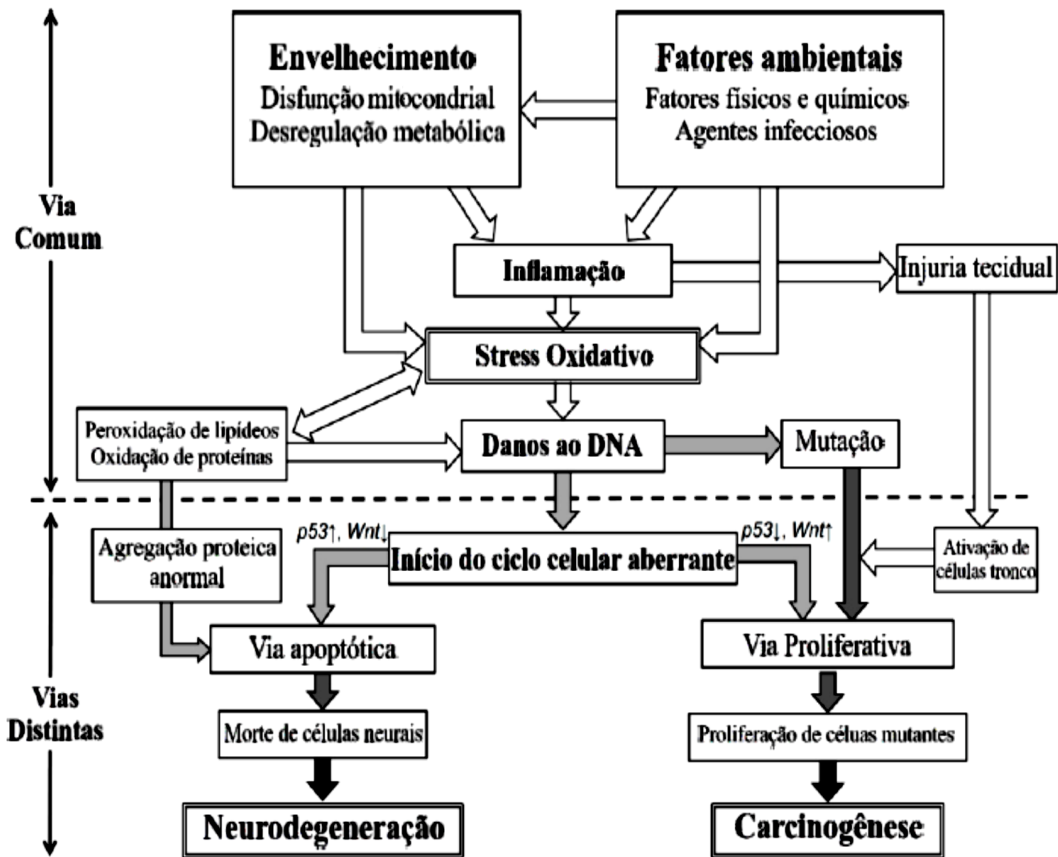
1.5 Atividade antioxidante

A importância dos antioxidantes presentes na dieta na prevenção de algumas doenças e melhoria da saúde tem atraído muita atenção dos pesquisadores da área de pesquisa (Ansil *et al.*, 2011). Os radicais livres são gerados durante o metabolismo energético e são produzidos para executar funções fisiológicas, tais como regulação da transdução de sinal, expressão gênica, dentre outros. Mas quando as espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão presentes em maior concentração, ou além da capacidade antioxidante de um sistema biológico, ocorre um desequilíbrio conhecido como o estresse oxidativo ou nitrosativo; uma situação que pode ocasionar danos às células (Aliyu *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo pode ser induzido por fatores ambientais, tais como produtos químicos, luz UV, organismos infecciosos, e por fatores endógenos, como a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e algumas atividades enzimáticas (por exemplo: NADPH oxidase e óxido nítrico sintase (NOS), principalmente por células inflamatórias). A presença crônica de estresse oxidativo é crítica para a etiologia de várias doenças, especialmente doenças neurodegenerativas e câncer (Figura 7). As vias das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) e da fosfoinositol-3-cinase (PI3K) são reguladas por ROS. A via MAPK regula a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação, transformação e inflamação. A PI3K esta relacionada à via da proteína RAS (do inglês *Rat Sarcoma vírus*), que quando ativada contribui significativamente para vários aspectos do fenótipo maligno, incluindo a desregulação do crescimento de células tumorais, a morte celular programada e a invasividade (Silva e Jasiulionis, 2014). Processos inflamatórios crônicos, por exemplo, induzem a produção de ROS e RNS, e citocinas inflamatórias, as quais podem ativar a produção de radicais livres, seja pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase 2 (COX-2), mieloperoxidase (MPO) e/ou peroxidase de eosinófilos (EPO) (Thanan *et al.*, 2014).

Maus hábitos alimentares, sedentarismo e estresse podem causar alterações metabólicas que aumentam a produção de ROS / RNS ou diminuem a produção de antioxidante resultando em aumento da peroxidação lipídica e oxidação de DNA. Além disso, proteínas oxidadas se acumulam nas células formando agregados de proteína e causando danos mitocondriais. Por outro lado, espécies reativas causam danos no DNA, o que pode levar a regulação alterada de genes comuns, tais como p53 e Wnt, a alterações no ciclo celular, doenças neurodegenerativas e câncer, como esquematizado na Figura 7 (via distinta).

Figura 7- Papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e câncer.



Fonte: Adaptado de Thanan e colaboradores, 2014.

Quando vários eventos, tais como mutações e alterações epigenéticas ocorrem em células sob estresse oxidativo, as mesmas podem adquirir as propriedades das células tumorais. Alterações epigenéticas são mudanças químicas herdáveis na expressão do gene que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA (Silva e Jasiulionis, 2014). Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais e condições de estresse e podem ocorrer por três mecanismos principais: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores. Diferente de alterações genéticas, os processos epigenéticos são potencialmente reversíveis, e assim passíveis de tratamento (Miller e Prado, 2008; Silva e Jasiulionis, 2014). Constituintes dos alimentos (nutricionais ou não) são capazes de, através da modulação metabólica e da regulação da expressão gênica influenciar nestes mecanismos epigenéticos (Muller e Kersten, 2003).

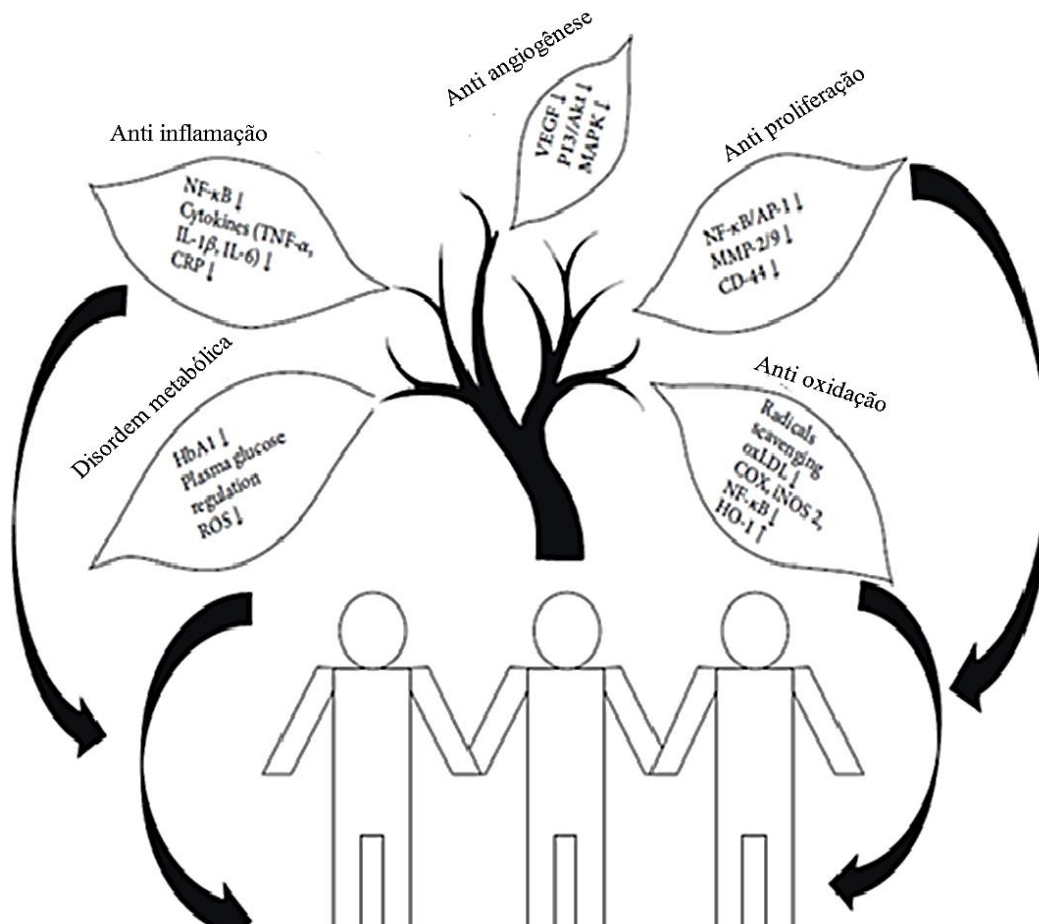
A inflamação, idade, fatores ambientais e estresse oxidativo podem ser eventos iniciais comuns para ambos, neurodegeneração e carcinogênese, como mostrado na Figura 7 (via comum). Em geral, a via comum pode ser um alvo para o desenvolvimento de estratégias

quimioprotetoras e terapêuticas contra o estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas e câncer. Muitas dessas doenças são mais frequentes em pessoas idosas. O envelhecimento é um processo multifatorial derivado da interação entre genética e fatores ambientais. O envelhecimento é acompanhado por um aumento da resposta inflamatória e muitas doenças relacionadas à idade, como as doenças neurodegenerativas e câncer. Doenças crônicas, como doenças cardiovasculares (DCV), diabetes e câncer são problemas mundiais de saúde, e causam a morte e incapacidade para milhões de pessoas. Estudos científicos têm demonstrado que as frutas, vegetais e grãos exercem um efeito protetor contra o desenvolvimento dessas doenças crônicas (Thanan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

O consumo de taioba, assim como de muitas hortaliças, pode apresentar efeitos benéficos para saúde, pois estes vegetais apresentam substâncias bioativas que podem agir contra os efeitos do estresse oxidativo. A taioba é mais conhecida na zona rural e cidades do interior, e dela se aproveitam folhas, talos e o tubérculo. Suas folhas e talos podem ser consumidos refogados ou em omeletes e suflês (Dias *et al.*, 2005). Algumas substâncias bioativas, como os flavonoides, provenientes do metabolismo vegetal, podem atuar como eliminadores de ROS e RNS e regular negativamente os fatores de transcrição envolvidos na progressão do câncer. A inclusão destes compostos na dieta, nas doses recomendadas, pode ser utilizada na prevenção de várias doenças (Kaur *et al.*, 2015).

Estudos epidemiológicos e clínicos indicam que o risco de doenças crônicas não-transmissíveis pode ser reduzido por uma dieta rica em frutas, vegetais e grãos não refinados. Com base nestas evidências verificou-se que substâncias fitoquímicas podem apresentar uma grande variedade de efeitos fisiológicos, os quais incluem a redução de cascatas inflamatórias, do estresse oxidativo, da desordem metabólica, da angiogênese e da proliferação celular, através de diferentes mecanismos, conforme indicado na Figura 8 (Upadhyay, 2015).

Figura 8- Efeitos protetores das substâncias bioativas dos vegetais



Fonte: Adaptado de Upadhyay, 2015.

1.6 Atividade Antitumoral

O câncer representa, globalmente, cerca de 14% de todas as mortes por ano (OMS, 2014). Além de ser um importante problema mundial de saúde é a segunda causa mais comum de morte por doença, após os distúrbios cardiovasculares. A tumorigênese é um processo desencadeado por múltiplos fatores, tipicamente dividido em três fases, incluindo iniciação, promoção e progressão. Apesar do avanço de diversas pesquisas, nenhum declínio evidente na taxa global de mortalidade da maioria dos cânceres tem sido observado nos últimos 30 anos.

A inflamação crônica e o estresse oxidativo persistente desempenham papéis críticos na ativação de vários oncogenes e inativação de genes supressores de tumores, servindo como base patológica da carcinogênese (Kundu *et al.*, 2014).

O desenvolvimento do câncer ocorre quando o equilíbrio entre morte e proliferação celular é perdido. O ciclo celular é regulado por duas famílias de proteínas: as proteínas cinases dependentes de ciclinas (Cdk) e as proteínas ativadoras, denominadas ciclinas. Estas

proteínas formam complexos ciclina-Cdk e atuam no ciclo celular fosforilando proteínas alvo responsáveis pela transcrição de alguns genes essenciais para a continuidade ou parada do ciclo celular. Já as famílias INK4 e CKI atuam na regulação do ciclo celular e nos pontos de checagem, na interfase. Os genes da família INK4 (p16, p15, p18 e p19) atuam na inativação de Cdk4 e Cdk6, especificamente. Os genes da família CKI (p21, p27 e p57) inibem ciclinas e Cdk envolvidas no processo de transição de fase. Nas células tumorais essa regulação está prejudicada, como por exemplo, por redução de ciclina A (Baumer *et al.*, 2015), ou aumento de clina D1 ou E (Leu *et al.*, 2014).

Um dos genes mais extensivamente estudados em biologia tumoral é o p53 que está envolvido em vários processos celulares, incluindo parada do crescimento, senescência, apoptose e reparo de DNA (Ye *et al.*, 2015). Mutações no gene P53 permitem que as células cancerosas sobrevivam e proliferem mesmo com danos no DNA. Esta proteína é importante, pois atua no controle do ciclo celular, na apoptose e na manutenção da estabilidade genética. A proteína p53 exerce seus efeitos no ciclo celular por ligar-se ao DNA e assim induzir a transcrição de p21, que se liga ao complexo de CDK bloqueando sua atividade cinásica e impedindo que a célula entre e progrida pela fase S. As células P53 mutadas não apresentam este controle da divisão celular (Alberts *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2010).

A apoptose é um importante processo fisiológico essencial para o desenvolvimento normal e homeostasia tecidual. Várias pesquisas têm indicado que as mitocôndrias desempenham um papel importante no processo apoptótico. No câncer, o processo de morte por apoptose está geralmente prejudicado devido a mutações em genes supressores de tumores como p21, p53, etc (Foo *et al.*, 2015). O tratamento de células com agentes que têm como alvo a mitocôndria, tais como doxorrubicina e radiação UV, levam à perda do potencial de membrana mitocondrial através da abertura de poros, com mudança de permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando na hiperprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose (Foo *et al.*, 2015).

Por causa da elevada taxa de mortalidade e dos efeitos da quimioterapia e radioterapia, muitos pacientes com câncer buscam meios alternativos de tratamento complementares, tais como plantas medicinais e alimentos funcionais (Abu-Reidah, 2015). Pesquisas realizadas *in vitro* e *in vivo* têm indicado que muitos lipídios e análogos lipídicos são reguladores críticos de tumorigênese. A exploração de tais moléculas na terapia do câncer está em um estágio inicial, mas algumas moléculas já aparecem como promessas consideráveis, como o ácido linoleico (Murray *et al.*, 2015). Por outro lado, a quimioprevenção ganhou muita atenção como estratégia realista na luta contra o câncer. Novas evidências mostraram que compostos bioativos em frutas e legumes podem servir como potenciais agentes quimiopreventivos, os

quais também têm a vantagem de exibir uma baixa toxicidade e baixo custo, sendo reconhecidos como importantes componentes de alimentos saudáveis (Kou *et al.*, 2013).

Substâncias bioativas presentes na dieta podem induzir a morte celular por apoptose em células pré-neoplásicas ou neoplásicas através de diferentes mecanismos, resultando em inibição da progressão tumoral. Neste sentido, vários estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado a importância dos produtos naturais na quimioprevenção do câncer, o que sugere ser o consumo diário de alimentos funcionais uma nova abordagem promissora para a prevenção desta patologia (Kou *et al.*, 2013).

1.7 Inflamação e câncer

A inflamação é definida como uma série de reações bioquímicas e celulares em resposta a estímulos endógenos ou exógenos, que pode ser dividida em aguda ou crônica, ativando macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, dentre outras células, localmente e/ou sistemicamente, a produzirem mediadores pró-inflamatórios tais como ROS, NO, prostaglandina E2 e citocinas (Gutkin e Shurin, 2013; Muller, 2015). A produção de citocinas desempenha um papel crucial na resposta imunoinflamatória e é regulada em nível de transcrição e tradução, através de várias vias de sinalização celular. Certas citocinas atuam mediando a inflamação (pró-inflamatória), ao passo que outras estão envolvidas na redução da inflamação (anti-inflamatória). Métodos para bloquear citocinas potencialmente prejudiciais ao organismo constituem uma área de interesse na prevenção de doenças inflamatórias crônicas e alterações imunológicas (Armutcu *et al.*, 2015).

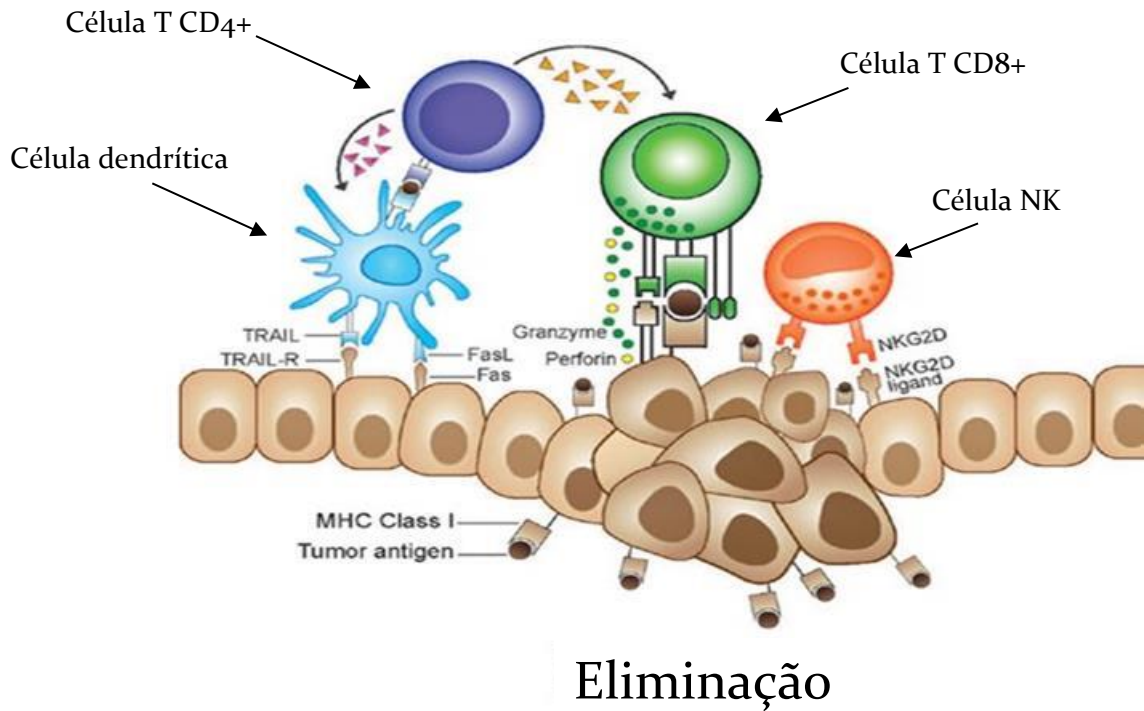
A ligação entre inflamação crônica e câncer tem sido bem demonstrada. O tipo de célula do sistema imune, o estado funcional, o nível de maturação e localização no interior do tumor são importantes parâmetros investigados na avaliação clínica. Os eventos da tumorigênese envolvem células ativadas no microambiente do tumor, incluindo polimorfonucleares infiltrados e células mononucleares de sangue periférico (PBMC), as quais produzem citocinas inflamatórias, que desempenham função crucial na tumorigênese. Fatores adicionais, tais como a expressão de genes regulados por citocinas, produção de fatores de crescimento tumoral, estímulo da angiogênese e inibição da apoptose contribuem para a iniciação e o desenvolvimento do tumor e a migração de células tumorais. Além disso, radicais livres originários e processos inflamatórios promovem mutações e proliferações tumorais (Bhatia *et al.*, 2015).

Para funcionar corretamente, as células do sistema imune precisam detectar uma grande variedade de substâncias, e distingui-las dos constituintes dos próprios tecidos do organismo saudável. As células tumorais expressam antígenos na superfície das células que

não são encontrados em células normais. Esses antígenos (Figura 9) ativam as células do sistema imune para atacar as células do tumor (Bhatia *et al.*, 2015). Células imunológicas efetoras, tais como as células NK, células T CD8⁺ (citotóxicas) e células dendríticas convencionais foram identificadas como células do sistema imunológico que atuam no reconhecimento e eliminação das células tumorais (Figura 9). As células T citotóxicas e células NK são fortemente estimuladas por certas interleucinas, as quais também atuam no processo inflamatório.

Uma grande variedade de funções desempenhadas por células do sistema imune é crucial para o tratamento do câncer. Desta forma, sugere-se que a imunoterapia estimule a resposta imune do hospedeiro contra tumores e pode ser um tratamento antitumoral promissor, quando usado sozinho ou em combinação com outros quimioterápicos. Atualmente a imunoterapia disponível emprega o uso de citocinas/quimiocinas para ativar *in vivo* as atividades antitumorais de células imunitárias distintas ou envolve a ativação de células imunitárias *in vitro* (Peng *et al.*, 2013).

Figura 9- Ação do sistema imune na eliminação das células tumorais



Fonte: Adaptado de www.frontiers.org, 2015.

Uma substância imunoestimuladora é um tipo de imunomodulador que pode reforçar o sistema imunitário do corpo. Uma das direções de investigação em medicina complementar é descobrir imunoestimuladores mais seguros e eficazes que possam ajudar na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças. Por outro lado, muitos medicamentos à base de plantas têm sido extensivamente estudados e alguns deles têm sido aplicados no tratamento clínico por suas importantes propriedades biológicas. Pesquisas têm demonstrado que numerosos metabólitos secundários, tais como os flavonoides, isolados de plantas, possuem diversas funções biológicas, incluindo atividades antioxidantes, imunomoduladoras e antitumorais (Harizi, 2010). Desta forma, a imunomodulação utilizando plantas medicinais pode representar uma possível alternativa para o tratamento de várias doenças.

Sendo a taioba uma hortaliça não convencional pertencente à família Araceae e algumas plantas desta família, como o inhame, ser considerada como alimento funcional, neste estudo os extratos de taioba foram investigados quanto à sua fitoquímica e efeitos biológicos, sendo organizado em três seções distintas de estudo: atividade antioxidante, atividade antitumoral e ação imunomoduladora.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a fitoquímica e o potencial farmacológico do extrato hidroetanólico de *Xanthosoma Sagittifolium* Schott. e suas frações.

2.2 Específicos

- Investigar a ação antioxidante, antileucêmica e imunoreguladora do extrato hidroetanólico a 70% de folhas de *X. sagittifolium* (EFXs);
- Realizar o fracionamento do EFXs e comparar a sua ação antioxidante com as das frações, além de caracterizar quimicamente as frações mais ativas;
- Comparar a ação antileucêmica do EFXs e suas frações, avaliando a citotoxicidade, o ciclo celular, a morte por apoptose, e alguns mecanismos de ação, além de caracterizar quimicamente as frações mais ativas;
- Avaliar a citotoxicidade das frações ativas sobre células não tumorais;
- Comparar a ação imunoreguladora do EFXs e suas frações através da produção de óxido nítrico, e aprofundar os estudos com as frações mais ativas quanto à produção de TNF- α , IL-1 e IL-10 por macrófagos. Além disso, avaliar o efeito do EFXs sobre diferentes subpopulações de linfócitos, além de caracterizar quimicamente as frações mais ativas.

3 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Xanthosoma Sagittifolium* (L.) SCHOTT

3.1 Introdução

Numerosos estudos têm mostrado que a dieta rica em frutas e vegetais reduz a incidência de doenças crônicas e degenerativas (Wen *et al.*, 2015). De acordo com o *World Cancer Research Fund* (2007), tal dieta previne 20% ou mais dos casos de câncer. Essa redução no desenvolvimento de enfermidades crônicas não transmissíveis se dá pela combinação de micronutrientes, agentes antioxidantes e outras substâncias bioativas presentes nestes alimentos (Pereira e Cardoso, 2012). Neste contexto, o uso de substâncias oriundas de alimentos e plantas medicinais para prevenir danos oxidativos tem sido amplamente aceito e estimulado (Kaewseejan e Siriamornpun, 2015).

O ideal é que a população tenha o hábito de uma alimentação saudável e o mais natural possível. Porém, considera-se de grande importância a continuidade dos estudos para a obtenção de evidências sobre a dosagem apropriada de antioxidantes para prevenção de doenças crônicas, sua eficácia e segurança (Goulart *et al.*, 2009). Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são bem conhecidas por apresentarem efeitos deletérios e também benéficos. Os efeitos benéficos de ROS/RNS (por exemplo, superóxido e o óxido nítrico, respectivamente) podem ser observados quando em baixas concentrações, envolvendo funções na fisiologia celular como vias de sinalização intracelular, indução de resposta mitogênica, apoptose ou defesa contra agentes infecciosos (Valko *et al.*, 2007).

As principais espécies ativas do oxigênio distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido (O_2^-), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. As espécies ativas ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila são formadas pela redução sequencial do O_2 . As ROS se distinguem de outras moléculas contendo oxigênio devido à sua meia vida relativamente curta, alta reatividade, difusão através de distâncias curtas, normalmente reagindo somente com moléculas próximas dos locais onde são geradas. As ROS são subprodutos de numerosas vias metabólicas, mas as mitocôndrias representam o principal local na célula onde o O_2 é reduzido. Desta forma, a produção de ROS é diretamente proporcional à atividade celular, considerando-se que a proliferação, a diferenciação, a migração e o crescimento são energeticamente custosos e conseqüentemente, requerem alta atividade respiratória (Hernández-García, Wood, Castro-Obregón e Covarrubias, 2010). As ROS são geradas em resposta a estímulos endógenos (resultantes do metabolismo da célula) e exógenos, tais como, dieta inadequada, exposição à radiação ionizante ultravioleta, condições ambientais impróprias, etc. (Ngo *et al.*, 2012). Há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido à produção excessiva

de ROS ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (Gostner *et al.*, 2013; Farida *et al.*, 2014). Esta condição pode gerar o estresse oxidativo crônico ou cumulativo e induzir modificações deletérias de componentes macromoleculares, tais como o DNA, lipídios e proteínas (Medini *et al.*, 2015).

O controle da produção excessiva de ROS pode ser obtido assegurando níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres; quer melhorando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos), quer evitando comportamentos de risco que levem à maior produção de ROS, como o consumo de tabaco e álcool, ou exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos (Ferreira *et al.*, 2007; Baba e Malik, 2015). A reação em cadeia de radicais livres é um mecanismo comum da peroxidação lipídica, que é um processo através do qual as espécies reativas atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas das células, desintegrando-as e causando vários danos intracelulares. Varredores de radicais livres podem reagir diretamente com o radical peróxido, e interromper as reações em cadeia de peroxidação, que são importantes na patogênese de várias doenças (Aliyu, 2013).

Dentre as espécies reativas de nitrogênio incluem-se o óxido nítrico (NO•), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻). Entre tantos efeitos deletérios causados por espécies reativas de nitrogênio podemos citar o estresse nitrosativo, caracterizado pela superprodução de RNS, que pode ocorrer quando a geração de RNS em um sistema exceder sua capacidade de neutralização e eliminação. O estresse nitrosativo pode conduzir a reações de nitrosilação que podem alterar a estrutura das proteínas e, assim, alterar sua atividade (Valko *et al.*, 2007). As RNS são normalmente geradas por enzimas fortemente reguladas, tais como a óxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a reação de síntese de óxido nítrico através da oxidação de um dos dois nitrogênios do grupamento guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina (Dusse *et al.*, 2003).

O óxido nítrico é um segundo mensageiro especial e seus efeitos biológicos são atribuídos ao seu pequeno tamanho, facilidade de difusão e ação como radical livre. Dentre outras características o NO é um dos mais importantes mediadores dos processos intra e extracelulares. O NO atua na vasodilatação, no coração, em nervos periféricos e centrais, em células do sistema imune, assim como agente antimicrobiano, nos sistemas respiratórios, endócrino e gastrointestinal (Yunes e Calixto, 2001).

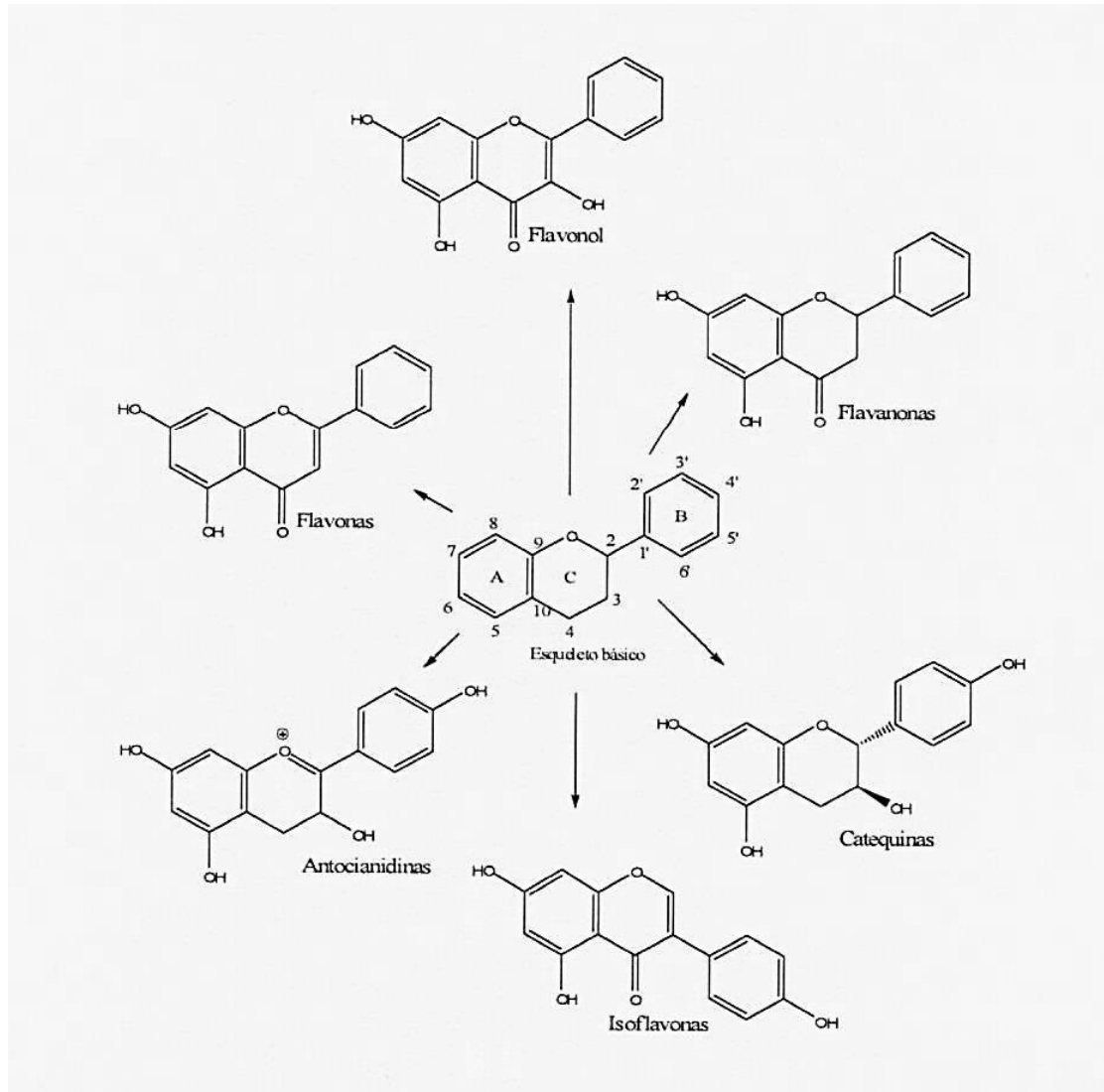
Os agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (de baixo peso molecular). Estes podem ser de natureza endógena (sintetizados no próprio organismo), como a glutathiona (GSH), ou exógena (oriundos da dieta, suplementos, medicamentos). As enzimas

antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), tioredoxina redutase, óxido nítrico sintase, heme oxigenase-1, peroxidase de eosinófilos e metalotioneína podem contrabalançar microambientes oxidativos por neutralizar ou reduzir a concentração de superóxido, vários peróxidos e outras espécies ativas do oxigênio (Matés *et al.*, 2012).

Os antioxidantes de baixo peso molecular (não enzimáticos) estão presentes em número e concentração maiores que os antioxidantes enzimáticos e distribuídos em ambientes lipofílicos ou hidrofílicos (Goulart *et al.*, 2009, Goulard e Vasconcelos, 2006). Algumas vitaminas como a vitamina C (ácido ascórbico), E (α -tocoferol) e A (retinal), outros produtos naturais (carotenoides, flavonoides, fitoestrogênios, outros polifenóis, furanoides e tióis), produtos sintéticos (Ebselen, N-acetilcisteína e Trolox) e produtos endógenos (poliaminas, melatonina, NADPH, adenosina, urato, coenzima Q-10 (ubiquinol), hormônio do crescimento (GSH), cisteína, homocisteína, taurina, metionina, S-adenosil-L-metionina, nitróxidos e selênio são considerados antioxidantes de baixo peso molecular ou antioxidantes químicos (Goulard *et al.*, 2009; Matés *et al.*, 2012).

Dentre os antioxidantes de origem natural, os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados, e que se apresentam frequentemente oxigenados. Os flavonoides (Figura 10) podem ser divididos em subclasses como flavan-3-ol, flavona, flavonol, flavanona, flavononol, antocianidina, chalcona e aurona, subdivisão esta que ocorre de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico (Dewick, 2002; Barbosa, 2012). Um grande número de flavonoides ocorre na forma conjugada a açúcares, ou heterosídica, enquanto a forma sem o açúcar é chamada de aglicona ou genina. Várias são as classes de flavonoides que estão presentes nos alimentos naturais e evidências científicas indicam que seu consumo através da alimentação pode atuar na prevenção de doenças crônicas (Gulcin *et al.*, 2007). A presença de antioxidantes atribui qualidade a componentes bioativos e funcionais de plantas medicinais e alimentos (Singh e Kumari, 2015).

Figura 10- Núcleo básico do flavonoide e algumas de suas subclasses.



Fonte: Adaptado de Dewick, 2002 apud Barbosa, 2012.

As principais fontes alimentares de flavonoides incluem cebola e brócolis (flavonóis), chá verde e chá vermelho, vinho e chocolates (flavanóis), salsa e aipo (flavonas), soja (isoflavonas), citrinos e tomate (flavanonas) e vinho tinto e bagas (antocianidinas) (Johnston, 2015; Latif, 2015). Alguns flavonoides têm sido considerados como nutracêuticos, devido à sua ocorrência generalizada na nossa dieta e suas diversas propriedades farmacológicas. Além disso, alguns são utilizados como suplementos dietéticos (Johnston, 2015) e têm sido identificados na família Araceae. Apesar da importância econômica dessa família que apresenta rizomas e folhas comestíveis e nutritivas e uma diversidade de usos por culturas indígenas nos trópicos, não há muitos estudos quanto aos seus constituintes químicos. Trabalhos anteriores sobre teor de flavonoides na família mostrou que a Araceae tem um perfil simples, formado geralmente por C-glicosídeos de flavona, flavonóis, flavonas e pró-antocianidinas (Williams *et al.*, 1981).

A família Araceae mostra atividades benéficas importantes e entre as espécies do gênero *Xanthosoma*, *X. sagittifolium* é geralmente considerada como a principal espécie cultivada e, portanto, a composição dos seus rizomas e folhas tem sido estudada no que diz respeito aos minerais, hidratos de carbono, fenóis e carotenoides (Picerno *et al.*, 2003). *X. sagittifolium*, uma planta dessa família, vulgarmente conhecida como taioba, é nativa das Américas tropicais e distribuídas em todas as regiões tropicais, Sudeste da Ásia, e Oceania. São ricas em nutrientes e consumidas como alimento em algumas regiões do Brasil (Jackix *et al.*, 2013). Os micronutrientes e substâncias não nutritivas de plantas têm sido relacionados a efeitos antioxidantes e anticancerígenos, demonstrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lee *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que o consumo da folha de taioba por ratos normais reduziu o risco de câncer de cólon (Jackix *et al.*, 2013). Apesar do uso popular desta planta como alimento, não há evidências científicas sobre seus extratos bioativos e frações. Assim, esta etapa do trabalho visou avaliar os efeitos antioxidantes e o perfil químico do extrato hidroetanólico das folhas *Xanthosoma sagittifolium*.

3.2 Objetivos específicos

- Fracionar o extrato hidroetanólico de folhas de *Xanthosoma sagittifolium* (taioba);
- Investigar no extrato bruto e nas frações polares os seguintes parâmetros quanto à ação antioxidante:
 - Capacidade de neutralização do radical DPPH;
 - Capacidade quelante de íons ferrosos;
 - Peroxidação lipídica;
 - Concentração intracelular de espécies ativas do oxigênio;
- Realizar a caracterização química das amostras e frações mais ativas.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Obtenção do extrato bruto e fracionamento

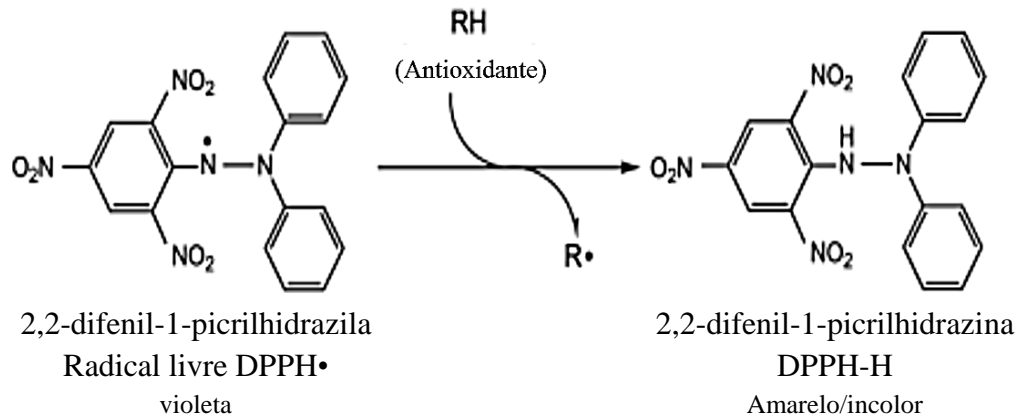
Folhas de *X. sagittifolium* foram coletadas em Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil, em Junho de 2010 e identificadas pela Dra. Cassia Sakuragui, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob o número (RB 432051), e outra no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (ainda sem número), RJ, Brasil. As folhas de *X. sagittifolium* foram pesadas ainda frescas e secas em estufa a 40°C por 7 dias para obtenção do rendimento em massa seca. As folhas foram maceradas em repouso separadamente em etanol 70% durante duas semanas (10 g/500 mL), no escuro, e o extrato bruto de folhas (EFXs) foi obtido após evaporação sob vácuo (evaporador rotatório Pemen®, com bomba de vácuo, da Cole Parmer Instrument Company, modelo 7049-50 e banho Fisatom®, modelo 550, 1200 W, 230 V). Foram preparadas três partidas de extrato bruto de folhas de *X. sagittifolium*. Para o fracionamento do EFXs, 800 mg foram suspensos em H₂O:MeOH (9:1 v/v) e submetidos à partição líquido-líquido com 200 mL de hexano, 200 mL de diclorometano e 200 mL de acetato, subsequentemente. As respectivas frações FHEX, FDCM, FAcET foram separadas e concentradas por evaporação, sendo o resíduo aquoso congelado e liofilizado (liofilizador Labconco®), gerando o resíduo aquoso (FAq).

3.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

3.3.2.1 Método de neutralização do radical DPPH

A atividade antioxidante foi determinada segundo Mensor e colaboradores (2001). O radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é de cor violeta, e pode ser reduzido na presença de moléculas antioxidantes formando o 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de cor amarelo ou incolor (Figura 11). Essa mudança de coloração permite analisar a capacidade antioxidante ou sequestradora de radicais de cada amostra e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (Goulart *et al.*, 2009). Este ensaio é baseado no fundamento de que um doador de hidrogênio é um antioxidante (Moon e Shibamoto, 2009).

Figura 11- Reação entre o DPPH e um antioxidante para formar DPPH-H



Fonte: Adaptado de Moon e Shibamoto, 2009

O ensaio foi realizado adicionando-se 100 μL de solução de DPPH 0,3 mM (Sigma®) a 100 μL da solução de cada amostra (A) diluída com etanol para as concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nos brancos (B), em lugar do DPPH, adicionou-se 100 μL de etanol às amostras nas mesmas concentrações. O controle negativo (C) foi preparado com 100 μL de DPPH e 100 μL de etanol. O ácido gálico foi utilizado como substância antioxidante padrão, com o qual foi realizada uma curva padrão nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As reações transcorreram à temperatura ambiente durante 30 min. Em seguida, foram feitas as leituras de absorvância a 518 nm no leitor de microplacas (Biot-Tek Instruments Inc., modelo μQuant). Os testes foram realizados em triplicata. Os valores das absorvâncias foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AAO%) conforme a fórmula: $\text{AAO}\% = 100 - \{[(\text{Abs}_a - \text{Abs}_b) \times 100] / \text{Abs}_c\}$

Onde:

Abs_a = Absorvância da amostra

Abs_b = Absorvância do branco

Abs_c = Absorvância do controle

3.3.2.2 Capacidade Quelante do Íon Ferroso

Este ensaio foi realizado de acordo com o método de Wang e colaboradores (2009), com pequenas modificações. Se baseia na medida da absorvância de luz pelo complexo ferro II – ferrozina, após o tratamento de uma solução de ferro II com o material a ser testado e com a ferrozina. A ferrozina forma um complexo com o Fe^{2+} livre, mas não com o Fe^{3+} ligado a quelantes, dessa forma, uma diminuição na quantidade do complexo ferrozina- Fe^{2+} , formado após o tratamento, indica a presença de composto antioxidante por ação quelante. O complexo ferrozina- Fe^{2+} produz um cromóforo vermelho (Figura 12) e a sua absorvância pode ser determinada a 562 nm (Sfalcin, 2007). Na presença de agentes quelantes, a formação do complexo é interrompida, o que resulta numa diminuição da cor vermelha. A medição da redução de cor, portanto, permite a estimativa da atividade metal-quelante (Guo *et al.*, 2011). A 100 μL de cada amostra (concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram misturados 140 μL de solução aquosa de FeCl_2 71,4 μM (Merck®). A reação foi iniciada pela adição de 10 μL de ferrozina 5 mM (Sigma-Aldrich®). As soluções foram mantidas sob agitação durante 10 min em temperatura ambiente. Após a incubação, a absorvância (Abs) foi medida em leitor de microplacas a 562 nm. Para verificar a interferência das amostras (A), o branco (B) de cada amostra foi preparado com água destilada (10 μL) ao invés da solução de ferrozina. Água destilada (100 μL) em vez da solução de amostra foi utilizada como controle negativo (C). O padrão de quercetina (Merck®) foi usado como controle positivo nas mesmas condições usadas para as amostras. A capacidade quelante de íons ferrosos (CQFe) foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{CQFe (\%)} = [1 - (\text{Abs}_a - \text{Abs}_b) / \text{Abs}_c] \times 100$$

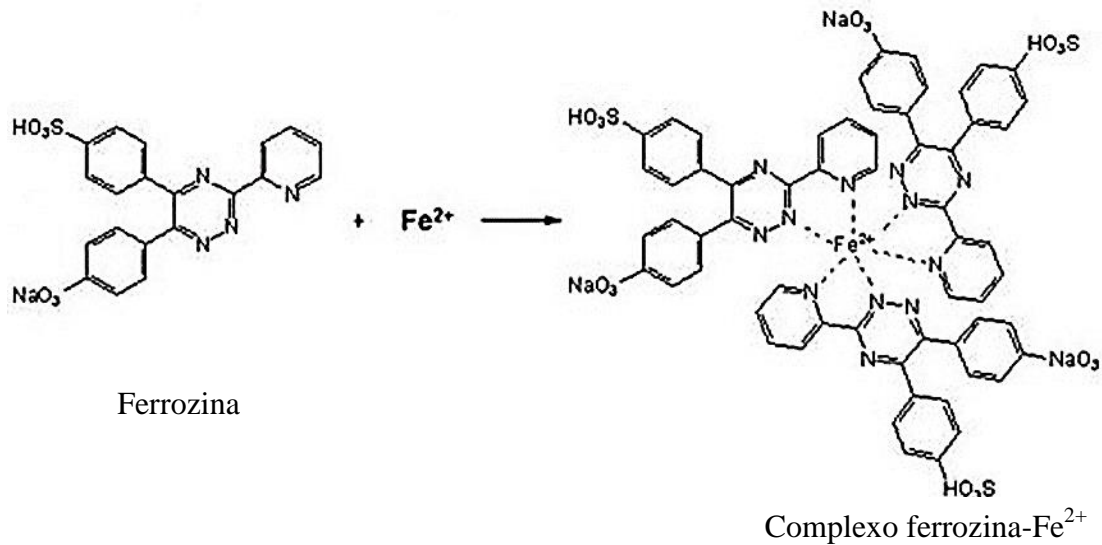
Onde:

Abs_a = Absorvância da amostra

Abs_b = Absorvância do branco

Abs_c = Absorvância do controle

Figura 12- Formação do complexo Fe II- Ferrozina vermelho



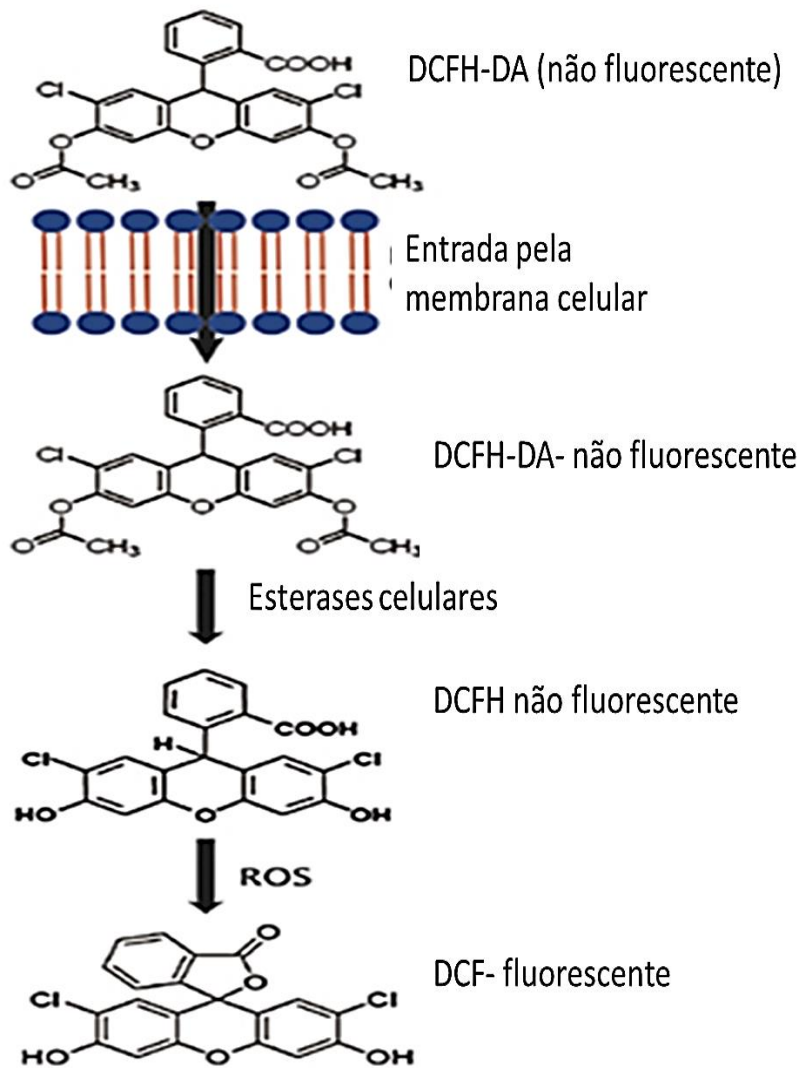
Fonte: Adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>. Acesso em setembro de 2015.

3.3.2.3 ROS intracelular por citometria de fluxo

A produção intracelular de ROS por macrófagos foi estimada utilizando a sonda DCFH-DA (2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato), como descrito por Tiwari e colaboradores (2010). A sonda DCFH-DA se difunde pela membrana e no citoplasma tem dois moles de acetato hidrolisados por esterases, formando o DCFH não fluorescente, que então reage com o ROS, tornando-se DCF que é fluorescente (Figura 13). Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em garrafas de cultura (50 mL) contendo 5 mL de meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbeco) adicionado de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) 15 mM HEPES (N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para realização do experimento as células foram soltas através de uma leve raspagem, contadas, distribuídas em placa de 6 poços (3 mL) a 5×10^5 /mL e incubadas *overnight* para adesão à placa. Posteriormente, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) e tratadas ou não com as amostras de *X. sagittifolium* na concentração de 25 ou 50 µg/mL ou quercetina, nas mesmas concentrações, por 24 h a 37°C, 5% de CO₂. A quercetina, um flavonoide com reconhecida atividade antioxidante foi utilizado como controle positivo. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS (140 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 8 mM Na₂HPO₄ + 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e incubadas com 10 µL da sonda DCFH-DA (concentração final 5 mM) por 30 min, no escuro. Em seguida, as células foram centrifugadas por 3 min a 400 x g e posteriormente suspensas em 400 µL de PBS, para leitura no citômetro de fluxo, onde foram avaliados 50.000 eventos por amostra. A

intensidade de fluorescência da sonda foi detectada no canal FL-1. Os resultados foram expressos como mediana de intensidade de fluorescência (MIF) da sonda em cada grupo de amostras, normalizados em relação ao controle (considerado como 100%). As análises foram feitas pelo programa Summit Versão 4.3.

Figura 13- Determinação de espécies reativas de oxigênio pela sonda DCFH-DA



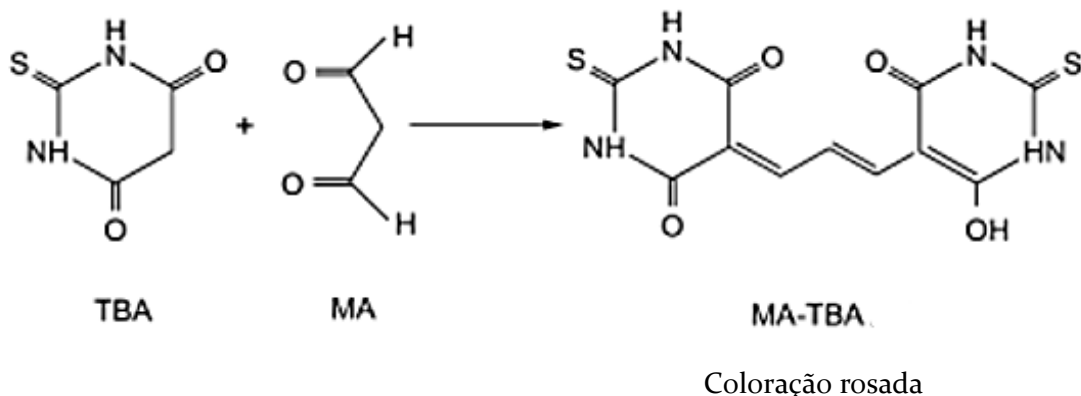
Fonte: Adaptado de www.cosmobio.co.jp, 2015.

3.3.2.4 Ensaio de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação do malondialdeído (MDA), um produto de decomposição de peróxidos lipídicos, tal como descrito por Fraga e colaboradores (1982). Durante o processo de peroxidação lipídica são produzidos aldeídos, e dentre os mais abundantes encontra-se o 1,1,3,3-tetraethoxypropane (MDA), que reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), originando MDA-TBA, que é colorido (Figura 14), e, portanto, detectável por espectrofotometria. O malonaldeído não é o único produto de oxidação dos lipídios que reage com o TBA: os 4-hidroxicenais, os 2,4-alcadienais e os 2-alcenais também formam cromogênicos. Para realização do ensaio as células RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram incubadas em placas de 24 poços *overnight* para adesão, e posteriormente incubadas sem ou com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ e amostras de *X. sagittifolium* durante 24 h. Cada sobrenadante (100 μL) foi misturado com 200 μL de TCA 45%. As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 7500 x g, o sobrenadante foi misturado com 200 μL de TBA e em seguida aquecido a 95°C durante 20 min. Uma curva padrão (0,5 a 20 μM) de MDA também foi determinada. A absorvância foi lida a 532 nm e os resultados de peroxidação lipídica foram expressos como nmol de equivalentes de MDA. As concentrações foram determinadas através da curva por regressão linear:

$$\text{Curva: } y = a * x + b$$

Figura 14- Reação de Malonaldeído (MA) com ácido tiobarbitúrico (TBA)



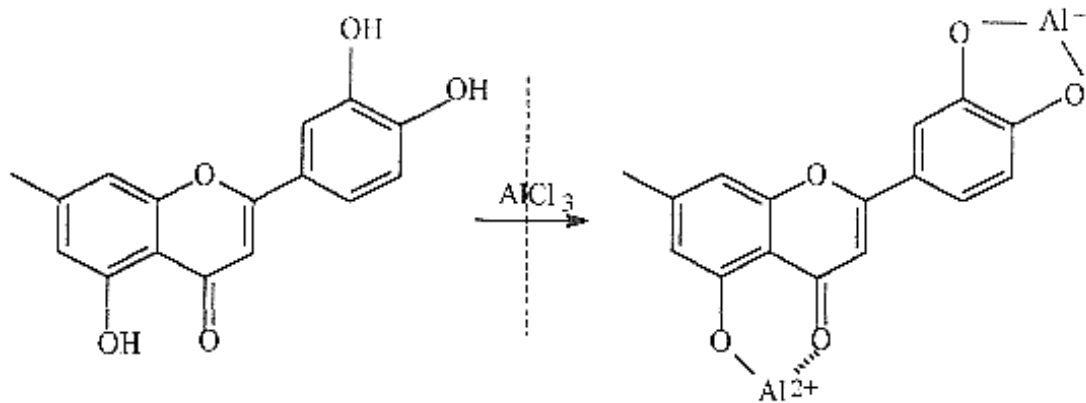
Fonte: Adaptado de Moon e Shibamoto, 2009.

3.3.3 Caracterização química

3.3.3.1 Dosagem de substâncias fenólicas totais

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu, de acordo com Victório e colaboradores (2010), com algumas modificações, utilizando-se o ácido gálico como polifenol de referência. Este método consiste em misturar os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com cor amarela). Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)_4]^{4-}$ azuis (Figura 15), cuja coloração permite a determinação da concentração de substâncias redutoras no meio (Goulart *et al.*, 2009). As amostras vegetais foram preparadas a 1 mg/mL com o solvente etanol. A 50 μL de cada amostra foram adicionados 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (Spectrum®) 10% em água. Após 5 min sob agitação, foram adicionados 100 μL de solução de Na_2CO_3 (Vetec®) 7,5% em água. A reação transcorreu durante 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, a absorvância das amostras foi medida a 740 nm em leitor de microplacas (Biot-TekInstruments Inc., modelo μQuant). Dois controles foram preparados: 1) 50 μL de solvente (etanol) + 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu + 100 μL da solução de Na_2CO_3 ; 2) 50 μL de amostra + 100 μL de solvente (etanol) + 100 μL da solução de Na_2CO_3 (Costa, 1982). O teor de substâncias fenólicas totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 15,6; 31,25; 62,5; 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos como mg de EqAG (equivalentes de ácido gálico) por g de amostra.

Figura 16- Formação do complexo flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.



Fonte: Adaptado de Markham, 1982.

3.3.3.3 Análise por espectrometria de massas com ionização por elétron spray (ESI-MS)

Utilizou-se o espectrômetro LCQ Fleet TM (Thermo Scientific), equipado com fonte de ionização por *spray* de elétrons, operando no modo negativo, com analisador do tipo *ion trap*. As amostras foram diluídas em 200 μL de metanol (MeOH) na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e foram injetadas (20 μL) por meio de inserção direta. Foi utilizado o programa Xcalibur para obtenção dos espectros na faixa de 100–1500 m/z . O detector foi um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (captura de íons) equipado com uma interface IES, sendo a análise controlada pelo *software* LCMSD (Agilent, v 4,1). As condições de ionização foram ajustadas para 350°C e 4 kV para a temperatura capilar e voltagem, respectivamente. A pressão de nebulização e taxa de fluxo de nitrogênio foram 65,0 psi e 11 L/min, respectivamente.

3.3.3.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O extrato bruto e as partições mais polares, acetato e aquosa, foram avaliados por HPLC acoplada ao detector de fotodiodo (HPLC-DAD) em aparelho Shimadzu, constituído por duas bombas LC-10AD, desgaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e colunas Inertsil ODS3 (RP18 de 250 x 4.6 x 5 mm). Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A e *software* Shimadzu CLASS-VP, versão 6.145P1. As amostras foram diluídas em 2 mL de acetonitrila e injetados 10 μL de cada amostra. A eluição foi realizada por gradiente utilizando-se diferentes proporções dos solventes A e B (A: Água + H_3PO_4 0,01%; B: Acetonitrila). A análise transcorreu em um tempo total de 75 min com fluxo de 1 mL/min. A metodologia aplicada para eluição foi: 0 min = 5% B; 30 min =

50% B; 55 min = 70% B; 58 -75 min = 100% B; Os picos majoritários foram estudados quanto ao seu espectro de absorção por HPLC-DAD.

3.3.4 Análise estatística

A variância entre os diferentes grupos foi analisada pelo teste One-way ANOVA e as significâncias das diferenças entre as amostras foram avaliadas pelo teste de Tukey (Prism 5 Graphpad). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

3.4 Resultados

3.4.1 Rendimentos da produção do extrato e partição líquido-líquido

Três amostras de folhas de *X. sagittifolium* foram pesadas ainda frescas e depois de secas por 48 h na estufa a 40°C, para obtenção da massa seca (Tabela 2). A partir dos rendimentos observados, verifica-se que aproximadamente 86% do peso das folhas é constituído de água.

Tabela 2- Massa fresca e seca e rendimentos das três diferentes partidas de folhas de *X. Sagittifolium* utilizadas no preparo do extrato bruto

Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Rendimento (%)
136,00	18,90	13,8%
1,48	0,20	13,5%
2,63	0,34	12,6%

Depois do processo de maceração das folhas em etanol a 70%, que durou duas semanas, e após evaporação, foi obtido o extrato bruto de folhas, com rendimento de 20% do total da massa inicial (Tabela 3).

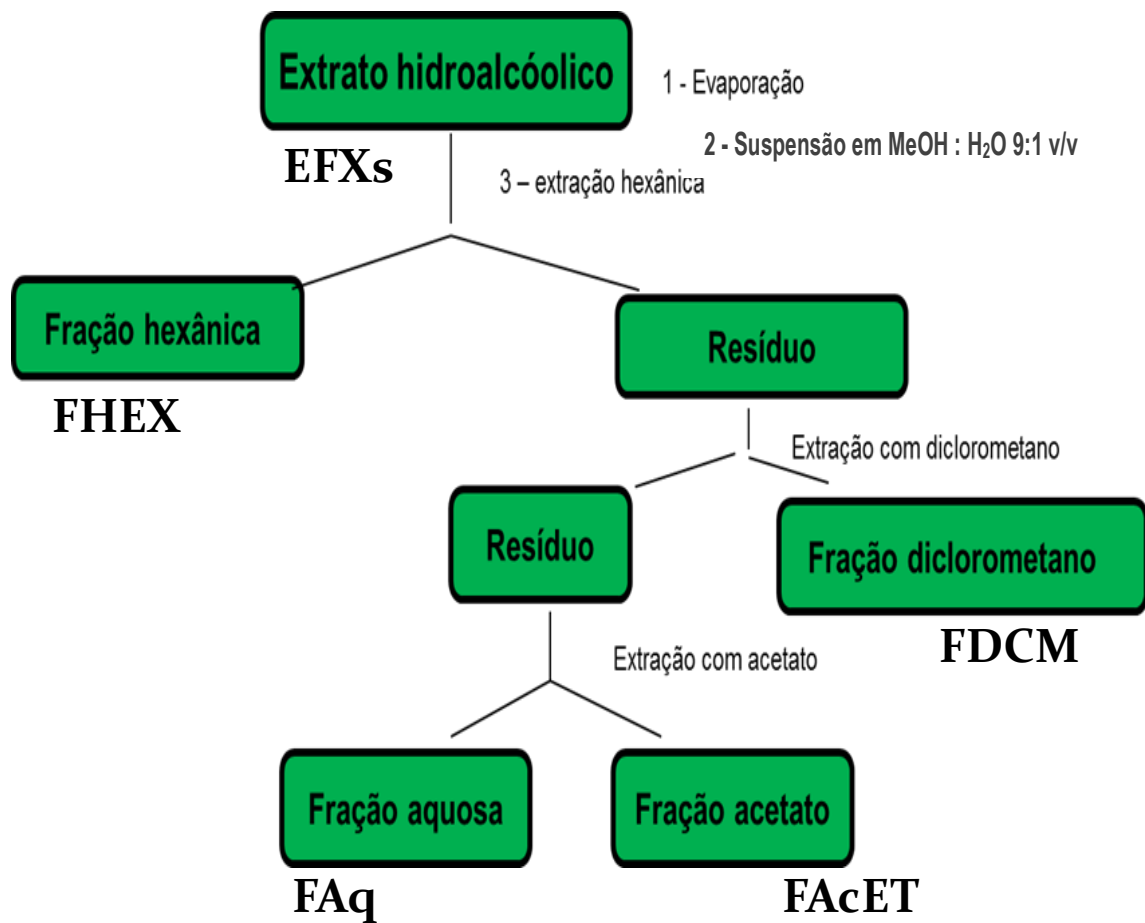
O extrato bruto de folhas de *X. sagittifolium* foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, conforme indicado na Figura 17, utilizando-se 800 mg do extrato bruto. Avaliando-se o rendimento das frações (Tabela 3), verificamos que o resíduo aquoso apresentou maior rendimento (45,8%), seguido da fração hexano (27,4%) e que em

massa foram obtidos 219,2 mg da FHEX; 120 mg da FDCM, 24,5 mg da FAcET e 367 mg do FAq.

Tabela 3- Massas e rendimentos das diferentes amostras obtidas de folhas de *X. Sagittifolium* durante o processo de fracionamento por partição líquido-líquido do extrato bruto hidroetanólico 70%.

Amostras	Massa (mg)	Rendimento (%)
Extrato bruto	800,0	20,0%
FHEX	219,2	27,4%
FDCM	120,0	15,0%
FAcET	24,5	3,1%
FAq	367,0	45,8%

Figura 17- Esquema de fracionamento do extrato hidroetanólico 70% de *X. sagittifolium*

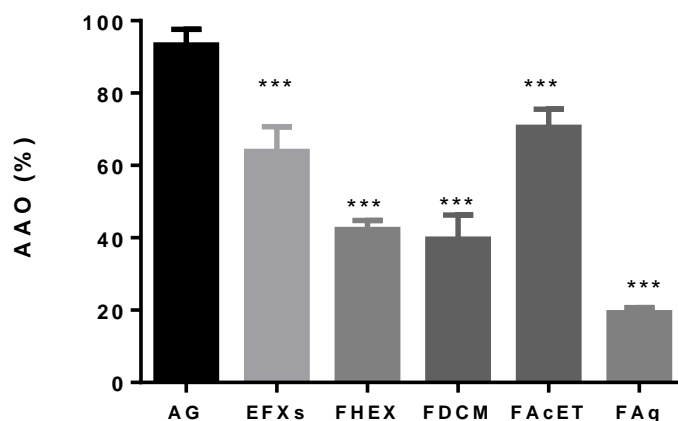


3.4.2 Ação antioxidante de amostras de *Xanthosoma sagittifolium*

Este trabalho investigou a atividade antioxidante (AAO%) do extrato bruto e suas frações através da avaliação da capacidade de neutralizar o radical DPPH, quelar íons ferrosos e reduzir os níveis intracelulares de ROS. Além disso, foi determinado o conteúdo total de polifenóis e flavonoides, além da caracterização fitoquímica das amostras mais ativas, por métodos cromatográficos.

A capacidade de neutralização do radical DPPH pelo EFXs e FACET foi similar a do ácido gálico (AG), porém mais elevada que a das amostras FHEX, FDCM e FAq (Figura 18). A média da AAO do ácido gálico foi de $96,10 \pm 0,103$, enquanto as do EFXs e da FACET foram $63,9 \pm 6,8$ e $70,5 \pm 5,0$, respectivamente.

Figura 18- Atividade antioxidante do EFXs e frações pelo ensaio do DPPH.

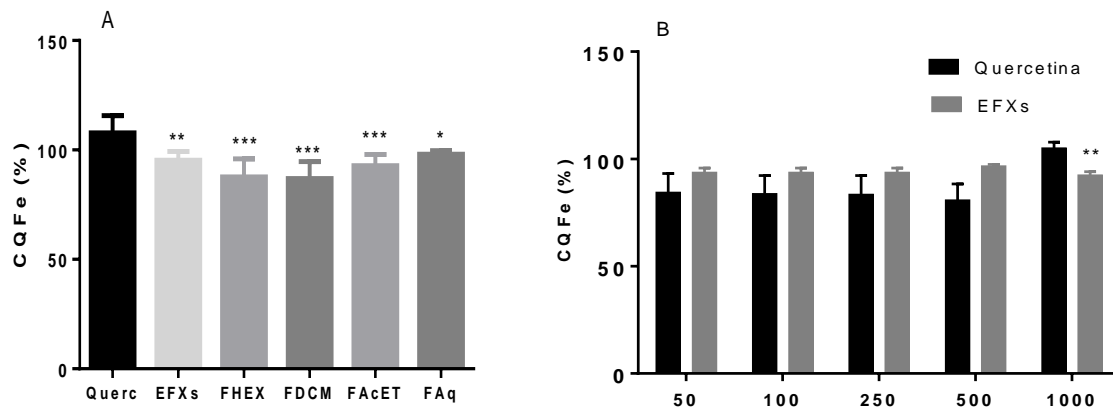


Legenda: As amostras e o ácido gálico (AG) (substância antioxidante usada como padrão) foram testadas a 1 mg/mL. EFXs significa extrato hidroetanólico de folhas de *X. sagittifolium*. As frações hexânica, diclorometano, acetato e aquosa foram denominadas FHEX, FDCM, FAcET e FAq, respectivamente. Os resultados representam a média \pm DP de pelo menos três experimentos realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao ácido gálico (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

3.4.3 Determinação da capacidade quelante de íons ferrosos

Todas as amostras avaliadas apresentaram alta capacidade quelante de íons ferro, tal qual o padrão quercetina (Figura 19A). As amostras EFXs, FHEX, FDCM, FAcET e FAq foram capazes de quelar 95,2%; 87,6%; 86,9% e 98,1% dos íons ferrosos, respectivamente. O extrato bruto, mesmo quando testado em baixas concentrações, continuou apresentando alta atividade quelante de ferro, semelhante à quercetina (Figura 19B)

Figura 19- Capacidade quelante de ferro (CQFe) do extrato hidroetanólico de folhas de *X. sagittifolium* (EFXs) e suas frações.

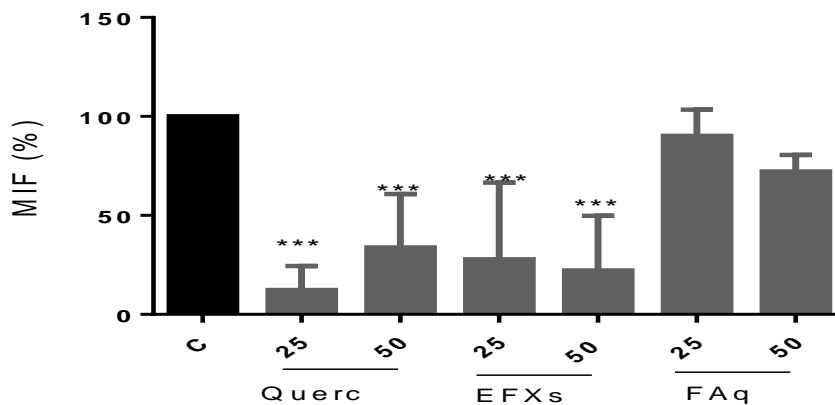


Legenda: (A) Ação das diferentes amostras a 1000 µg/mL. (B) Ação comparativa do EFXs com a quercetina em diferentes concentrações. Frações Hexano (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etila (FACET) e aquosa (FAq). Os resultados representam a média ± DP de pelo menos três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação à quercetina (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

3.4.4 Efeito do EFXs e FAq na concentração intracelular de ROS

A Figura 20 mostra os efeitos das amostras de *X. sagittifolium* na concentração de ROS em células RAW 264.7, expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF) da sonda DCFH-DA, normalizada em relação ao controle (considerado como 100%). As células estimuladas com LPS e tratadas com quercetina (25 e 50 µg/mL) apresentaram inibições de 87,3% e 66,2%, respectivamente, na produção de ROS. O EFXs também apresentou redução na produção de ROS em ambas as concentrações testadas (72,1% e 77,8%, respectivamente), enquanto a FAq apresentou redução de ROS (27,8%) somente na concentração de 50 µg/mL. A FAcEt também foi investigada, mostrando inibição da produção de ROS, porém esse resultado não foi considerado importante (não mostrado), pois mostrou 26,51% de toxicidade sobre as células de RAW 264.7, pelo ensaio do MTT, sugerindo que a redução de ROS esteja relacionada com a morte celular, o que não aconteceu com o EFXs.

Figura 20- Efeito do EFXs e FAq nos níveis de ROS em células RAW 264.7.

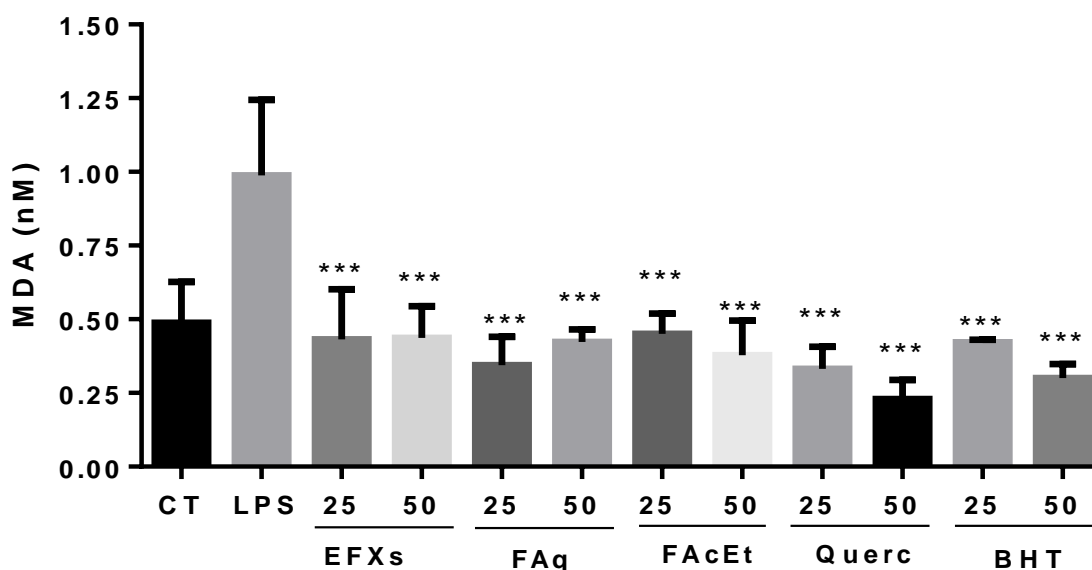


Legenda: Células RAW 264.7 (5×10^5 /mL) foram incubadas com 1 μ g/mL LPS (C; controle), com ou sem as amostras, por 24 h, e depois processadas para marcação com a sonda DCFH-DA. Querc: quercetina; EFXs: extrato de folhas de *X. sagittifolium*; e FAq: fração aquosa. Os resultados encontram-se expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF) da sonda, normalizada em relação ao controle de cada experimento (considerado como 100%). Dados representam média \pm DP de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao controle, pelo One-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

3.4.5 Efeito do EFXs e frações polares na peroxidação lipídica em células RAW 264.7

No ensaio de inibição de peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), a quercetina e o BHT (butil-hidroxitolueno), um antioxidante sintético muito utilizado na indústria de alimentos, foram usados como controles positivos. Através deste ensaio pode-se observar que os tratamentos com o EFXs e as frações polares, em ambas as concentrações, inibiram significativamente o processo de peroxidação lipídica em células RAW 264.7 estimuladas por LPS (Figura 21). Os valores de inibição apresentados pelas amostras de *X. sagittifolium* não apresentaram diferença significativa, em relação ao controle com LPS. A fração aquosa (FAq), mostrou inibição média das duas concentrações de 61,2%, valor similar aos dos controles positivos BHT e quercetina, que apresentaram média de inibição de 67,6%. O EFXs e FAcEt mostraram inibição média de 56,3% e 58,5%, respectivamente. Quanto maior a peroxidação lipídica maior o indicativo de estresse oxidativo celular. O tratamento das células estimuladas pelo LPS com as amostras de *X. sagittifolium*, reverteu a peroxidação lipídica das células ao nível da cultura controle (CT), não estimulada com LPS.

Figura 21- Efeito de amostras de *X. sagittifolium* na peroxidação lipídica de células RAW 264.7, pelo ensaio de TBARS.



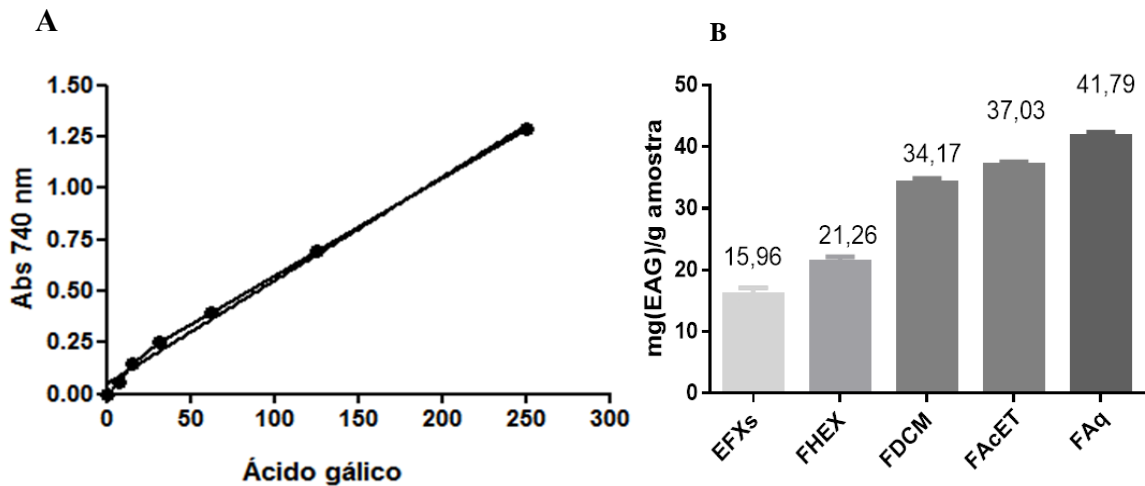
Legenda: Células RAW 264.7 (5×10^5 /mL) foram incubadas sem LPS (controle ou CT) ou com 1 μ g/mL LPS (CT + LPS) e/ou amostras por 24 h e depois processadas para determinação da peroxidação lipídica. EFXs: Extrato de folhas de *X. sagittifolium*; FAq: fração aquosa; FAcET: Fração acetato de etila; Querc: quercetina; BHT: butil-hidroxitolueno. Resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com LPS, pelo One-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

3.4.6 Caracterização química das amostras ativas de *X. sagittifolium*

3.4.6.1 Determinação do teor de substâncias fenólicas totais

Com o objetivo de avaliar se a atividade antioxidante observada nas amostras de *X. sagittifolium* poderia estar relacionada ao conteúdo de polifenóis, resolvemos quantificar a presença destes compostos no EFXs e suas frações. A Figura 22A mostra a regressão linear da curva padrão de ácido gálico, utilizada na dosagem de fenois totais das amostras da planta. Na Figura 22B verifica-se que as frações mais polares, FAq e FacET, assim como a fração diclorometano- FDCM, foram as que apresentaram maior quantidade de polifenóis (41,79 mg e 37,03 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de amostra, respectivamente).

Figura 22- Quantificação de substâncias fenólicas totais no extrato hidroetanólico de folhas de *X. sagittifolium* e suas frações.

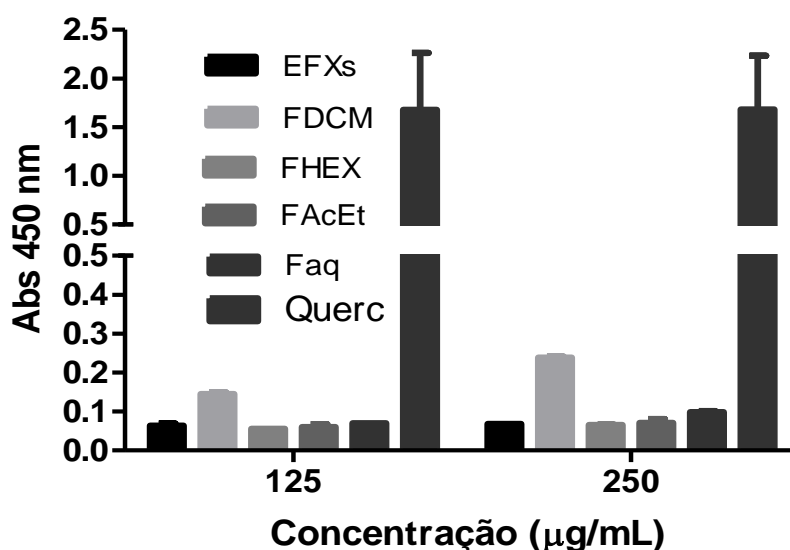


Legenda: (A) Curva padrão de ácido gálico. (B) Teor de polifenóis expresso em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de amostra). EFXs: extrato bruto de *X. sagittifolium*; FHEX: fração hexano; FDCM: fração diclorometano; FACET: fração acetato de etila; FAq: fração aquosa EAG: Equivalente de ácido gálico. As amostras foram testadas a 1 mg/mL. Os resultados representam a média \pm DP de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.4.6.2 Dosagem de Flavonoides

Como os flavonoides representam um importante grupo de substâncias fenólicas e também são descritos como agentes antioxidantes, tais substâncias também foram quantificadas nas amostras de *X. sagittifolium* (Figura 23). Esta figura mostra que tanto o extrato bruto (EFXs) quanto as frações apresentam baixo teor de flavonoides por este método, quando comparados à solução de quercetina na mesma concentração (incluída no gráfico, absorvância muito alta), ou mesmo comparada com a concentração de 62,5 μ g/mL, que apresentou absorvância de 0,58 (não mostrado). A FDCM, dentre as amostras, foi a que apresentou o maior teor de flavonoides. Para um estudo mais detalhado da composição química das frações mais ativas, as frações polares FACET e FAq, estas foram analisadas por ESI-MS e HPLC-DAD.

Figura 23- Comparação do teor de flavonoides no extrato hidroetanólico de folhas de *X. sagittifolium* e suas frações com a quercetina nas mesmas concentrações

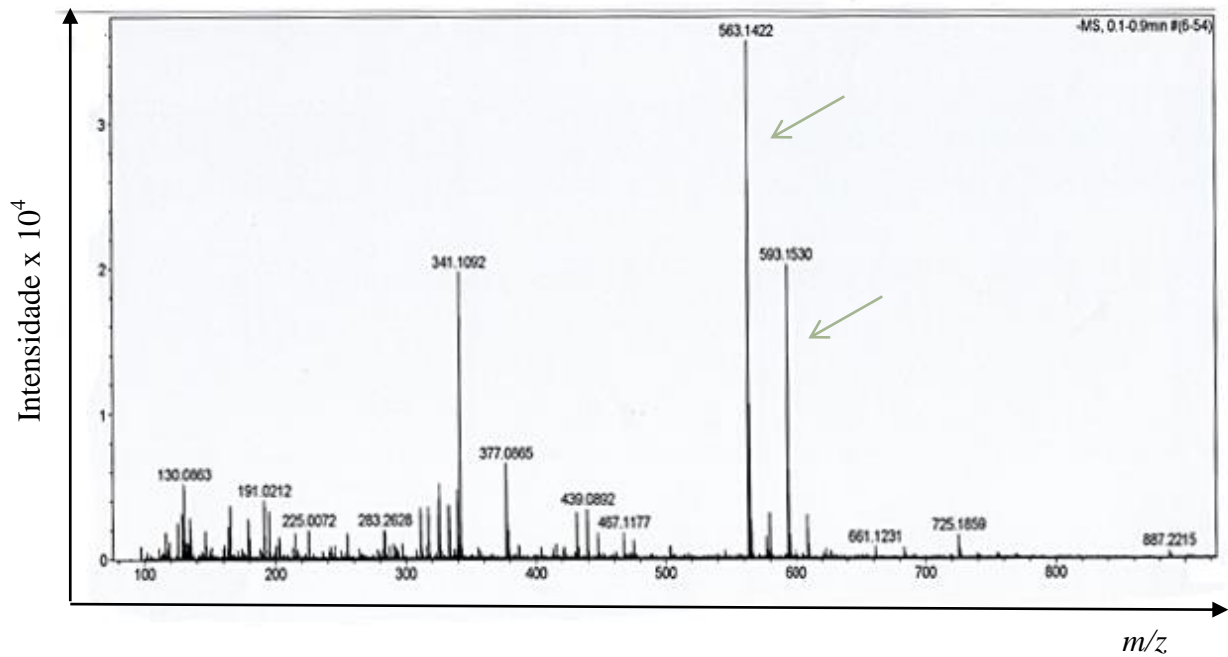


Legenda: A solução de quercetina a 62,5 µg/mL apresentou absorvância de 0,58. Os resultados representam a média ± SD de pelo menos 3 experimentos realizado em triplicata.

3.4.6.3 Análise por espectrometria de massas com ionização por elétron *spray* (ESI-MS)

Foram detectados picos de íons negativos de alta intensidade, [M-H]⁻ 563.1415 e [M-H]⁻ 593.1522, com as fórmulas moleculares C₂₆H₂₇O₁₄ e C₂₇H₂₉O₁₅, respectivamente. Para esses picos majoritários fórmulas moleculares foram propostas sugerindo as substâncias do tipo glicosídeos flavonoídicos, contendo apigenina como aglicona. Para o íon [M-H]⁻ 563.1415, a aglicona apigenina contém como substituintes uma hexose e uma pentose. Já para [M-H]⁻ 593.1522, dois substituintes do tipo hexose são encontrados. As oses podem estar ligadas ao esqueleto flavonoídico formando C-, ou O-glicosídeos. Desta maneira, inúmeros flavonoides podem ser formados, como apigenina di-C-glicosídeos schaftosídeo/ isoschaftosídeo e apigenina di-hexosídeo, respectivamente. Em relação aos picos com média intensidade do espectro de ESI-MS, foram identificados alguns ácidos graxos (palmítico, esteárico e linolênico) e o ácido piroglutâmico (5-oxoprolina), uma lactona cíclica de ácido glutâmico. Estes resultados podem ser observados no espectro de massas por ESI-MS (Figura 24 e Tabela 4).

Figura 24- Espectros de massas do extrato bruto de *X. sagittifolium* com ionização por eletro spray (ESI-MS).



Legenda: Espectros de massas (ESI-MS) com destaque para o pico majoritário 563.1422.

Tabela 4- Análise fitoquímica de extrato bruto de taioba por ESI-MS

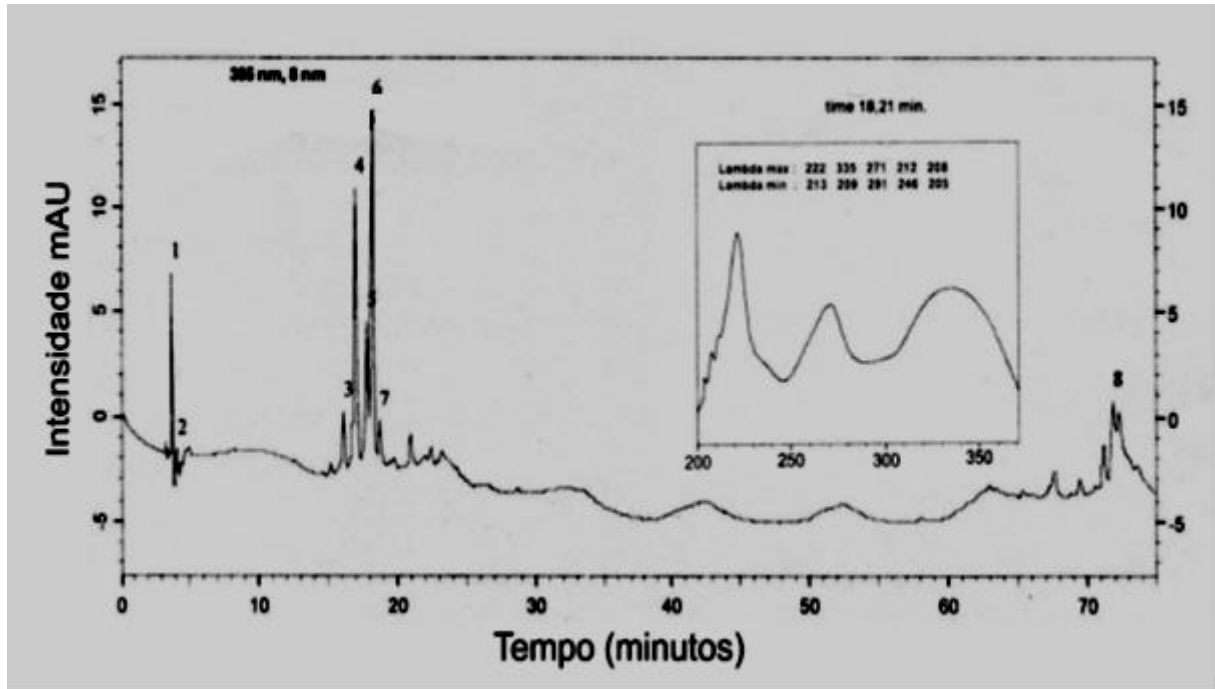
Íon molecular [M-H] ⁻	Fórmula química	Substâncias Sugeridas
128.0352	C ₅ H ₆ NO ₃	Ácido piroglutâmico
255.2328	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	Ácido palmítico
277.2167	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	Ácido linoleico
279.0623	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₆	ND
283.2642	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	Ácido esteárico
341.1096	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	Sacarose ou dissacarídeo isomérico
563.1415	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	Apigenina di-glicosídeo
577.1559	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	Apigenina di-ramnosídeo ou Apigenina hexosídeo pentosídeo
593.1522	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Apigenina di-hexosídeo
609.1487	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Luteolina di-hexosídeo

ND – Não Determinado

3.4.6.4 Análise por Cromatografia de Líquida de Alta eficiência (HPLC-DAD-UV)

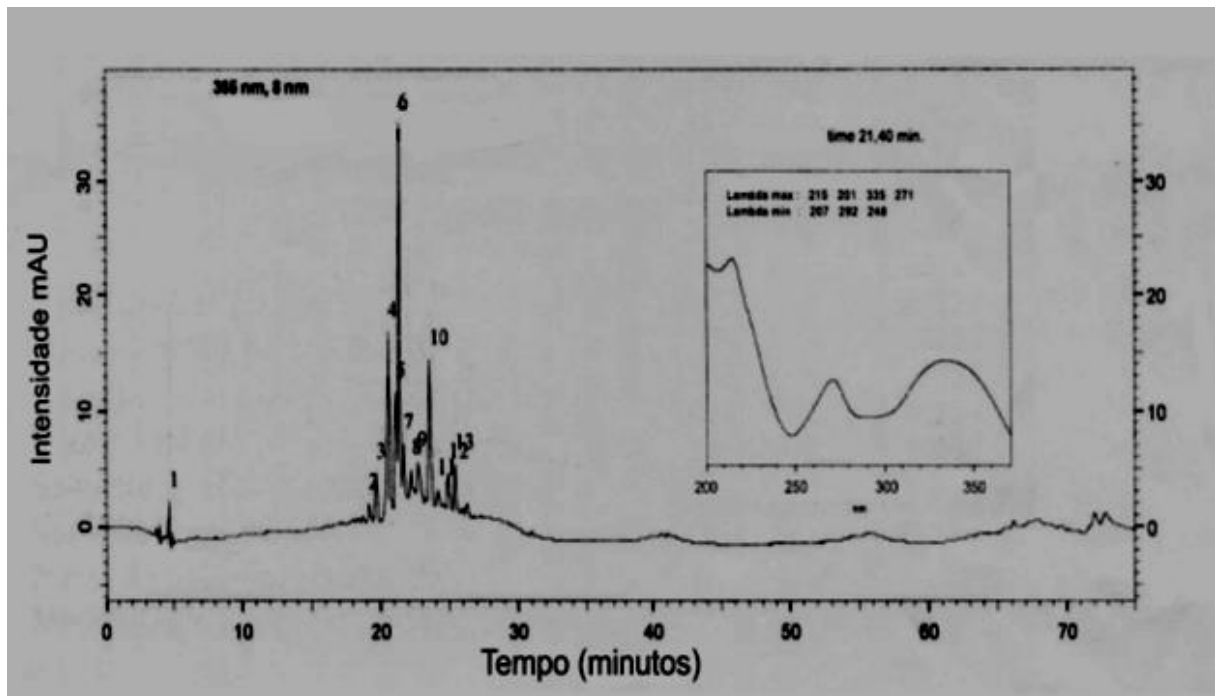
No cromatograma do extrato bruto de taioba EFXs (Figura 25) observa-se oito picos, sendo o pico majoritário (número 6), com tempo de retenção de 18,21 min e área relativa de 19,33%. O perfil em UV desta amostra, inserido na Figura 25, mostra três bandas de absorção com λ máx em 222 nm, 271 nm e 335 nm. Na fração acetato de etila (Figura 26) foram identificados 13 picos no cromatograma, sendo também o pico 6 o majoritário, com TR de 21,40 min e área relativa de 31,38%. Esta amostra apresentou espectro UV (inserido na Figura 26) com picos de absorvâncias em 215 nm, 271 nm e 335 nm. O perfil do HPLC da fração aquosa mostrou 17 picos, sendo o de número 10 o majoritário, com tempo de retenção de 16,43 min, área relativa de 40,01%, e espectro UV com absorvâncias em 271 nm e 336 nm (Figura 27).

Figura 25- Perfil cromatográfico do extrato de folhas de *X. Sagittifolium*, por HPLC-DAD



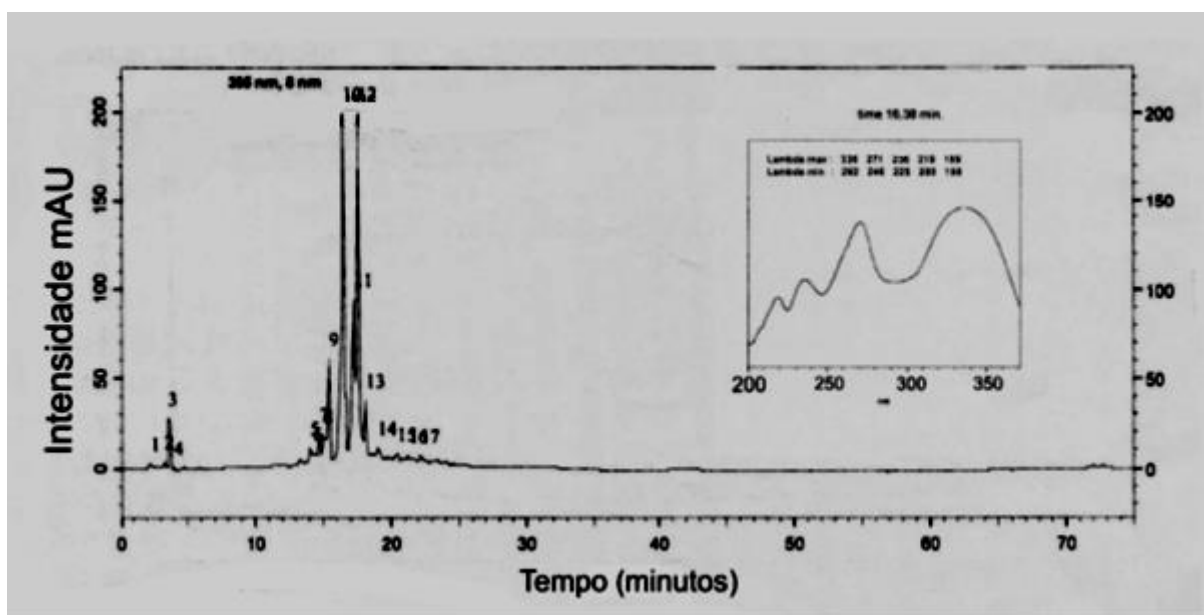
Legenda: O gráfico inserido no cromatograma corresponde ao espectro em UV da substância 6, majoritária, com TR= 18,2 min.

Figura 26- Perfil cromatográfico da fração acetato de etila do EFXs, por HPLC-DAD



Legenda: O gráfico inserido no cromatograma corresponde ao espectro em UV da substância 6, majoritária, com TR= 21.40 min.

Figura 27- Perfil cromatográfico da fração aquosa do EFXs, por HPLC-DAD



Legenda: O gráfico inserido no Cromatograma corresponde ao espectro em UV da substância majoritária com TR= 16,38 min.

3.5 Discussão

Estudos epidemiológicos têm indicado os efeitos benéficos dos antioxidantes na manutenção da saúde e prevenção de doenças. Por esta razão, este trabalho investigou esta atividade no extrato hidroetanólico de folhas de *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) e suas frações, espécie muito pouco estudada quanto aos seus aspectos fitoquímicos e efeitos farmacológicos. A atividade antioxidante foi primeiramente avaliada pelo ensaio de neutralização do radical livre DPPH. O extrato bruto neutralizou $63,8 \pm 6,8\%$ do DPPH, semelhante ao observado com o extrato metanólico da mesma espécie ($78,2 \pm 0,6\%$), como mostrado por Nishanthini e Mohan (2012), utilizando o mesmo ensaio. Além disso, Arruda e colaboradores (2004), mostraram que a ingestão de folhas de *X. sagittifolium* induz efeito protetor contra o estresse oxidativo em ratos. Eles também demonstraram *in vitro* e *in vivo* a atividade antioxidante para as folhas em pó. O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, a ação antioxidante *in vitro* não só para o extrato hidroetanólico desta espécie como também para suas frações (Figura 18). Quando a atividade antioxidante de EFXs foi comparada com as das suas frações, observou-se que a FAcET neutralizou o DPPH com potência semelhante à do extrato bruto e apresentou ação antioxidante maior do que as outras frações. Jaziri e colaboradores (2009) também observaram que a fração acetato de etila de *C. rotundus*, outra planta da família Araceae, mostrou alta atividade antioxidante, só que utilizando o ensaio de

inibição da peroxidação lipídica. *Arisaema tortuosum* (Wall.) Schott, outra planta da família Araceae, apresentou atividade antioxidante, só que com a fração metanólica de tubérculo, apresentando maior atividade antioxidante que o padrão Trolox. Tal fração apresentou quantidade considerável de compostos fenólicos (86,2 mg/100 g) e flavonoides (175,5 mg/100 g) e atividade antioxidante pelos ensaios do DPPH ($IC_{50} = 852 \mu\text{g/mL}$), ABTS ($IC_{50} = 532 \mu\text{g/mL}$), e FRAP ($IC_{50} = 458 \mu\text{g/mL}$) (Nilo e Parque, 2014).

A propriedade antioxidante de *X. sagittifolium* foi também determinada pela atividade quelante de ferro, que indica potencial para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como OH^{\bullet} e H_2O_2 , pela reação de Fenton. Em sistemas vivos, a geração de ROS através desta reação requer a presença de quantidades altas de metais de transição, especialmente de ferro (Zhao *et al.*, 2005). O metal de transição Fe^{2+} possui a capacidade de perpetuar a formação de radicais livres através do ganho ou da perda de elétrons. Portanto, a redução da formação de espécies reativas de oxigênio pode ser conseguida pela redução do número de íons metálicos livres, conhecida como quelação, com agentes quelantes. Neste trabalho, tanto o EFXs como todas as frações de *X. sagittifolium* reduziram a formação de complexo ferro-ferrozina, indicando alta atividade quelante de ferro. A *Arisaema jacquemontii*, outra planta da família Araceae, também apresenta poder de quelação do ferro (58%) com extrato de folhas (100 $\mu\text{g/mL}$), sendo esta atividade maior com folhas em relação aos tubérculos (12%) e extratos de frutas (34%) (Sudão *et al.*, 2014). Esta atividade tem sido descrita para outros diferentes extratos vegetais, como exemplo, o extrato metanólico de *Geum quellyon* (Russo *et al.*, 2005). A atividade quelante de ferro de extratos de plantas é de grande significado como agente antioxidante, porque o excesso de íons de metais de transição contribui para o dano oxidativo, podendo conduzir a várias doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (Raj e Gothandam, 2014). Desta forma, equilibrar o nível de ferro sistêmico dentro de estreitos limites é fundamental para a saúde humana.

Além de estimular a produção de ROS, o ferro pode também, pela reação de Fenton, estimular a peroxidação lipídica e acelerá-la, assim como a decomposição de hidroperóxidos de lipídios em radicais peroxil e alcóxil, que podem eles próprios roubar hidrogênio e perpetuar a reação em cadeia de peroxidação lipídica (Haliwell, 1991; Gursoy *et al.*, 2009; Gul *et al.*, 2013). A estimativa da peroxidação lipídica é um importante indicador de estresse oxidativo (Hsu *et al.*, 2008) e o malondialdeído (MDA) é amplamente considerado como marcador de estresse oxidativo induzindo peroxidação lipídica (Gulet *et al.*, 2013; Raj e Gothandam, 2014). Durante o estresse oxidativo em membranas são gerados peróxidos, peróxidos de lipídios e endoperóxidos cíclicos, bem como o malondialdeído (MDA) (Rattman *et al.*, 2011). A peroxidação induzida por Fe^{2+} é um dos importantes ensaios para avaliar a ação antioxidante de plantas. Neste estudo, ficou demonstrado que o EFXs, a FAcEt e a FAq

foram capazes de inibir a peroxidação de lipídios, assim como descrito para diferentes extratos vegetais, com redução considerável do teor de MDA, e de forma concentração dependente (Gul *et al.*, 2013). Arruda e colaboradores (2004) demonstraram com seus resultados que o extrato aquoso é eficaz no bloqueio da peroxidação lipídica. A inibição da peroxidação lipídica é importante porque ela perpetua a reação em cadeia da peroxidação de lipídios, resultando em destruição de lipídios da membrana, distúrbios metabólicos, inflamação e várias doenças, tais como aterosclerose, hipertensão, doenças inflamatórias e neurodegenerativas (Halliwell, 1991; GURSOY *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, o efeito protetor exercido por alguns alimentos tem sido atribuído à presença de metabolitos secundários, tais como polifenóis, devido à sua ação antioxidante (Melo *et al.*, 2008). A capacidade de redução dos componentes fenólicos está relacionada com a sua estrutura química e é responsável pela sua atividade antioxidante, importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, o que exerce uma ação protetora tanto na fase de iniciação como de propagação do processo oxidativo (Sousa *et al.*, 2007). Os autores acreditam que o efeito antioxidante da fração acetato de etila a partir de *C. rotundus*, uma planta da família Araceae, pode resultar do elevado teor de polifenóis desta fração, incluindo luteolina, ácido ferúlico e outros componentes não identificados (Jaziri *et al.*, 2009). De outro lado, o ácido cafeico é um componente comum em espécies da família Araceae, e pode contribuir para a sua atividade antioxidante (Ferrerres *et al.*, 2012). Neste contexto, o teor de fenólicos totais foi determinado nas amostras de *X. sagittifolium*, mostrando maior concentração dessas substâncias na FAq e FAcET. No entanto, embora essas duas frações tenham mostrado alta atividade quelante de ferro, apenas a FAcET mostrou alta neutralização do radical livre DPPH.

Continuando a investigação da propriedade antioxidante desta planta, a concentração intracelular de ROS (superóxido, peróxido de hidrogênio radical hidroxila, etc.) foi determinada em macrófagos RAW 264.7, determinada por citometria de fluxo, utilizando a sonda DCFH-DA, a mais empregada para detectar ROS (Rhe *et al.*, 2010). Neste estudo, as células tratadas com quercetina (controle positivo) mostraram diminuição da MIF (mediana da intensidade de fluorescência da sonda), confirmando sua atividade antioxidante por redução dos níveis de ROS, já descrita na literatura (Zhao *et al.*, 2015). A incubação de células RAW 264.7 com o extrato bruto hidroetanólico de *X. sagittifolium* induziu significativa redução de ROS nas duas concentrações avaliadas (25 e 50 µg/mL), de maneira semelhante à quercetina (Figura 20), efeito que não foi observado com a FAq, embora esta tenha apresentado leve tendência a diminuir o efeito. É importante notar que, através de ensaios colorimétricos, a FAq apresentou elevado teor de compostos fenólicos, porém apresentou baixa neutralização de DPPH, sugerindo que cada fração deva estar exercendo

atividade antioxidante por mecanismos específicos e diferentes entre si. Por outro lado, muitos estudos têm demonstrado que quando os extratos brutos de partes aéreas vegetais são ricos em flavonoides e compostos fenólicos, geralmente apresentam atividade antioxidante significativa. Baba e Malik (2015) demonstraram que o extrato de *Arisaema jacquemontii*, da família Araceae, porém metanólico, também mostrou atividade antioxidante, e atribuíram este efeito à presença de flavonoides e compostos fenólicos identificados no extrato. Extratos etanólicos de *Citrus aurantium*, com alto teor de flavonoides e compostos fenólicos, apresentaram significativa atividade antioxidante avaliada pelo ensaio do DPPH e de redução do ferro (Karimi *et al.*, 2012).

Os flavonoides representam uma ampla classe de substâncias de baixo peso molecular, constituindo metabólitos secundários extraordinariamente distribuídos em plantas (Mandal *et al.*, 2010). A amostra de *X. sagittifolium* que apresentou maior conteúdo de flavonoides foi a FDCM. O método utilizado para a dosagem de flavonoides foi o de reação com cloreto de alumínio, que é preciso, reprodutível e fornece desvios muito pequenos ou nulos entre diferentes dosagens com a mesma amostra. Entretanto, este método apresenta limitações, isto é, a concentração de flavonoides numa amostra, determinada por este método, pode ser diferente (geralmente inferior) daquela que realmente existe na amostra analisada. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda utilizado no ensaio (425 nm) corresponde ao melhor comprimento de onda de absorção de luz do complexo colorido quercetina-alumínio. A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonoides encontrado nas plantas, mas outros flavonóis também formam complexos coloridos com o alumínio e absorvem luz próximo de 425 nm. No entanto, os complexos coloridos derivados de flavonas com alumínio apresentam pico de absorção em comprimento de onda inferior a 425 nm, o que leva a uma subestimativa nas dosagens de flavonoides de misturas muito ricas em flavonas (Marcucci e Colaboradores, 2003), como é o caso das frações FAcEt e FAq.

Uma vez que foi demonstrada importante atividade antioxidante para o EFXs, FAcET e FAq; que estudos preliminares mostraram a presença de compostos fenólicos nestas amostras; e que diferentes estudos na literatura relacionaram a atividade antioxidante dos extratos de plantas com a presença de compostos fenólicos, flavonoides, dentre outros; um estudo fitoquímico mais aprofundado foi realizado com o EFXs, a FAcEt e a FAq, na tentativa de compará-las e caracterizá-las quanto aos seus principais constituintes. As análises do EFXs, FAcEt e FAq por HPLC-DAD sugerem que o fracionamento do EFXS foi efetivo, concentrando substâncias nas frações FAcET e FAq, desde que os cromatogramas destas frações (Figuras 25 e 26) mostram aumento da intensidade (mAU) de diferentes picos, em relação ao EFXs (Figura 24), representando enriquecimento dessas substâncias, já que todas as amostras foram aplicadas na mesma concentração. Além disso, as análises das amostras

por HPLC-DAD permitiu realizar a varredura do espectro de absorção em UV dos picos majoritários mostrados nos respectivos cromatogramas, indicando os λ máx em 222 nm, 271 nm e 335 nm para o pico 6 majoritário do EFXs, λ máx em 215 nm, 271 nm e 335 nm para o pico 6 majoritário da FAcEt, e λ máx em 245 nm, 271 nm e 336 nm para a FAq. Os espectros de UV das amostras exibiram picos na faixa de comprimento de onda entre 220 e 360 nm, característicos de substâncias fenólicas, de acordo com Sandhu e Gu (2010), confirmando os resultados do conteúdo fenólico por ensaio colorimétrico. As técnicas de HPLC são extensamente usadas tanto na separação quanto na quantificação de combinações fenólicas (Angelo e Jorge, 2007). Como os estudos indicam que os espectros UV dos compostos fenólicos possuem bandas características, e as flavonas, que pertencem à classe dos flavonoides, exibem bandas de absorção, entre 250-280 nm (banda II-Anel A) e entre 330-350 nm (banda I-anel B) (Dandam *et al.*, 2007; Braca *et al.*, 2003), podemos sugerir que os picos majoritários tanto do EFXs como das frações sejam flavonoides da classe das flavonas, as quais devem estar relacionadas com o efeito antioxidante demonstrado neste trabalho. Nossos resultados confirmam dados da literatura (Williams *et al.*, 1981) que descrevem a presença de flavonas em espécies da família Araceae. No entanto, plantas desta mesma família Araceae também apresentam número considerável de flavonóis com diferentes graus de glicosilação, como demonstrado para a *Colocasia esculenta* (Ferrerres *et al.*, 2012), os quais certamente também contribuem para as atividades antioxidantes observadas.

Quanto à análise do EFXs por espectrometria de ionização por spray de elétrons (ESI-MS), observamos a presença de apigenina di-glicosídeos como alguns dos principais constituintes, corroborando dados da literatura que indicam ampla ocorrência de mono- e di-glicosídeos dos flavonoides apigenina e luteolina na família Araceae (Williams *et al.*, 1981). Clark e colaboradores (2012), por exemplo, isolaram flavonas 6-C-glicosiladas de folhas de *Anthurium andraeanum*, outra espécie da família Araceae. Outro estudo mostra o isolamento de várias flavonas-glicosídeos como apigenina-6-C- β -D-glucopiranosil-8-C- β -D-apiofuranosídeo [MH]-563, vitexina [MH]-431, isovitexina [MH]-431, isovitexina 4'-O-ramnopiranosídeo [MH]-577, apigenina-6-C-[β -D-glucopiranosil-(1,6)- β -D-glucopiranosídeo [MH]-593, e apigenina 6,8-di-C- β -D-glucopiranosídeo [MH]-593 em folhas de *Xanthosoma violacium* (Picerno *et al.*, 2003), uma planta herbácea perene de origem americana tropical, do mesmo gênero da taioba (*X. sagittifolium*).

Em resumo, o EFXs e as frações FAcEt e FAq apresentaram compostos fenólicos na sua composição, sendo os majoritários da subclasse das flavonas, e estudos mais específicos com o EFXs indicaram os derivados di-glicosilados de apigenina como alguns dos seus compostos majoritários. Segundo Chew e colaboradores (2011), o conteúdo de compostos fenólicos totais das espécies vegetais pode ser dividido em quatro grupos: conteúdo alto (>

50 mg EAG/g), médio-alto (entre 30 e 50 mg EAG/g), médio-baixo (entre 10 e 30 mg EAG/g) e baixo (inferior a 10 mg EAG/g). Desta forma, as amostras de *X. sagittifolium* se encaixam no grupo de teor médio-alto de compostos fenólicos. A capacidade redutora das substâncias fenólicas está relacionada à sua estrutura química e é responsável por sua atividade antioxidante, desempenhando função importante na neutralização ou sequestro de radicais livres, quelação de metais de transição, possuindo ação protetora tanto na etapa de iniciação como de propagação do processo oxidativo (Sousa *et al.*, 2007).

Esses resultados valorizam o estudo com a espécie *X. sagittifolium* desde que os metabólitos secundários da classe dos fenólicos e polifenólicos, incluindo taninos, flavonoides e suas sub-classes como as flavonas, etc., estão relacionados a várias ações biológicas como efeito anti-inflamatório, antiaterosclerótico e anticancerígeno (Chung *et al.*, 1998; Gursoy *et al.*, 2009), constituem a principal classe de antioxidantes naturais presentes em plantas (Aliyu *et al.*, 2013; Sudão *et al.*, 2014) e foram identificados no extrato hidroetanólico de *Xanthosoma sagittifolium* e suas frações polares FAcEt e FAq, indicando que podem estar relacionados com a atividade antioxidante demonstrada para tais amostras neste trabalho.

3.6 Conclusões

- ✓ O extrato bruto EFXs apresentou importante ação antioxidante, avaliado pela neutralização do radical livre DPPH, atividade quelante do ferro ferroso e redução do nível intracelular de ROS;
- ✓ O fracionamento do EFXs foi eficiente quanto à separação de compostos, enriquecendo diferencialmente as frações polares quanto aos seus constituintes;
- ✓ O fracionamento do EFXs não potencializou a atividade antioxidante quanto à neutralização do DPPH, quelação do ferro ferroso e redução do nível intracelular de ROS;
- ✓ As frações polares (FACeT e FAq), bem como o EFXs apresentaram importante inibição da peroxidação lipídica;
- ✓ A presença majoritária de compostos fenólicos do tipo flavonas no EFXs e nas frações FACeT e FAq indica o envolvimento destes compostos na ação antioxidante destas frações.

4 ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA DE *Xanthosoma sagittifolium* (L.) SCHOTT

4.1 Introdução

4.1.1 Ciclo celular

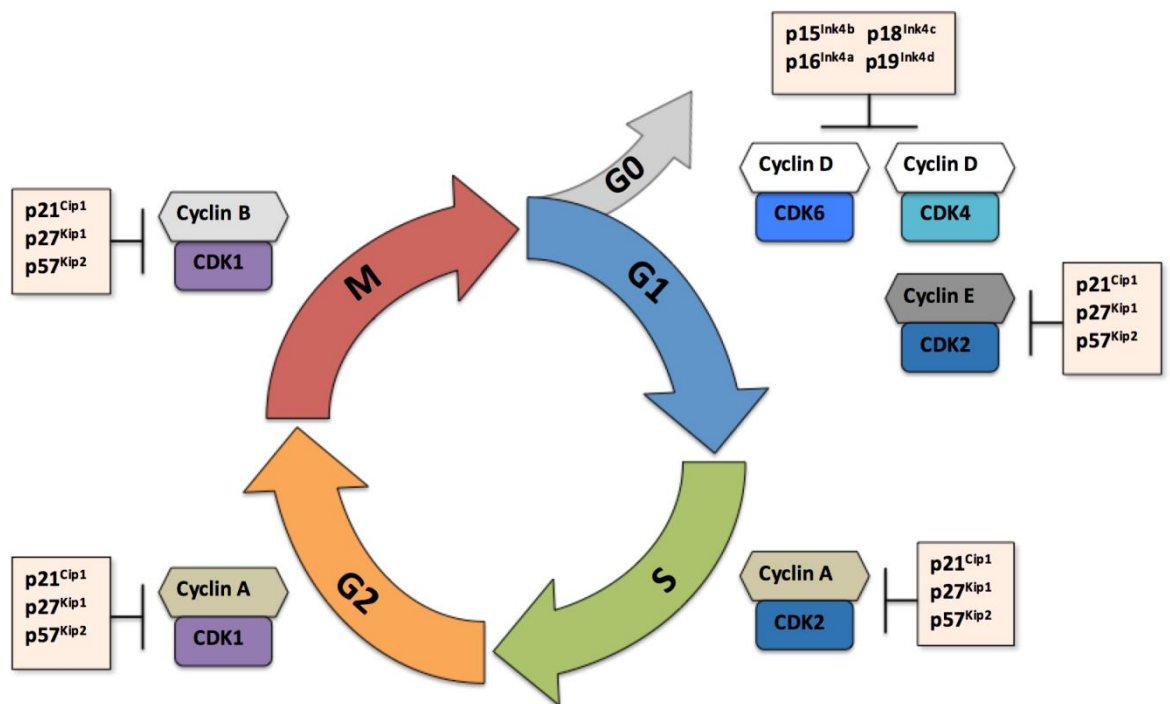
A divisão da maioria das células compreende uma sequência complexa de eventos que garante a transmissão correta de uma cópia completa do genoma para as células filhas. Durante o ciclo celular, a fase de síntese de DNA (fase S) é separada por fases (G1 e G2) nas quais ocorre síntese de RNA e de proteínas. O princípio básico da regulação do ciclo celular é uma cascata de reações de fosforilação, desfosforilação, síntese e degradação de proteínas chave. Essas proteínas controlam uma sequência precisa de eventos, coordenando não apenas a proliferação celular, mas também a quiescência, a diferenciação e a morte celular. A progressão do ciclo celular depende de uma classe especial de diferentes enzimas do tipo de serina/treonina quinases, conhecida como CDK (*Cyclin-dependent kinase*), que possuem subunidades catalítica e reguladora. A atividade das CDKs é dependente da ligação a proteínas denominadas ciclinas, formando complexos CDK-ciclina. As ciclinas são assim denominadas por apresentarem um padrão cíclico de síntese e degradação ao longo do ciclo celular, de acordo com a fase do ciclo (Schwartz e Dickson, 2009; Ferreira e Rocha, 2010; Ashgar *et al.*, 2015).

Os complexos ciclina-CDK desenvolvem papéis específicos em diferentes fases do ciclo celular. O nível das ciclinas mitóticas oscila em sincronia com o ciclo celular, se acumula progressivamente ao longo da intérfase e desaparece abruptamente no final da mitose (Schwartz e Dickson, 2009; Ashgar *et al.*, 2015). Os níveis da maioria das CDKs são relativamente constantes durante o ciclo celular, mas suas atividades são altamente reguladas devido à flutuação dos seus níveis de atividades e de outros reguladores. O complexo ciclina D-CDK4 e ciclina-D-CDK6 estimula o início da fase G1. A ativação das quinases ocorre através de sinais mitogênicos que resultam na ativação de entrada no ciclo celular (Figura 28). Eventos de sinalização chave promovem a inibição de p21Cip1 e p27kip1 que são inibidores de CDK2, promovendo assim a ativação do complexo/ciclina E que é necessário para a transição da fase G1/S. Assim a progressão da fase G1 é caracterizada pelo aumento dos níveis de ciclina E-CDK-2. A diminuição desta ciclina por degradação é importante para o início da fase S que por sua vez é mediada pela regulação da ciclina A-CDK2. Na fase G2 a ciclina A-CDK1 também está envolvida. Complexos CDK1/ciclina A contribuem para a preparação para a mitose em fase G2. A mitose é então iniciada por CDK1/ciclina B. A

ciclina B aumenta durante o início da mitose e diminui no final desta fase (Yam e Poon 2002; Aleem e Arceci, 2015).

A atividade dos complexos CDK/ciclina é frequentemente alterada no câncer humano. A ciclina A é especialmente interessante entre as ciclinas, porque está associada com ambos CDC2 (também chamado CDK1) e CDK2, e tem funções em ambas as fases S e mitose. A Ciclina A1 é apenas expressa em embriões muito jovens, ao passo que a ciclina A2 está presente na proliferação de células somáticas. A Ciclina A está implicada no controle da replicação do DNA e a desregulação dos reguladores do ciclo celular tal como a ciclina A2 é susceptível de contribuir para a tumorigênese. A expressão aumentada de ciclina A tem sido detectada em muitos tipos de câncer e inclusive em leucemias mieloides (Yam e Poon 2002; Aleem e Arceci, 2015).

Figura 28- Esquema do ciclo celular e a atuação de CDKs, ciclinas e inibidores



Fonte: Adaptado de CuboCube - Cancer Genetics Ebook, 2014.

Algumas moléculas atuam na parada do ciclo celular e são chamadas de inibidores de cinase dependente de ciclina (CKIs). São proteínas que interagem com CDKs ou complexos ciclina-CDK, bloqueando sua atividade de cinase e determinando parada do ciclo celular. Os CKIs podem ser de dois tipos: específicos (p15, p16, p18, p19), seletivos para os complexos ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6, que atuam em G1; ou inespecíficos (ex: p21, p27, p53, p57), que atuam sobre diversos tipos de complexos ciclina-CDK (Ferreira e Rocha, 2010; Saedi *et al.*, 2014). De forma resumida, a regulação do ciclo celular é determinada por quatro

mecanismos moleculares básicos: formação periódica de complexos CDK-ciclina (1), que é controlada pela síntese e degradação de seus componentes, (2) fosforilação e desfosforilação das CDKs (3) e ação de proteínas inibidoras de CDKs (4). Sua desregulação pode ocasionar uma cascata de eventos que interferem na progressão do ciclo celular, causando danos e morte celular (Yang *et al.*, 2010).

Nas células normais, os produtos de proto-oncogenes atuam em diferentes níveis ao longo das vias que estimulam a proliferação das células. No câncer, há alterações fundamentais no controle genético da divisão celular, resultando em proliferação celular descontrolada. Mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes: proto-oncogenes e genes supressores de tumor. A inativação de genes supressores de tumor como pRb e p53 resulta na disfunção de proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular. Sendo assim o ciclo celular é regulado por dois mecanismos principais: a via de p16-PRB e a via p53-p21 (Vermeulen e Berneman, 2003; Dutto *et al.*, 2015).

Ocorreu uma grande mudança de estratégia no processo de busca de novos medicamentos contra o câncer, passando da identificação de drogas que matam as células tumorais para uma estratégia mais mecanicista, focada em possíveis alvos moleculares ligados à transformação celular. A evidência de que CDK, seus substratos e reguladores (ciclina e inibidores do ciclo), são alvos de alteração genética em diferentes tipos de câncer humano tem estimulado a busca substâncias com ação reguladora sobre tais proteínas (Besbes *et al.*, 2015).

4.1.2 Apoptose

Segundo Arya e White (2015), a morte celular é predominante durante o desenvolvimento de organismos multicelulares. A frequência maior do tipo de morte celular parece ser do tipo apoptótica, apesar de vias de morte alternativas tais como autofagia e necrose poderem também contribuir para a eliminação de células. A intensidade real da morte celular que ocorre no organismo pode ser subestimada, devido aos fagócitos serem capazes, muitas vezes, de eliminar as células que morrem durante o intervalo de uma hora desde o início da sua morte. A morte celular por apoptose, entretanto também pode contribuir, junto com a necrose, para a etiologia de muitas doenças agudas e crônicas, incluindo as isquêmicas, as tóxicas, as neurodegenerativas e síndromes infecciosas. Por outro lado, defeitos no processo de apoptose estão associados com condições hiperproliferativas, tais como doenças autoimunes e câncer (Kepp *et al.*, 2011; Fulda *et al.*, 2015).

A apoptose geralmente se manifesta morfológicamente por pseudopodia (protusão de membrana), descolamento do substrato, encolhimento (picnose), condensação da cromatina,

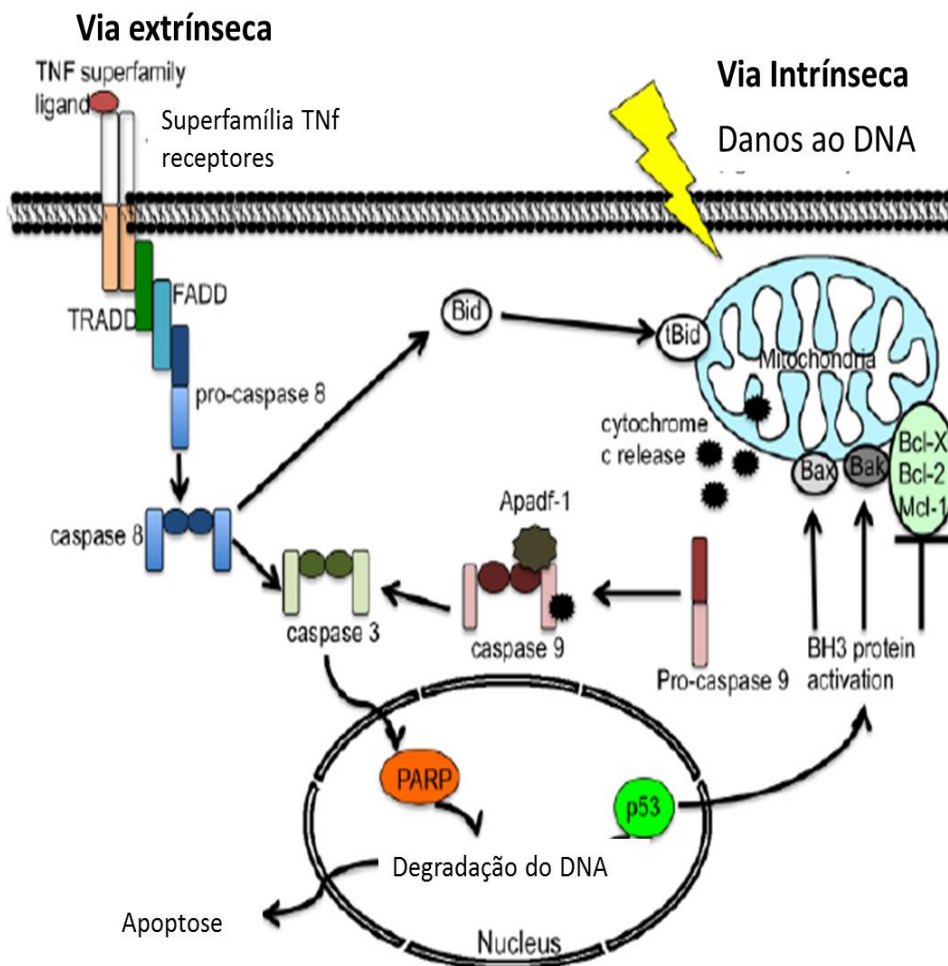
fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, os quais são eliminados por fagócitos vizinhos. Em contraste, as células em necrose não apresentam nenhuma destas características morfológicas, nem vacuolização citoplasmática (que é considerado um prelúdio para a morte celular por autofagia). No entanto, as células necróticas exibem citoplasma cada vez mais translúcido, aumento do tamanho das organelas citoplasmáticas, condensação da cromatina em manchas circunscritas e irregulares, e aumento de volume da célula (oncoses), que culmina na ruptura mecânica da membrana plasmática (Kepp *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2015).

Eventos como ativação de caspases, permeabilização da membrana mitocondrial (MMP, acompanhada pela liberação de proteínas sequestradas no espaço intermembrana mitocondrial), fragmentação internucleosomal de DNA e a exposição do fosfolípido fosfatidilserina na superfície da membrana são muito utilizados como ferramentas para análise da morte celular por apoptose. A apoptose pode ser ativada por diferentes vias de sinalização, dentre elas as vias intrínseca e extrínseca. A via extrínseca, também conhecida como via de ativação pelo receptor de morte, provoca oligomerização dos receptores de morte, tipo FAS, e recrutamento da proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado a FAS) resultando na formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC) e formação da caspase 8 (ativa). Esta caspase passa a ativar as caspases efetoras, incluindo as caspases 3, 6, e 7, e ativa também a caspase 9, representando um ponto de ligação entre as duas vias de ativação. A caspase 8 também é capaz de clivar a caspase 10, a qual também participa da ativação das caspases 3 e 7 (Mottet *et al.*, 2011; Jung e Lee 2014; Liu *et al.*, 2015).

A via intrínseca de ativação da apoptose, também conhecida como via mitocondrial de ativação, é desencadeada por diversos estímulos citotóxicos, incluindo estresse oncogênico, agentes quimioterápicos, bem como estresse metabólico. Esta via é regulada principalmente por interações entre proteínas da família Bcl-2. Estas proteínas são classificadas em dois grupos com base nas suas diferentes estruturas e funções: proteínas anti-apoptóticas (por exemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) e proteínas pró-apoptóticas, que são divididas em duas subclasses: proteínas principais (por exemplo, Bax e Bak) e proteínas BH3 (por exemplo, Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa, Bik, Bmf e HRK) (Liu *et al.*, 2015). Um esquema bem resumido da ativação da apoptose pela via intrínseca também é mostrada na Figura 29. Os estímulos alteram a expressão de proteínas como Bax, Bcl-2 e Bid, resultando em aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, com liberação para o citosol de proteínas pró-apoptóticas. Bid recebe sinais de morte e é clivada diretamente, pela granzima B, ou indiretamente, pela caspase 3 ativada, formando uma Bid truncada (tBid). Esta proteína truncada está envolvida no aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e liberação do citocromo c (Mottet *et al.*, 2011; Jung e Lee 2014). O citocromo c recruta fatores ativadores de apoptose, como o Apaf-1 e a procaspase 9, para gerar o apoptossomo,

responsável pela ativação da procaspase 9 em caspase 9, a qual irá ativar caspases efetoras, levando à apoptose pela via mitocondrial (Mottet *et al.*, 2011; Jung e Lee 2014; Liu *et al.*, 2015).

Figura 29- Via intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose



Fonte: Adaptado de Yuan *et al.*, 2012.

4.1.3 Câncer

O câncer surge de uma única célula que sofreu mutação e multiplicação por mitose, cujas células descendentes acumulam outras mutações, até originarem a célula tumoral. Esse acúmulo de mutações por uma célula é um processo lento, que provavelmente, explica a maior incidência de câncer em pessoas idosas. É um processo constituído de múltiplas etapas em que as células desenvolvem a capacidade de proliferação desregulada, tornam-se resistentes ao processo de apoptose, o que não acontece com as células normais, e adquirem a capacidade de migrar para os tecidos adjacentes e distantes, estabelecendo metástases (Murray *et al.*, 2015).

O número de casos novos de câncer cresce a cada ano e a mortalidade por neoplasias vem crescendo consideravelmente ao longo das últimas décadas, ao mesmo tempo em que diminui as mortes por doenças infecto-parasitárias. Dados do INCA indicam como estimativa para o Brasil em 2016/2017 o registro de 596 mil casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres, 300.800. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, no ano de 2030, são esperados 27 milhões de casos de câncer e consequentemente 17 milhões de mortes. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA, 2016).

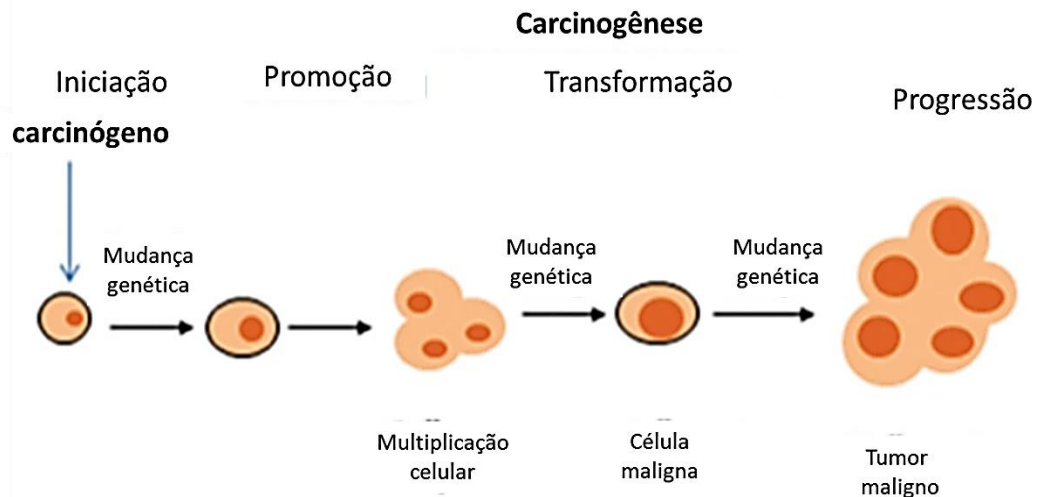
O tumor é constituído por células com alterações no material genético, desregulação da expressão de diferentes genes participantes das vias de sinalização celular, resultando em alterações na regulação do ciclo celular, diferenciação e morte da célula. Estes parâmetros podem ser estudados mais facilmente em modelos *in vitro* (cultura de células) do que nos tumores em animais (*in vivo*). Uma característica que chama atenção nas células tumorais é o polimorfismo genético, ou seja, variações genéticas ocasionadas por mutações. De um modo geral, as células tumorais variam em relação à forma e tamanho, volume e número de nucléolos, aparecimento de maior número de cromossomos e aberrações na morfologia nuclear (Souza *et al.*, 2014).

Também ocorrem modificações na superfície celular, com aparecimento de moléculas novas, principalmente proteínas. Por exemplo, as células tumorais geralmente apresentam em suas membranas plasmáticas maior quantidade de proteínas transportadoras de glicose. Também aparecem antígenos fetais, o que é considerado um indício de desdiferenciação da célula tumoral (Souza *et al.*, 2014).

A maioria das células cancerosas se divide rapidamente e pode ser cultivada indefinidamente *in vitro* como células imortalizadas, apresentando plasticidade de diferenciação. O câncer pode, assim, ser considerado como uma doença resultante do crescimento anormal de células, proveniente da ativação crônica destas células resultante de

diferentes alterações genéticas, culminando na transformação celular, como representado na Figura 30 (Kaur *et al.*, 2014). O processo de formação do câncer (carcinogênese) ocorre lentamente, podendo levar vários anos até que a célula cancerosa dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por alguns estágios como: (1) Iniciação: as células sofrem as primeiras alterações em alguns genes; (2) Promoção: proliferação das células perpetuando as alterações genéticas; (3) Transformação: célula com conjunto de alterações que a caracteriza como célula cancerosa; (4) Progressão: multiplicação descontrolada das células cancerosas, responsável pelo desenvolvimento do tumor (INCA, 2015).

Figura 30- Diferentes estágios da carcinogênese.



Legenda: Adaptado de Kaur e colaboradores, 2014.

A célula tumoral prolifera descontroladamente, perde a capacidade de aderência, secreta enzimas que atacam a matriz extracelular, invade os tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos, e se espalha pelo organismo, estabelecendo-se e proliferando em locais distantes de sua origem onde se desenvolvem tumores secundários: as metástases. Além disso, as células malignas secretam fatores que estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos, promovendo angiogênese (neoformação vascular) e muitos tumores originam metástases preferencialmente em certos tecidos. Por exemplo, há cinco carcinomas, como os tumores de rim, tireoide, pulmão, mama e próstata, que quase sempre fazem metástases no tecido ósseo (Mantovani *et al.*, 2008).

Praticamente todos os tumores malignos conhecidos são constituídos por células com mutações em diversos genes supressores de tumores ou ausência completa desses genes. Aproximadamente 50% de todos os tumores malignos humanos apresentam mutação ou deleção do gene supressor de tumor p53, o que mostra a importância desse gene. Sua função

como gene supressor de câncer decorre de sua atividade sobre as células com DNA defeituoso, que é o caso de todas as células cancerosas (Ferreira e Rocha, 2004). O gene p53 cuja mutação ou inativação está implicada no surgimento do câncer, pode levar ao desenvolvimento de células com instabilidade genética. Mutações neste gene são consideradas as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos. Quando o gene p53 é ativado ocorre a transcrição da proteína p53 e o acúmulo dessa proteína, por sua vez, inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, o que impede a propagação do erro genético para as células filhas. No início do ciclo celular, o gene p53 ativa transcricionalmente o gene p21, o que induz a síntese da proteína 21 (p21), cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclina (CDKs), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, até que se complete o reparo do DNA. A proteína p21 (também denominada p21^{WAF1/Cip1}) é um regulador chave do ciclo celular que concentra as células nas fases G1 e G2 do ciclo celular (Junior *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2015).

Os proto-oncogenes também são genes envolvidos no controle da proliferação celular, podem diferir tanto na estrutura quanto na função da proteína codificada e têm importante papel no desenvolvimento embrionário, ativando a proliferação das células do embrião e do feto nos momentos corretos, para que se forme um organismo normal. Os oncogenes são formas alteradas dos proto-oncogenes. As mutações podem ativar os proto-oncogenes e podem resultar da substituição de base, deleção e/ou inserção. O mecanismo de ação mais comumente encontrado em tumores humanos é a substituição de base. Os oncogenes codificam proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo celular e levam as células a se tornarem cancerosas. O proto-oncogene MYC é amplamente conhecido como um regulador crucial do ciclo celular, da apoptose e da diferenciação de células normais e neoplásicas. O aumento da expressão do MYC também foi descrito como indutor de apoptose, como demonstrado em várias linhagens celulares (Zhen *et al.*, 2011). Outro oncogene, mais frequentemente encontrado no homem, é o oncogene RAS (com as variantes H-RAS, K-RAS e N-RAS) que codifica a proteína Ras, uma proteína G monomérica, ativada por estímulos extracelulares, se associando à membrana plasmática, sendo desativada facilmente, depois de desencadear, no interior da célula, uma resposta à informação recebida. Entretanto, a proteína Ras defeituosa (codificada por gene que sofreu mutação) pode permanecer ativada de modo permanente, enviando sinais constantes para a célula se dividir (Junqueira e Carneiro 2000; Hattum e Waldmann, 2014). Cerca de 15 a 20% dos tumores humanos de diferentes origens possuem mutações pontuais nesta família de proto-oncogenes. Uma das mutações ativadoras descritas para proteína Ras resulta na substituição de um aminoácido na posição 12 da sequência proteica por glicina. Esta alteração causa uma pequena mudança na estrutura tridimensional da Ras, mas suficiente para torná-la uma

oncoproteína. O resultado deste tipo de mutação são moléculas predominantemente ligadas à GTP e, portanto, constitutivamente ativas independentemente do estímulo por fatores de crescimento (Anazetti *et al.*, 2007).

Estima-se também que os vírus contribuam para o surgimento de aproximadamente 20% dos cânceres humanos e, em alguns tumores, como câncer de cérvix uterino e hepatocarcinoma, os vírus são o principal agente causal. Desta forma, a busca por novos compostos com atividade antiproliferativa sobre células tumorais têm sido intensificada.

4.1.4 Leucemia

A palavra neoplasia é o termo comum utilizado para referir-se a todos os tumores malignos e as leucemias são neoplasias malignas dos glóbulos brancos do sangue. Segundo o INCA, o número de casos novos de leucemia estimado para o Brasil no ano de 2016 é de 5.540 casos em homens e de 4.530 em mulheres. Pesquisadores como Hoffbrand e colaboradores (2013) definem as leucemias como um grupo de doenças caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos na medula óssea ou no sangue periférico. Um dos aspectos confusos das neoplasias linfoides diz respeito ao uso dos termos descritivos leucemia linfocítica e linfomas. O termo leucemia é utilizado para descrever neoplasias linfoides que apresentam comprometimento disseminado da medula óssea, geralmente acompanhado de grande número de células tumorais no sangue periférico. O termo linfoma é utilizado para descrever proliferações que surgem na forma de massas teciduais distintas. Apesar da definição distinta dos termos, muitos tipos de linfomas manifestam-se através de um quadro leucêmico no sangue periférico, acompanhado de extenso comprometimento da medula óssea. Por outro lado, tumores idênticos a leucemias surgem, algumas vezes, na forma de massas linfomatosas, sem qualquer evidência de doença medular (Collins *et al.*, 2000).

Pezzini e Castro (2014) definem alguns tipos principais de leucemia, dependendo da forma como a leucemia progride e ao tipo de leucócito: Leucemia Mieloide Aguda (LMA)/Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)/Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)/Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e Leucemia Mieloide Crônica (LMC). Segundo o INCA (2014), dentre as neoplasias presentes em crianças e adolescentes, as do sistema nervoso e a leucemia linfóide aguda – LLA (ou Linfoblástica) são responsáveis por 20% das ocorrências (Nascimento *et al.*, 2009). Além disso, as leucemias podem ser do tipo crônica (que se agrava lentamente) ou aguda (que se agrava rapidamente). Na leucemia crônica, no início da doença, as células leucêmicas ainda conseguem realizar algumas das funções dos glóbulos brancos

normais. À medida que o número de células leucêmicas aumenta, aparecem inchaço nos linfonodos (ínguas) ou infecções. Quando surgem, os sintomas são brandos, agravando-se gradualmente. Na leucemia aguda, as células leucêmicas perdem a habilidade de realizar suas funções normais. O número de células leucêmicas cresce rapidamente e a doença agrava-se num curto intervalo de tempo. A leucemia linfoblástica aguda ocorre mais frequentemente em crianças, enquanto os outros subtipos são mais comuns em adultos (Davis *et al.*, 2014).

4.1.5 Ácidos graxos e câncer

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos. Alguns exemplos de AG com sua respectiva nomenclatura estão apresentados na Tabela 5, os quais ocorrem, em geral, na forma esterificada. Os AG desempenham função importante no armazenamento de energia, estrutura de membranas, acilação de proteínas, transdução de sinal e regulação da transcrição gênica (Zeng *et al.*, 2008). Muitas funções da membrana, tais como o transporte ou a transdução de sinal, dependem da fluidez da membrana, que por sua vez depende das propriedades das cadeias dos AG, que podem existir de uma forma ordenada, resultando num estado rígido, ou num estado desordenado, mais fluido. Os AG são fornecidos pela dieta e por biossíntese. A dieta controla em grande parte a composição dos AG nos lipídios do corpo, enquanto a segunda maior fonte de AG no homem é a sua biossíntese. Os AG são sintetizados pelo complexo enzimático ácido graxo sintase (AGS), em inglês FASN, usando malonil-CoA e acetil-CoA como substratos, obtidos a partir da quebra metabólica de açúcares, alguns aminoácidos e outros AG (Rossato *et al.*, 2014). A AGS é um complexo multienzimático constituído por sete subunidades catalíticas, classificadas como cetoacil sintase (KS), malonilacetil transferase (MAT), desidratase (DH), enoil redutase (ER), cetoacil redutase (KR), proteína transportadora de acil (ACP) e tioesterase (TE). Esse conjunto de sete subunidades se encontra duplicado, como um complexo homodimérico, que funciona em conjunto numa orientação cabeça-cauda para sintetizar o palmitato.

Tabela 5- principais ácidos graxos presentes na natureza.

Nome oficial	Nome usual	Símbolo	Ponto de fusão (°C)
Ácido butanóico	Ácido butírico	C4:0	-8,0
Ácido hexanóico	Ácido capróico	C6:0	-3,0
Ácido octanóico	Ácido caprílico	C8:0	16,5
Ácido decanóico	Ácido cáprico	C10:0	31,0
Ácido dodecanóico	Ácido láurico	C12:0	44,0
Ácido tetradecanóico	Ácido mirístico	C14:0	54,0
Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico	C16:0	63,0
Ácido cis-hexadec-9-enóico	Ácido palmitoleico	C16:1(9)	0,0
Ácido octadecanóico	Ácido esteárico	C18:0	70,0
Ácido cis-octadec-9-enóico	Ácido oleico	C18:1(9)	13,0
Ácido cis,cis-octadec-9,12-dienóico	Ácido linoleico	C18:2(9,12)	- 5,0
Ácido cis,cis,cis-octadec-9,12,15-trienóico	Ácido linolênico	C18:2(9,12,15)	- 11,0
Ácido eicosanóico	Ácido araquídico	C20:0	75,0

Adaptado de: Hartman e Esteves (1982); Solomons e Fryhle (2006) e Vieira e cols. (1999).

SBQ

<http://qnint.s bq.org.br>

Numerosos estudos têm implicado que a dieta rica em gordura e a obesidade desempenham importante papel no desenvolvimento do câncer. Pesquisas mostram também que existe superexpressão da AGS e níveis elevados de AG no desenvolvimento inicial do câncer, bem como nas células cancerosas já estabelecidas. Acredita-se que o metabolismo exacerbado de AG confere às células tumorais grande vantagem proliferativa. Diante destas descobertas, a AGS tem se tornando um alvo para o desenvolvimento de drogas para o tratamento do câncer (Wu *et al.*, 2014). Kuhajda e colaboradores (1994) e Rossato e colaboradores (2014) verificaram que a cerulenina, um inibidor fúngico natural da AGS, suprime o crescimento de células de tumor, com pouco efeito sobre os tecidos normais circundantes. Também foi demonstrado que o C75, um derivado de cerulenina e inibidor da AGS, inibiu o crescimento de células tumorais através da indução de apoptose (Kant *et al.*, 2012).

Muitas proteínas, especialmente aquelas que estão presentes nas superfícies das células ou são passíveis de segregação, adquirem unidades glicídicas em resíduos específicos de asparagina. A adição de açúcares também torna as proteínas mais hidrofílicas e capazes de participar de interações com outras proteínas. Por outro lado, a adição de um lipídio à proteína a torna mais hidrofóbica, resultando no ancoramento desta proteína na membrana (Devlin, 2013). Existem três tipos de ligação de lipídios a proteínas: ligação de radical prenil (prenilação de proteínas), ligação de radical acil (acilação de proteínas) ou ligação de proteínas ao glicosilfosfatidilinositol. Uma única proteína pode conter mais de um grupo

lipídico ligado. Proteínas preniladas possuem grupos isoprenoides ligados a elas. Os mais comuns são os resíduos farnesil C15 e geranylgeranil C20 (Voet *et al.*, 2013).

O processo de sinalização celular e transporte em membranas é muito importante para o metabolismo e para homeostase da célula, e os AG apresentam funções essenciais em ambos os processos. Os AG encontrados ligados à proteína de membrana são o ácido mirístico e o ácido palmítico. O ácido mirístico, um ácido graxo C14 saturado e biologicamente raro, é anexado a uma proteína por meio de uma ligação amida, como o grupo α amino de um resíduo de Gly na extremidade amino terminal. A miristoilação é estável, isto é, o grupo miristoil permanece ligado à proteína indefinidamente. As proteínas miristoiladas estão localizadas em vários compartimentos subcelulares incluindo o citosol, o retículo endoplasmático, a membrana plasmática e o núcleo (U Das *et al.*, 2012).

Na palmitoilação, o ácido graxo C16 saturado, o ácido palmítico, é unido à proteína por meio de uma ligação tioéster a um resíduo de Cys específico. As proteínas palmitoiladas ocorrem quase que exclusivamente na superfície citoplasmática da membrana plasmática, onde muitas delas participam de processos de sinalização transmembrana. A S-palmitoilação é uma modificação única, reversível, com potencial para regular a função de proteínas através de ciclos de palmitoilação e despalmitoilação, reações catalisadas pelas enzimas proteína-palmitoil transferases e proteína tioesterases, respectivamente. As funções da palmitoilação são diversas, a mais comum é aumentar a afinidade de proteínas a membranas, afetando a localização e função das proteínas, especialmente a sinalização intracelular. A palmitoilação também pode afetar as interações proteína-proteína, a atividade enzimática, o tráfego de proteína, a estabilidade e a degradação da proteína (Korycka *et al.*, 2012). Várias proteínas sofrem palmitoilação, como moléculas de adesão (integrinas), proteínas G acopladas a receptores, uma grande variedade de transportadores de membrana tipo canais (canal de sódio epitelial, aquaporinas, canal de BK, de dopamina, transportadores de glutamato, etc.), vários receptores (acetilcolina, canabinoides, opioides, β -adrenérgicos, dopamina, prostaciclina, estrogênio, progesterona, aldosterona, androgênios, etc.), ligantes de receptor, tais como o Fas ligante, enzimas tais como β -e γ -secretase, E3 gp78 ligase, proteína dissulfeto isomerase, chaperona calnexina, e inúmeras glicoproteínas virais (Linder, 2007; Blaskovic 2013).

O palmitato está disponível na célula na forma de palmitoil-CoA em concentrações nanomolares, a não ser em microdomínios específicos de membrana enriquecidos com palmitoil-CoA. Apesar do palmitato ser um substrato para a palmitoilação de proteínas, as concentrações celulares são insuficientes para que ocorra palmitoilação espontânea das mesmas (Blaskovic *et al.*, 2013). Por outro lado, o ácido palmítico é o ácido graxo saturado mais abundante no soro. Os AG saturados podem alterar a síntese de fosfolípidios, os quais também estão envolvidos na regulação dos eventos de sinalização (Ford *et al.*, 2010).

Como os produtos naturais têm sido uma das fontes de maior sucesso para a descoberta de novos agentes terapêuticos, e nas últimas décadas numerosos medicamentos antineoplásicos (por exemplo, taxois, derivados de podofilotoxina, etc.) foram descobertos através do estudo etnomedicinal de plantas ou de rastreamento da ação antitumoral (Tundis *et al.*, 2011), avaliamos o potencial antitumoral da espécie *Xanthosoma sagittifolium*.

4.2 Objetivos

- Avaliar a ação citotóxica *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de folha e de rizoma de *Xanthosoma sagittifolium* em linhagens celulares leucêmicas;
- Comparar o efeito antileucêmico *in vitro* do extrato bruto mais ativo com o das frações;
- Avaliar os efeitos das frações mais ativas sobre o ciclo celular e apoptose;
- Verificar a citotoxicidade das amostras mais ativas em células não tumorais;
- Identificar constituintes ou classe de constituintes presentes nas frações mais ativas;
- Investigar a ação antileucêmica *in vitro* dos constituintes majoritários das amostras ativas;
- Investigar possíveis mecanismos de ação.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Obtenção dos extratos hidroetanólicos de *X. sagittifolium* e fracionamento

Esta etapa do trabalho encontra-se descrita em detalhes na metodologia da parte 1. Resumidamente, foram preparados extratos etanólicos a 70% de rizoma (ERXs) e de folhas (EFXs) da planta, por maceração, durante duas semanas. O EFXs foi fracionado por partição líquido-líquido com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila, fornecendo as frações FHEX, FDCM, FAcEt, respectivamente, e resíduo aquoso (FAq). Esta parte do trabalho foi realizada no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN), da UFRJ, em colaboração com o professor Dr. Ricardo Machado Kuster.

4.3.2 Identificação dos compostos majoritários nas frações apolares do EFXs

Esta parte do trabalho também foi realizada na central analítica do Instituto de Pesquisas em Produtos Naturais (IPPN), da UFRJ, em colaboração com o Dr. Ricardo Machado Kuster. Os compostos majoritários foram identificados utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. As amostras (1 mg) foram solubilizadas em 100 µL de MSTFA (N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida) e 1 mL de acetato de etila para derivação. Aguardou-se por 15 minutos para a completa reação de derivação e em seguida injetou-se no CG (Shimadzu 2010 com interface GCMS-QP2010 e impacto eletrônico). A coluna utilizada para análise foi Rtx®-5MS (L=30 m; d=0,25 µm). As condições da CG foram: hélio com gás de arraste, fluxo com taxa de 1 mL/min e injeção no modo *split* com taxa 1:40. A temperatura do injetor utilizada foi de 250 °C, modo de injeção *split*, temperatura da coluna de 60 °C, fonte de ionização a 250 °C e interface de 300 °C.

4.3.3 Linhagens celulares

O potencial antileucêmico *in vitro* foi avaliado com o uso das linhagens celulares leucêmicas Jurkat (leucemia linfocítica T aguda humana) e K562 (leucemia mieloide crônica humana). Linhagens celulares de tumores sólidos como carcinoma de pulmão (células A549), de mama (células MCF-7) e de próstata (células PC3), também foram utilizadas no estudo das amostras mais ativas. A linhagem de fibroblastos normais murinos NIH-3T3 foi utilizada como controle de célula não tumoral. As linhagens celulares foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, e encontram-se mantidas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (UERJ). Após

descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com 5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma Chemicals®) suplementado com 10% SBF (Cultilab®), denominado meio suplementado. A viabilidade celular foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase ou por exclusão do corante azul de tripano, em câmara de Neubauer, e os repiques foram realizados duas vezes por semana. Para as células aderentes utilizou-se incubação com tripsina a 0,25% contendo EDTA 0,53 mM para soltar as células das garrafas. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO₂.

4.3.4 Tratamento das linhagens celulares com as amostras

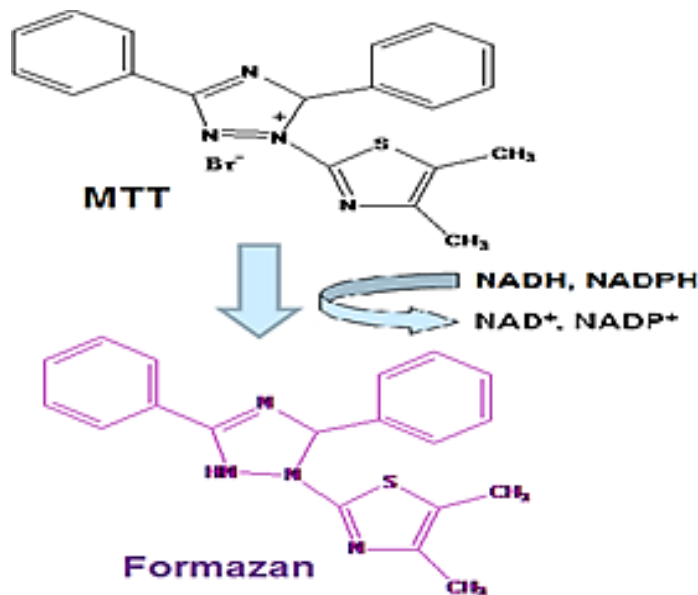
As amostras vegetais e os padrões de ácidos graxos saturados foram incubados com as células (1 x 10⁵/mL) a 50 µg/mL ou em diferentes concentrações finais por 48 h, com volume final de 100 µL, em placa de 96 poços, para avaliação da citotoxicidade *in vitro* e determinação de IC₅₀. As frações mais ativas foram avaliadas quanto a outros parâmetros como ciclo celular, apoptose e expressão de proteínas. As soluções estoque das amostras (50 mg/mL) foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e posteriormente diluídas em meio RPMI suplementado. Culturas controle do diluente foram realizadas incubando as células com diferentes concentrações de DMSO (0,1%; 0,5% e 1%).

4.3.5 Ensaio de citotoxicidade pelo MTT

O método colorimétrico utilizando MTT (3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) (Sigma®) foi utilizado para medir o efeito citotóxico das amostras sobre as linhagens celulares, segundo descrito por Mosmann (1983). Neste ensaio o sal de tetrazol MTT é reduzido por desidrogenases mitocondriais das células vivas, gerando o formazan, de coloração arroxeadada (Figura 31) proporcionalmente ao número de células viáveis. Através deste ensaio colorimétrico pode ser determinada a atividade redutora mitocondrial (ARM), a qual pode indicar citotoxicidade, viabilidade e/ou proliferação celular. Após incubação das células (com ou sem as amostras, por 48 h a 37°C e 5% de CO₂), 10 µL de MTT a 5 mg/mL em PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) foram adicionados a cada poço. Após 4 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, os cristais de formazan formados foram dissolvidos com solução de SDS 10% contendo 0,01 N HCl (100 µL/poço). A leitura das absorvâncias foi feita em leitor de microplacas em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados de citotoxicidade foram expressos como percentuais de redução do MTT, em relação à cultura controle (células sem amostras), considerada como 100% de redução do MTT. Para verificar a interferência das amostras neste

ensaio colorimétrico, as amostras foram incubadas por 48 h com meio sem células (brancos das amostras) e as absorvâncias determinadas e descontadas.

Figura 31- Mecanismo da formação de cristais de formazan



Fonte: adaptado de www.biotek.pt, 2015.

4.3.6 Análise do ciclo celular

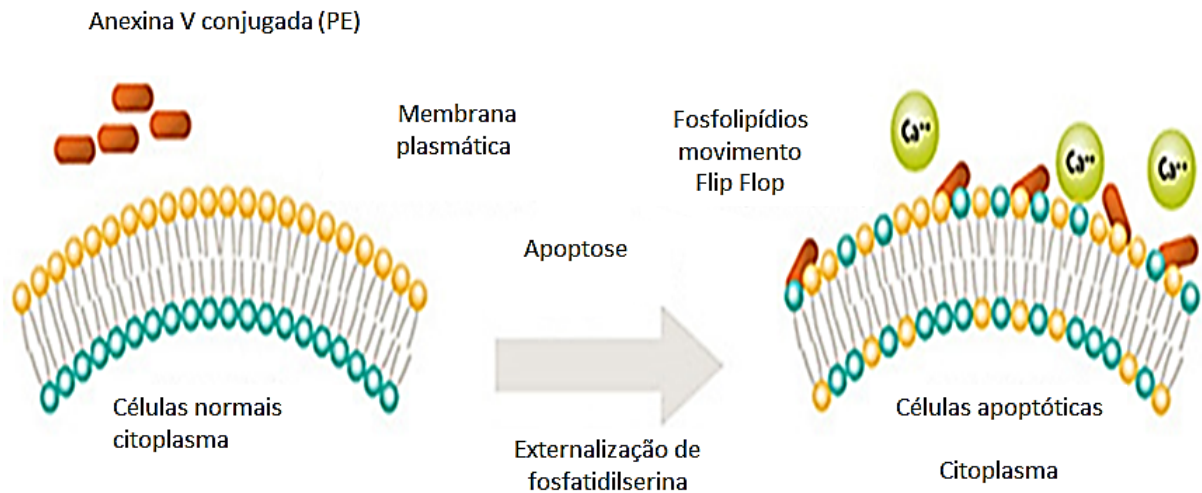
O EFXs e as frações mais ativas tiveram seus efeitos avaliados sobre a progressão do ciclo celular de células leucêmicas Jurkat. As culturas foram realizadas em garrafas, às quais foram adicionados 20 mL de suspensão celular (concentração final de 1×10^5 células/mL) e 10 mL de amostra vegetal nas devidas concentrações ou 10 mL meio de cultura (cultura controle). Após 48 h a 37°C e 5% de CO₂, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer e o volume de solução celular equivalente a 1×10^6 células foi separado, centrifugado por 3 min a 400 x g, temperatura ambiente, e o sedimento celular foi suspenso em 500 µL de iodeto de propídio (PI – Sigma Chemical®) 50 µg/mL (diluído em tampão citrato 43 mM, pH 8,2, contendo Triton X-100 0,3%). Após incubação de 15 min, no gelo e na ausência de luz, foram adicionados 500 µL de RNase 100 µg/mL (Sigma Chemical® - solução preparada em tampão citrato 43 mM, pH=8,2). Após nova incubação de 15 min na ausência de luz, à temperatura ambiente, as células foram levadas ao citômetro de fluxo (Gallios A94303, Beckman Coulter, Inc., EUA) para aquisição dos dados. O Triton X-100

permeabiliza a membrana para a entrada do PI, o qual se liga ao ácido nucleico (DNA e RNA), intercalando-se entre as bases nitrogenadas. A RNase degrada o RNA, deixando apenas o DNA, e permitindo assim avaliar as fases do ciclo celular em função da intensidade de fluorescência do PI intercalado no DNA. As células foram analisadas quanto à fluorescência do PI (detectada no canal FL-2). Neste canal, a área do pico de fluorescência de cada evento é lida em FL2-A. Este parâmetro é utilizado para determinar as fases do ciclo celular, em função do conteúdo de DNA, e estas fases são observadas sob a forma de histograma. A aquisição das células foi feita com o programa Gallios software e a análise dos histogramas com o programa Summit 4.2. Os resultados são mostrados em número relativo de células em cada fase do ciclo celular.

4.3.7 Ensaio de apoptose por marcação com Anexina-V

A anexina V detecta a externalização das moléculas de fosfatidilserina na membrana plasmática, um dos primeiros sinais de apoptose (Figura 32). Este ensaio foi realizado com células leucêmicas Jurkat provenientes das mesmas culturas utilizadas para análise do ciclo celular. As células (2×10^5) foram centrifugadas por 3 min a $400 \times g$, lavadas com PBS e suspensas em 200 μL de tampão de ligação (Hepes 10 mM/NaOH; NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2 , estocado a 4°C) para marcação com o kit anexina V-FITC e PI (Kit eBiosciences), segundo protocolo do fabricante. Neste ensaio, a marcação com PI identifica células que perderam a seletividade da membrana plasmática, isto é, células comprometidas com a morte, independente do tipo de morte. O PI distingue células viáveis das não-viáveis. Para o ensaio, 100 μL de suspensão celular (1×10^5 células) foram transferidos para tubo de citometria, ao qual foram adicionados 2,5 μL de anexina V-FITC e 1 μL de PI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 15 min de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, 400 μL de tampão de ligação foram adicionados e as células foram levadas ao citômetro de fluxo para aquisição de dados. A análise dos dados foi feita com o programa Summit 4.2. A fluorescência da anexina-V marcada com FITC foi detectada no canal FL-1 e a fluorescência do PI no canal FL-3. Os resultados foram mostrados em histogramas de fluorescência da anexina V-FITC (canal FL-1), citogramas do tipo FL-1 (marcação com anexina-V) versus FL-3 (fluorescência do PI) e gráficos com o número relativo de células em apoptose (positivas para anexina-V).

Figura 32- Representação esquemática da externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática



Fonte: www.bdbiosciences.com, 2016.

4.3.8 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

4.3.8.1 Extração RNA

As células Jurkat foram cultivadas em garrafas (2×10^6 células/garrafa) com ou sem EFXs, FDCM, FHEX ou ácido palmítico ($50 \mu\text{g/mL}$) por 48 h a 37°C numa atmosfera úmida de 5% CO_2 . Após este período as células foram contadas e 1×10^6 células foram centrifugadas ($400 \times g$) e lavadas duas vezes com 1 mL de PBS estéril. É importante mencionar que uma das mais importantes etapas para a síntese de um cDNA de boa qualidade é o isolamento de RNA total intacto a partir de células cultivadas ou tecidos. Neste processo foi utilizado o Trizol (reagente composto de fenol e isotiocianato de guanidina), com objetivo de lisar a membrana celular, desnaturar proteínas e impedir a ação de RNases, mantendo a integridade do RNA. Posteriormente, foi adicionado o clorofórmio, um solvente orgânico que diminui a interação das proteínas com a água, formando duas fases após centrifugação ($12.000 \times g$). O isopropanol foi utilizado posteriormente para precipitação do RNA, por reduzir a interação da água (dipolo) com as cargas negativas dos grupamentos fosfatos do RNA. O etanol 75% é utilizado em seguida na purificação do RNA, pois devido à sua hidratação de 25%, é capaz de remover os sais aderidos ao sedimento de RNA. Mais detalhadamente, o material celular foi transferido para um tubo de 1,5 mL, livre de RNase, 1 mL de trizol foi adicionado ao sedimento celular e a homogeneização foi realizada até dissolução completa das células, para posterior incubação à temperatura ambiente durante 2,5 min. Em seguida, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de clorofórmio, e os tubos foram homogeneizados manualmente até formar uma solução homogênea. Posteriormente, centrifugou-se o material por 15 min a $12.000 \times g$, entre

2°C e 8°C. Após este procedimento formaram-se três fases, uma aquosa incolor (superior, contendo ácidos nucleicos), uma intermediária (contendo restos de membranas) e uma fase orgânica rosa (inferior, contendo proteínas). A fase aquosa incolor (superior) foi retirada cuidadosamente, com pipeta automática e transferida para outro tubo (~600 µL). Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo, adicionou-se 500 µL de isopropanol (gelado) ao tubo, homogeneizou-se manualmente (~20 vezes) para a precipitação do RNA, e incubou-se por 10 min em temperatura ambiente. A seguir, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 min entre 2°C a 8°C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com pipeta, adicionou-se etanol 75% diluído em H₂O DEPC (água ultrapura com 0,1% dietil pirocarbonato, autoclavada) ao sedimento de RNA e homogeneizou-se. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min (7500 x g) a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados em capela para evaporação do álcool restante na amostra. O RNA foi posteriormente dissolvido em 50 µL de água ultrapura e estocado em -80°C.

4.3.8.2 Quantificação de ácidos nucleicos

Após o procedimento de extração do RNA, o mesmo foi quantificado em cada amostra por espectrofotometria, utilizando o aparelho “nanovue” (GE healthcare). As amostras foram mantidas no gelo, e após zerar o aparelho com o branco (água ultrapura), aplicou-se 2 µL de cada amostra. As absorvâncias foram determinadas em dois comprimentos de onda 260 e 280 nm. Em geral os ácidos nucleicos absorvem no primeiro λ (260 nm) e as proteínas absorvem no segundo (280 nm). A razão entre as absorvâncias indica a pureza do ácido nucleico extraído. Quanto menor a relação maior a contaminação com proteínas. Essa relação deve estar entre 1,8 e 2,0 para que a extração tenha sido eficiente e o ácido nucleico extraído esteja em um nível aceitável de purificação. A quantidade de RNA foi expressa em µg/µL, considerando-se uma unidade de absorvância em 260 nm igual a 40 µg de ácido nucleico/mL.

4.3.8.3 Tratamento com DNase

As amostras de RNA foram tratadas com a enzima DNase (Promega) para excluir o DNA genômico, impedindo desta forma amplificação inespecífica durante a PCR (caso os *primers* se anelem em apenas 1 éxon e não na junção entre 2 éxons). Após a quantificação do RNA, realizou-se o cálculo para fazer o tratamento de 1 a 3 µg de RNA com a DNase. Em cada tubo foi adicionado: tampão de DNase 10 x concentrado (0,7 µL), DNase (2 µL), RNA (a definir) e q.s.p. 7 µL H₂O DEPC. O material foi incubado a 37°C por 30 min (banho-maria ou banho seco), seguido de adição de 1 µL de solução *DNase Stop*. A segunda incubação foi feita a 65°C por 10 min (banho seco). O RNA estoque foi armazenado no freezer -80°C. As

amostras de RNA (1 – 3 µg) foram então tratadas com DNase para seguir para a etapa de transcrição reversa.

4.3.8.4 Transcrição Reversa (RT)

Nesta etapa a partir de uma molécula de RNA obtém-se uma molécula de DNA complementar (cDNA). A cada tubo tratado previamente com DNase, adicionou-se 1 µL de *random primer* (RP), as amostras foram incubadas por 5 min a 65°C e posteriormente transferidas para o gelo. A solução com um conjunto de reagentes para o RT, denominado RT-MIX, foi preparada como segue abaixo:

Solução RT-MIX (por tubo):

Trealose 1,5 M-----	12 µL
5x 1 st stread buffer----	6 µL
RNASina -----	1 µL
DTT 0,1 M-----	1 µL
dNTP 10 mM-----	1 µL

Os volumes de cada reagente foram ajustados para a quantidade total de tubos, acrescentando uma sobra de pelo menos 2 tubos. Foram adicionados, então, 21 µL de RT-MIX/tubo e posteriormente homogeneizou-se com a pipeta automática. O material foi incubado por 10 min a temperatura ambiente e posteriormente por 2 min a 37°C (banho-maria ou banho seco); 1 µL da enzima transcriptase reversa MMLV foi então adicionada em cada tubo (aplicar na parede do tubo), realizou-se um pulso (15 seg) na microcentrífuga, para a enzima descer pela parede e entrar em contato com a mistura de reagentes no tubo. As amostras foram então incubadas por 1 h a 37°C (banho-maria ou banho seco), para síntese do cDNA, e posteriormente, por 15 min a 70°C para inativação da enzima. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas no freezer -20°C.

4.3.8.5 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR)

A avaliação da expressão do mRNA dos genes Bax, ciclina A e GAPDH foi realizada por PCR em tempo real, utilizando o reagente Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystems). Para a reação foram utilizados 5 μ L de máster mix, 0,5 μ L de cada primer (senso e anti-senso - 400 nM) e 2 μ L de água ultrapura. O cDNA (2 μ L) foi adicionado por último. Posteriormente a placa foi selada com adesivo óptico para qPCR e submetida a leve pulso na centrífuga, sendo posteriormente levada para a termocicladora StepOne Plus (Applied Biosystems) para amplificação das amostras. Para tal, as amostras foram aquecidas primeiramente a 95°C por 20 s. Depois disso, programou-se 40 ciclos nas seguintes condições: temperatura de desnaturação de 95°C por 3 s e temperatura de anelamento de cada par de oligonucleotídeos (geralmente 60°C) por 30 s. Ao final dos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 95°C por 30 s, iniciando a etapa da curva de Melting. Neste estágio, a temperatura foi reduzida para 60°C por 1 min, seguindo-se um aumento gradual até 95°C, para a obtenção da temperatura de Melting (T_m). Esta é específica para cada par de primer e correspondente à temperatura em que 50% dos produtos do PCR estão dissociados. A análise da curva de Melting é importante para confirmar a especificidade dos produtos amplificados, assim como indicar a amplificação de regiões inespecíficas e formação de dímeros de *primers*.

Antes de realizar a quantificação relativa da expressão de cada gene, realizou-se experimentos de padronização para determinar a eficiência da reação da polimerase (concentração de *primers*, qualidade do cDNA, pipetagem, etc.), através do *slope* (inclinação) das curvas de concentração de cDNA para cada gene analisado, incluindo os genes de referência. Para estudo da curvas padrão dos diferentes genes, um *pool* de cDNA (aliquotas dos diferentes tipos de tratamento e do controle) foi preparado e posteriormente realizou-se uma diluição seriada (fator de diluição 1:3) a partir desse *pool* (estoque). A eficiência das reações de amplificação dos genes alvo foi avaliada, sendo considerada aceitável uma diferença de no máximo 10% entre as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene de referência. O gene da GAPDH foi utilizado como gene de referência para normalizar a expressão do mRNA de genes alvo (Rossini *et al.*, 2010). Diante deste critério, adotou-se a quantificação relativa, utilizando o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen e Livak, 2008). Após determinação do fator de diluição de cDNA a ser testado nas amostras, os experimentos foram realizados em triplicata. Uma mistura de reação de PCR sem modelo de cDNA foi usada para detectar qualquer contaminação. A amostra controle do experimento foi utilizada como amostra calibradora dos ensaios de qPCR. Os *primers* utilizados neste trabalho foram

construídos em junção éxon-éxon e suas sequências encontram-se na Tabela 6. As análises foram realizadas usando o software Stepone V2.2.2.

Tabela 6- Sequências dos Primers

Gene alvo	primer	Sequência
Bax	Senso	TGGAGCTGCAGAGGATGATT
	Anti-senso	GAAGTTGCCGTCAGAAAACA
Ciclina A	Senso	AGCTATCCTCGTGGACTGGT
	Anti-senso	G TTCACAGCCAAATGCAGGG
GAPDH	Senso	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG
	Anti-senso	TGAAGGGGTCGTTGATGGAC

4.3.8.6 Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p21

A inibição do ciclo celular das células Jurkat pode estar relacionada com a alteração na expressão da proteína p21. Assim, os níveis de expressão desta proteína foram avaliados, por citometria de fluxo, após incubação das células Jurkat com o EFXs, FDCM, FHEX e ácido palmítico (50 µg/mL), em estufa de CO₂ a 5% e 37°C por 48 h. Para cada análise, foram utilizadas 2 x 10⁶ células/garrafa. As células foram contadas e 1 x 10⁶ células de cada tratamento foram centrifugadas (300 x g, 5 min), o sobrenadante foi retirado e posteriormente as células foram lavadas com 500 µL de PBS gelado e centrifugadas (300 x g, 5 min). Em seguida, as células foram permeabilizadas durante 10 min com 100 µL de *Facs Lysing* (BD-Biosystem) em temperatura ambiente. Neste processo de permeabilização foi necessário homogeneizar as células. Esta solução foi removida por centrifugação (400 x g, 5 min) e as células foram submetidas a uma lavagem (400 x g, 5 min) com PBS contendo 5% de SFB. O precipitado celular foi suspenso nesta mesma solução para marcação com o anticorpo anti-p21^(WAF1)-PE. Após a adição do anticorpo, as células foram incubadas durante 30 min, ao abrigo da luz e no gelo. Após a incubação as células foram centrifugadas (300 x g, 3 min) e lavadas com PBS, ressuspensas com 500 µL de PBS e levadas ao citômetro de fluxo (Gallios, Beckman) para aquisição de dados. Para a análise dos resultados utilizou-se o *software* Summit v.4.2. Os resultados da expressão do p21 encontram-se normalizados pela expressão na cultura controle.

4.3.8.7 Análise estatística

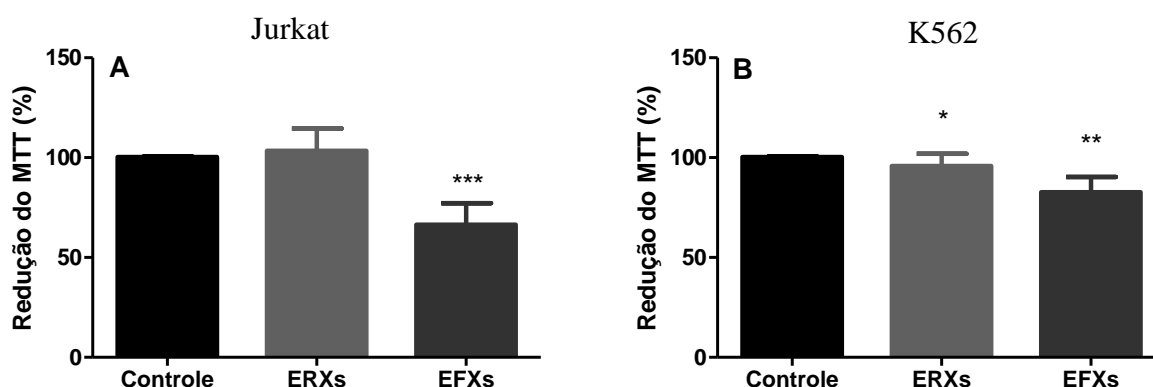
A análise de variância entre diferentes grupos foi analisada pelo teste One-way ANOVA e a significância das diferenças entre cada duas amostras foi avaliada pelo teste de Tukey (Prism 5 Graphpad). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4.4 Resultados

4.4.1 Efeito citotóxico de extratos de *X. sagittifolium* e frações do EFXs em linhagens celulares leucêmicas

Este estudo foi iniciado pela análise dos efeitos citotóxicos dos extratos de rizoma (ERXs) e de folhas (EFXs) de *X. sagittifolium* e das frações do EFXs sobre as linhagens leucêmicas Jurkat (linfocítica aguda) e K562 (mieloide crônica). Na linhagem celular Jurkat o EFXs inibiu a atividade redutora mitocondrial em 33,6% na concentração de 50 µg/mL, enquanto o ERXs não apresentou inibição (Figura 33A). Já na linhagem leucêmica K562 o EFXs apresentou inibição de 17,3%, enquanto o ERXs inibiu apenas 4,1%, porém significativamente (Figura 33B).

Figura 33- Efeito citotóxico dos extratos de rizoma e de folhas de *X. sagittifolium* em linhagens celulares leucêmicas. (A) Jurkat. (B) K562.

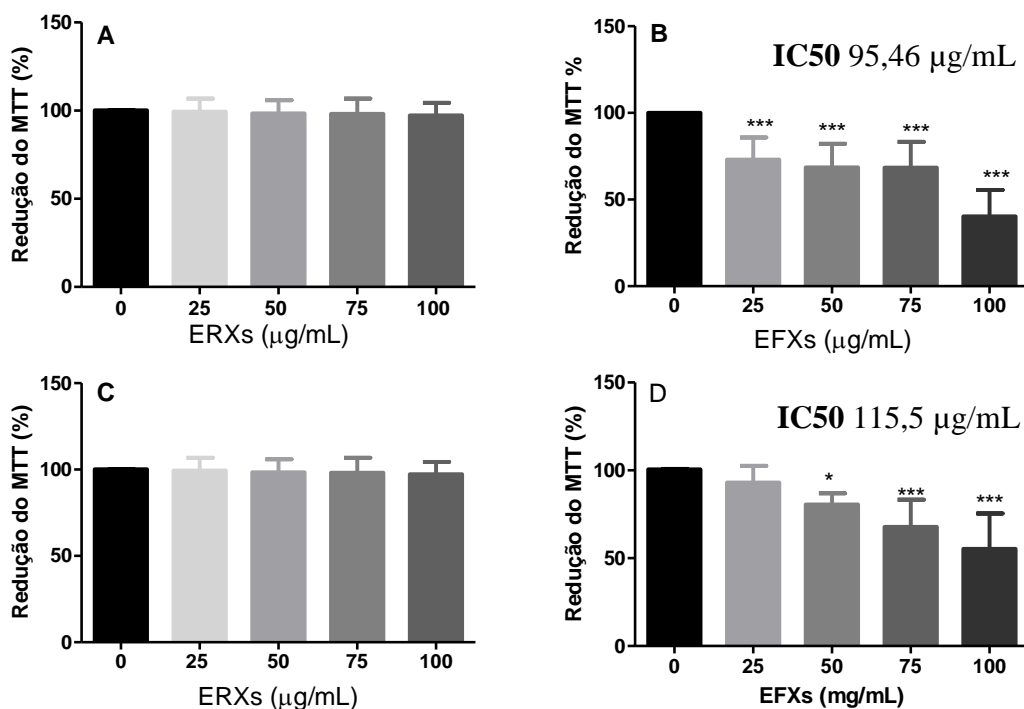


Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram tratadas por 48 h com os extratos (50 µg/mL) e a atividade redutora mitocondrial (ARM) foi determinada pela redução do MTT. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós- teste de Tukey).

Uma vez que não foi encontrada alta inibição da atividade redutora mitocondrial sobre células leucêmicas com o EFXs a 50 µg/mL, os efeitos com concentrações maiores das amostras foram estudados. Foi observado que o rizoma não apresentou atividade antitumoral mesmo em altas concentrações, nas linhagens celulares Jurkat e K562 (Figuras 34A e 34C, respectivamente). Porém, o EFXs apresentou atividade citotóxica em células Jurkat a partir de 25 µg/mL, com inibição de 26,9%, chegando à inibição de 59,6% na concentração de 100 µg/mL (Figura 34B), determinando-se um IC₅₀ de 95,46 µg/mL. Na linhagem K562 o tratamento com o EFXs apresentou redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 50 µg/mL (15,8%), atingindo 44,6% de inibição na concentração de 100

$\mu\text{g/mL}$ (Figura 34D), determinando-se um IC_{50} de $115,5 \mu\text{g/mL}$. É interessante notar que os valores de inibição em $100 \mu\text{g/mL}$ foram significativos nos tratamentos das duas linhagens leucêmicas.

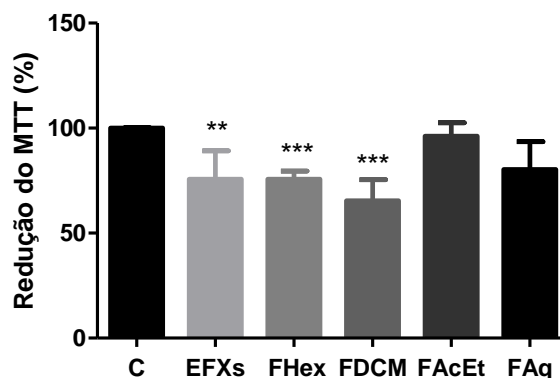
Figura 34- Efeito citotóxico de diferentes concentrações do ERXs e do EFXs em linhagens celulares leucêmicas. (A) Rizomas e (B) Folhas, em células Jurkat. (C) Rizomas e (D) Folhas, em células K562.



Legenda: As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram tratadas por 48 h com os extratos e a citotoxicidade determinada pelo ensaio do MTT. Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes, com triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Como o EFXs apresentou efeito melhor em ambas as linhagens, este extrato foi fracionado com o objetivo de potencializar o efeito nas frações. O fracionamento por partição líquido-líquido forneceu as frações FHEX, FDCM, FAcET e FAq. Após cultivar as células por 48 h com as amostras, observou-se redução na viabilidade das células Jurkat nos tratamentos com $50 \mu\text{g/mL}$ das frações FHEX e FDCM (Figura 35). A FHEX apresentou inibição de 25%, similar ao extrato bruto EFXs, enquanto a FDCM inibiu 35%. As frações polares não apresentaram inibição da viabilidade tumoral significativa.

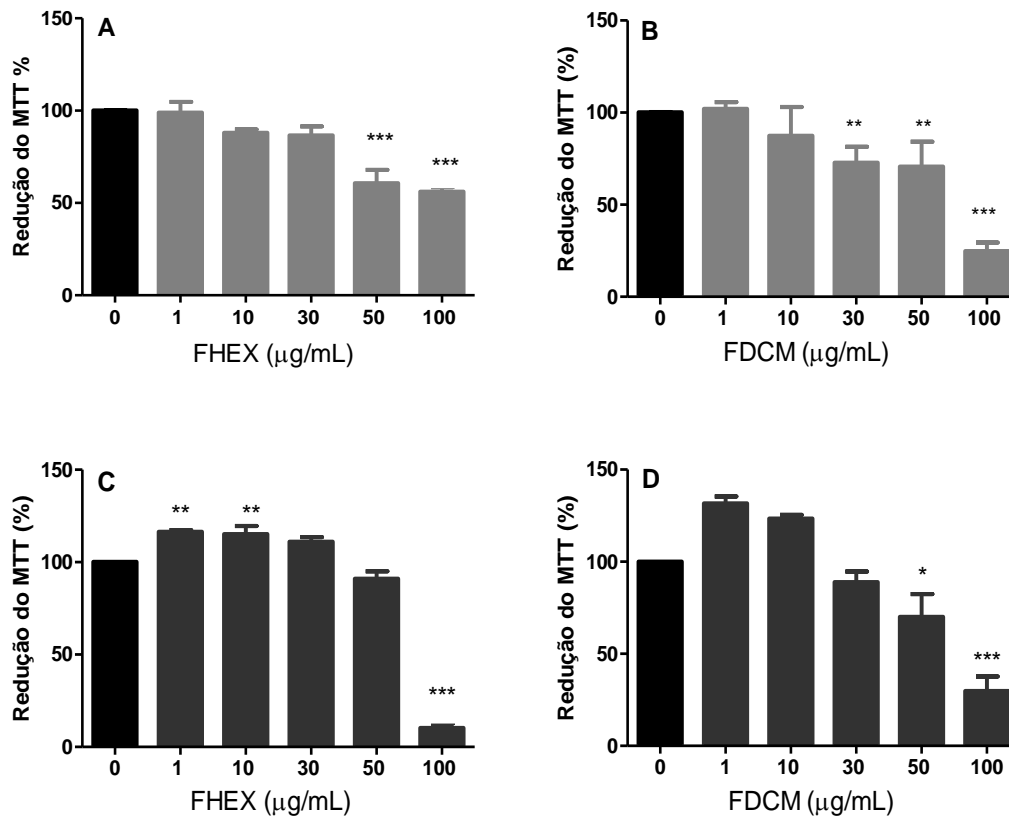
Figura 35- Efeito citotóxico do EFXs e suas frações em leucemia linfocítica Jurkat.



Legenda: As células Jurkat (1×10^5 /mL) foram tratadas com ou sem as amostras (50 μ g/mL) por 48 h. A atividade redutora mitocondrial foi determinada pela redução do MTT. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Uma vez demonstrado que a FHEX e a FDCM eram as mais ativas, a concentração destas frações em que o índice de inibição da viabilidade celular era de 50% (IC₅₀) foi determinada. Ambas as frações apresentaram efeito citotóxico de forma concentração dependente sendo verificada inibição da atividade redutora mitocondrial a partir da concentração de 50 μ g/mL de FHEX (Figura 36A) e de 30 μ g/mL de FDCM (Figura 36B) em células Jurkat. O IC₅₀ da FHEX foi de 118 μ g/mL, enquanto o IC₅₀ da FDCM foi 63,1 μ g/mL. Estes resultados corroboram dados da literatura de atividade antitumoral de plantas da família Araceae, que indicam a fração diclorometânica como a mais ativa. Na linhagem K562 as frações FHEX e FDCM mostraram inibição importante na concentração de 100 μ g/mL (89,6 e 70,2 %, respectivamente), porém nas menores concentrações apresentaram aumento na viabilidade celular das células leucêmicas, como representado nas Figuras 36C e 36D.

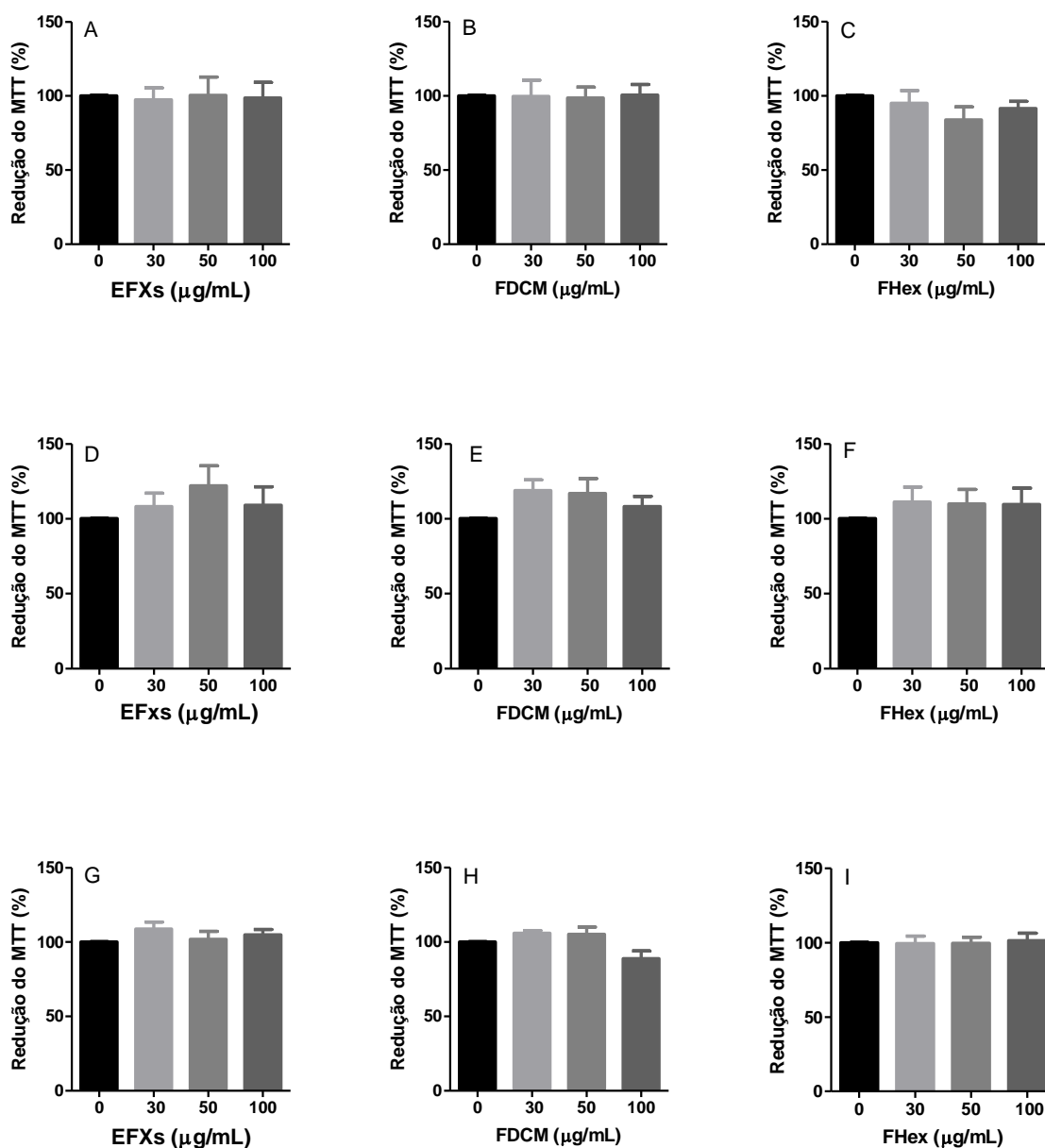
Figura 36- Efeito da concentração das frações apolares do EFXs na citotoxicidade sobre linhagens celulares leucêmicas. (A) Fração hexano (FHEX), (B) Fração diclorometano (FDCM) sobre linhagem leucêmica Jurkat e (C) FHEX, (D) FDCM sobre linhagem leucêmica K562.



Legenda: As células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram tratadas com os extratos por 48 h e a atividade redutora mitocondrial (ARM) determinada pela redução do MTT. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Diante da inibição apresentada para o EFXs na viabilidade celular de linhagens leucêmicas, resolveu-se investigar se este mesmo efeito seria observado em linhagens celulares de tumores sólidos, como carcinoma de pulmão (A549), de mama (MCF-7) e de próstata (PC3). Como não observamos inibição da viabilidade de células leucêmicas nas menores concentrações, investigamos a citotoxicidade das amostras apenas nas concentrações de 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Os tratamentos realizados com o EFXs, FHEX e FDCM em células tumorais de pulmão (Figura 37A, 37B e 37C), mama (Figura 37D, 37E e 37F) e próstata (Figura 37G, 37H e 37I) não apresentaram efeito inibidor significativo na viabilidade destas células, sugerindo um efeito específico do EFXs e frações para as leucemias.

Figura 37- Efeito da concentração do EFXs, FHex e FDCM na citotoxicidade sobre linhagens celulares de tumores sólidos. (A-B-C) A549, (D-E-F) MCF-7 e (G-H-I) PC3.

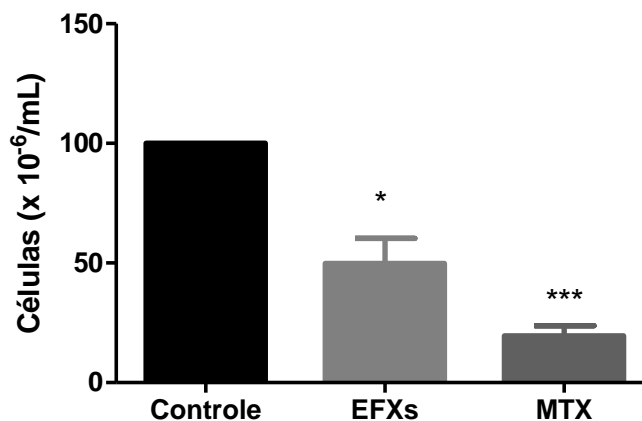


Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram tratadas com os extratos por 48 h e a atividade redutora mitocondrial (ARM) determinada pela redução do sal de tetrazol MTT. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. As diferenças não foram significativas (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

4.4.2 Efeito do EFXs e frações apolares na proliferação e morte da linhagem celular leucêmica Jurkat

Ao avaliar o número de células no tratamento de Jurkat com o EFXs e o MTX (50 µg/mL), observou-se uma inibição de 50,2%, para células tratadas com o EFXs, e 80,5%, para células tratadas com MTX, um quimioterápico utilizado no tratamento de leucemias e usado neste trabalho como controle positivo de droga antitumoral (Figura 38).

Figura 38- Efeito do EFXs na proliferação das células leucêmicas Jurkat

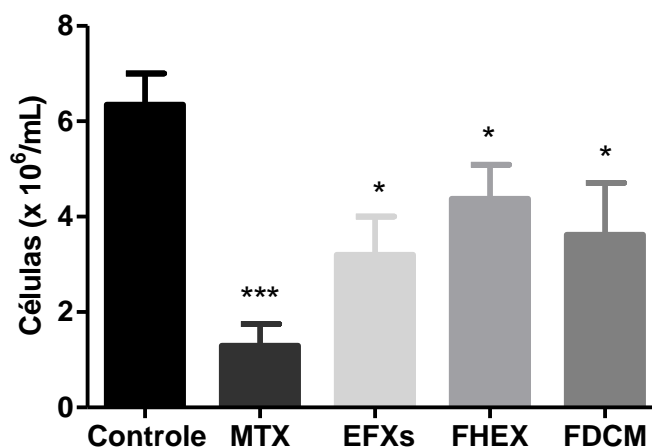


Legenda: Células Jurkat (1×10^5 /mL) foram incubadas na ausência ou presença do EFXs (50 µg/mL) ou metotrexato-MTX (2 µg/mL) por 48 h a 5% CO₂ e 37°C, e contadas com azul de tripano em câmara de Neubauer. Os resultados representam a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05, ***p< 0,001 em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Uma vez que o tratamento com o EFXs reduziu o número de células Jurkat em cultura (Figura 38), decidiu-se realizar a contagem do número destas mesmas células após o tratamento com a FHEX e FDCM. Observou-se também redução do número de células leucêmicas pelo tratamento com tais amostras, em relação ao controle (Figura 39). Apesar da taxa de redução no número de células, pela contagem com azul de tripano, com os tratamentos pelo EFXs, FHEX e FDCM (50,0%, 32,0% e 43,0%, respectivamente) (Figura 39), terem sido maiores, em relação aos índices de inibição da redução do MTT (Figura 35) (25%, 25% e 35%, respectivamente), não houve diferença estatística entre as amostras em nenhum dos dois ensaios.

Os maiores índices de inibição observados na contagem com azul de tripano talvez possam ser explicados pelo fato deste método excluir, da contagem, as células não viáveis, como células em apoptose. Por outro lado, talvez as células em apoptose inicial possam ainda apresentar algum metabolismo mitocondrial capaz de ser detectado pelo método do MTT, o que levaria a um menor índice de inibição da viabilidade.

Figura 39- Efeito do EFXs e suas frações apolares sobre a viabilidade de células Jurkat

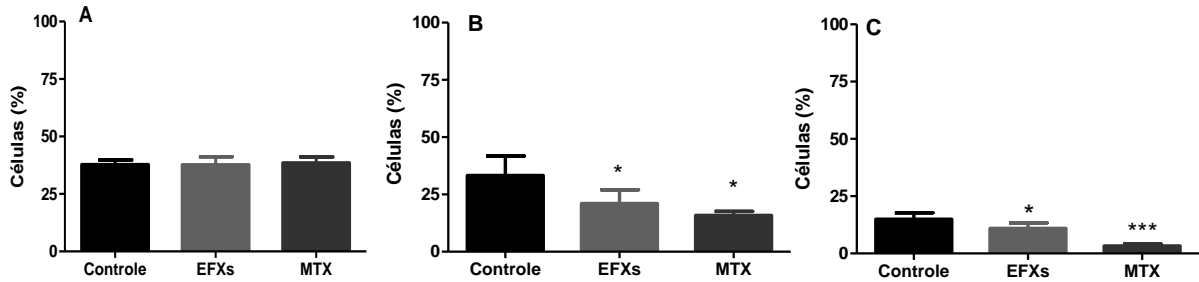


Legenda: Células Jurkat (1×10^5 /mL) foram incubadas na ausência ou presença do EFXs, frações apolares (50 μ g/mL) ou metotrexato-MTX (2 μ g/mL) por 48 h a 5% CO₂ e 37°C e posteriormente contadas com reagente azul de tripano. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Para aprofundar os estudos de tais amostras na ação antileucêmica, partiu-se para a investigação dos seus efeitos no ciclo celular e no processo de morte por apoptose. O EFXs reduziu o número de células em 11,4% na Fase S (Figura 40B) e em 30,7% na fase G2/M (Figura 40C), sem alterar a fase G1 (Figura 40A). O MTX também reduziu o percentual de células nas fases S (52%) e G2/M (78%).

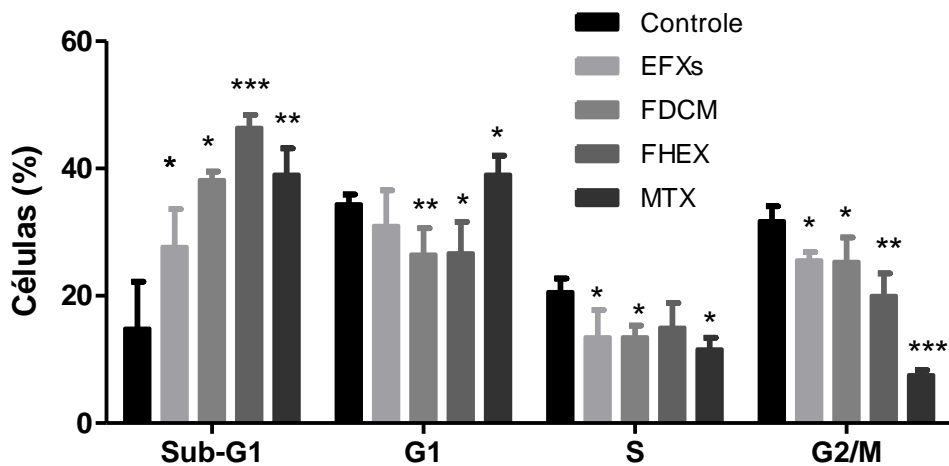
Análises de ciclo celular com as frações apolares (FHEX e FDCM) (Figura 41) indicam que estas frações induzem atividade antileucêmica aumentando o percentual de células na fase sub-G1 do ciclo (células apoptóticas) e reduzindo nas fases S e G2/M, em relação ao controle. Tanto o EFXs quanto a FHEX e FDCM inibiram a proliferação de células Jurkat e aumentaram Sub-G1 (85,9 %, 211% e 56,3 %, respectivamente), indicando associação à morte celular. O MTX também aumentou o número de células em Sub-G1 e reduziu em G2/M, mas aumentou o número de células na fase G1 e reduziu na fase S.

Figura 40- Efeito do EFXs sobre o ciclo celular da linhagem celular Jurkat. (A) Fase G1, (B) Fase S, (C) Fase G2/M.



Legenda: Células (1×10^5 /mL) foram incubadas na ausência ou presença do EFXs (50 μ g/mL) ou metotrexato-MTX (2 μ g/mL) por 48 h a 5% CO_2 e 37°C. Para análise do ciclo 1×10^6 de células foram tratadas com iodeto de propídio (PI), Triton X-100 e RNase, conforme descrito em métodos. Os resultados representam a média \pm DP do percentual de células em cada fase do ciclo celular, por citometria de fluxo, de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Figura 41- Comparação do efeito do EFXs com o das frações apolares sobre o ciclo celular da linhagem celular Jurkat.

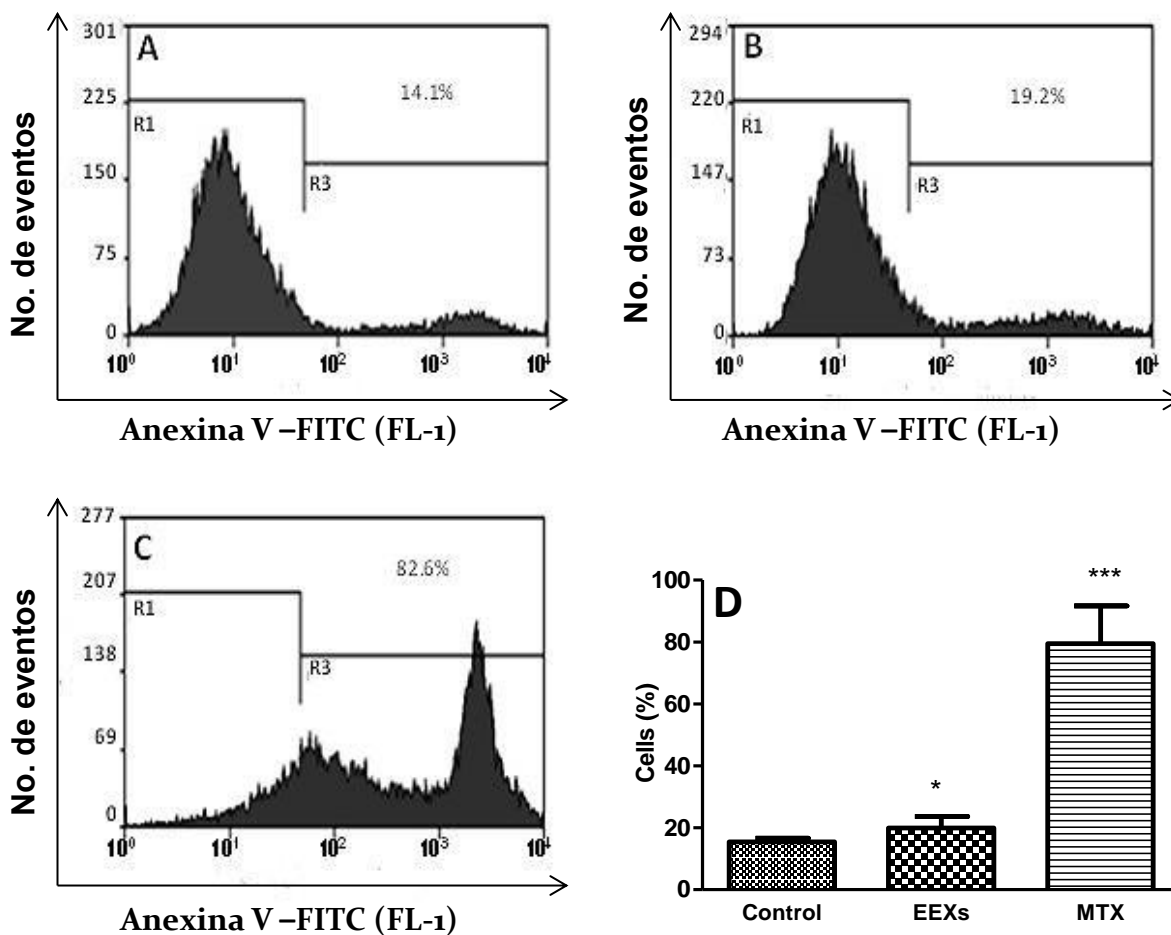


Legenda: Células Jurkat (1×10^5 /mL) foram incubadas ou não com as amostras por 48 h a 5% CO_2 e 37°C. Para análise do ciclo, 1×10^6 de células foram tratadas com iodeto de propídio (PI), Triton X-100 e RNase, conforme descrito em métodos. Os resultados representam a média \pm DP do percentual de células em cada fase do ciclo celular, por citometria de fluxo, de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Como o EFXs inibiu a proliferação e o ciclo celular, foi também avaliado o efeito desta amostra sobre a indução de apoptose, utilizando a exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, o que constitui um evento precoce na apoptose, característica usada para sua detecção. O tratamento com EFXs (Figura 42B) induziu um ligeiro, mas significativo, aumento (28%) na percentagem de células apoptóticas (Anexina V+), em relação ao controle (Figura 42A e 42D), enquanto que o MTX aumentou de forma intensa este processo (Figuras 42C, 42D).

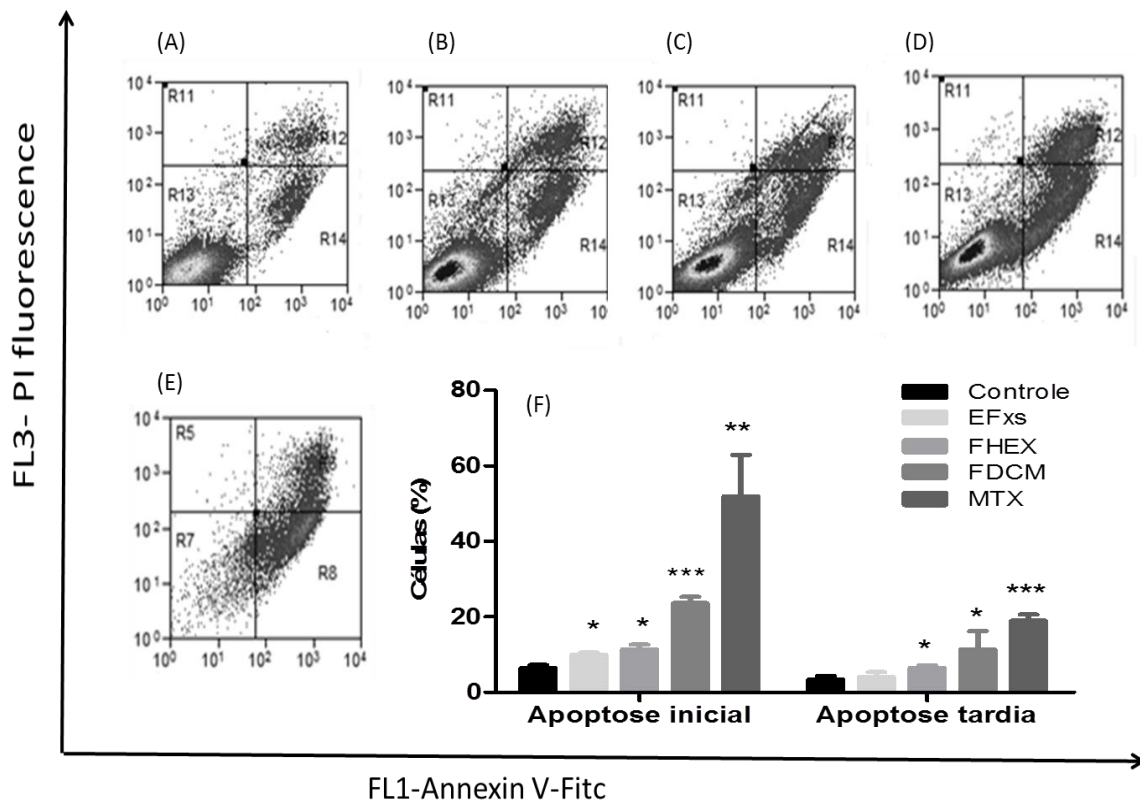
Tendo evidenciado que o efeito citotóxico do extrato bruto (EFXs) sobre células Jurkat estava relacionado com o processo de apoptose, resolveu-se avaliar os efeitos das frações apolares na apoptose de tais células. Podemos observar nos citogramas do experimento representativo de apoptose (Figuras 43A, B, C, D e E) que as células em apoptose inicial (quadrante inferior direito) apresentam alta fluorescência no canal FL-1 (Anexina-V-FITC) e baixa fluorescência no canal FL-3 (PI). O número de eventos nesse quadrante foi aumentando de forma crescente com os tratamentos pelo EFXs (Figura 43B), HEX (Figura 43C), FDCM (Figura 43D) e MTX (Figura 43E), em relação à cultura controle (Figura 43A). As células em apoptose tardia (quadrante superior direito), com alta fluorescência para ambos os fluorocromos também pareceu aumentar após tratamento com todas as amostras (Figuras 43B-E), em relação ao controle (Figura 43A), entretanto só não aumentou significativamente com o EFXs (Figura 43F). Na análise das médias de no mínimo três experimentos, observa-se que a FHEX e a FDCM apresentam aumentos de 77,5% e 265%, respectivamente, no percentual de células em apoptose inicial (Anexina V⁺PI⁻) e de 93% e 239%, respectivamente, para células em apoptose tardia (Anexina V⁺PI⁺), em relação à cultura controle, respectivamente (Figura 44A e 44F), enquanto o EFXs só mostrou aumento no percentual de células em apoptose inicial (aumento de 54,2%), em relação ao controle. Com relação à apoptose total (somatório de apoptose inicial e tardia), o EFXs e as frações FHEX e a FDCM induziram aumentos de 43,2%, 82,9% e 256%, respectivamente. O MTX também aumentou o número de células em apoptose, tanto inicial quanto tardia (Figura 43 F). Uma vez que foi observada a atividade antileucêmica das frações apolares, estas foram investigadas quanto à sua constituição química.

Figura 42- Efeito do EFXs na apoptose de células Jurkat, por marcação com Anexina V-FITC-PI. (A) Controle, (B) EFXs e (C) MTX representam histogramas de intensidade de fluorescência da Anexina V-FITC de um experimento representativo. (D) Percentagem média de células apoptóticas totais (anexina V+) nas diferentes culturas.



Legenda: Células Jurkat (1×10^5 /mL) foram incubadas na ausência ou presença do EFXs (50 μ g/mL) ou metotrexato-MTX (2 μ g/mL) por 48 h a 5% CO_2 e 37°C. Posteriormente, as células (1×10^5) foram incubadas com PI e Anexina V-FITC e a fluorescências do PI e FITC detectadas por citometria de fluxo (canais FL-3 e FL-1, respectivamente). Em D os resultados representam a média \pm DP do percentual total de células apoptóticas (Anexin V+) em cada condição de cultura, de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Figura 43- Efeito do EFXs e suas frações apolares na apoptose de células Jurkat, por marcação com Anexina V-FITC-PI. (A) Controle, (B) EFXs, (C) FHEX, (D) FDCM e (E) MTX representam citogramas de um experimento representativo. (F) Percentual médio de células em apoptose inicial (Anexina⁺PI⁻) e tardia (Anexina⁺PI⁺) nas diferentes culturas



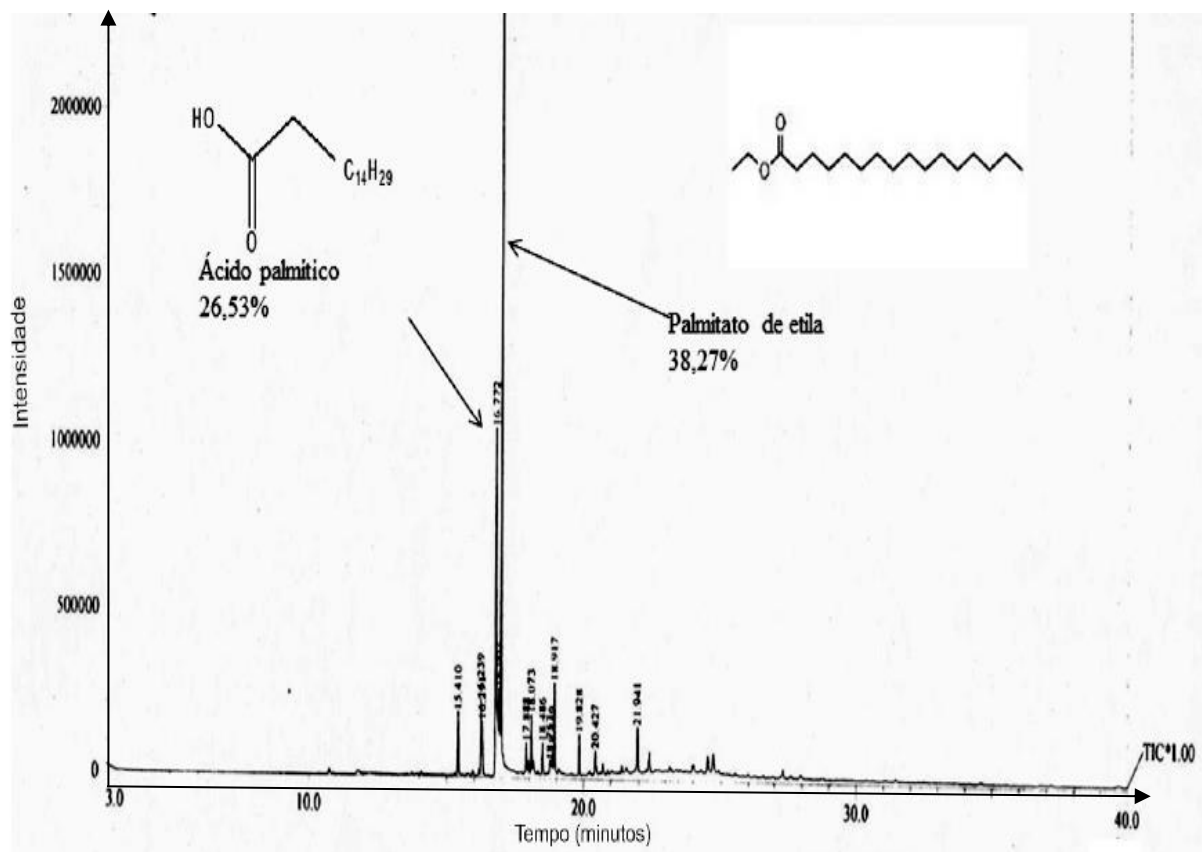
Legenda: Células Jurkat (1×10^5 /mL) foram incubadas na ausência ou presença do EFXs, FHEX, FDCM (50 μ g/mL) ou metotrexato-MTX (2 μ g/mL) por 48 h a 5% CO_2 e 37°C. As células (1×10^5) foram incubadas com PI e anexina V-FITC. Os resultados em F representam a média \pm DP do percentual total de células apoptóticas (Anexin V+) em cada condição de cultura, de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$, em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

4.4.3 Análise das frações mais ativas por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas-CG-MS

A análise por cromatografia gasosa da FHEX mostrou o perfil apresentado na Figura 44, com dois picos majoritários com áreas relativas de 26,53% e 38,27%. Tais picos foram identificados como ácido palmítico e palmitato de etila, por comparação dos fragmentogramas obtidos por CG-MS (Figura 45) com o banco de dados NIST. A análise da FDCM por cromatografia gasosa é apresentada na Figura 46 e mostrou a presença de três picos com áreas relativas de 46,47%, 28,60% e 24,93%, e tempos de retenção de 18,03 min, 5,14 min e 8,93 min, respectivamente. Tais picos foram identificados como ácido palmítico, ácido pentanoico e glicerol, respectivamente, conforme mostram os fragmentogramas (Figura 47A, 47B e 47C, respectivamente). O ácido palmítico está presente como composto majoritário (TR de 18,03 min e área relativa de 46,47%). O EFXs não foi analisado por GC-MS por possuir

majoritariamente compostos mais hidrossolúveis como flavonoides do tipo flavonas, principalmente diglicosídeos de apigenina, conforme demonstrado na parte 1 (Figura 24).

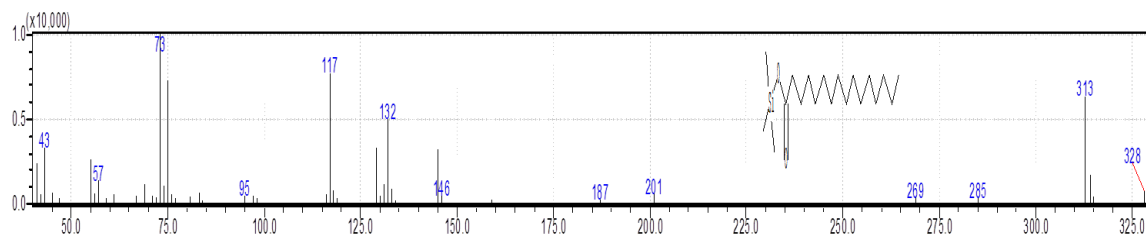
Figura 44- Cromatograma da fração hexânica do EFXs, obtido por CG-EM.



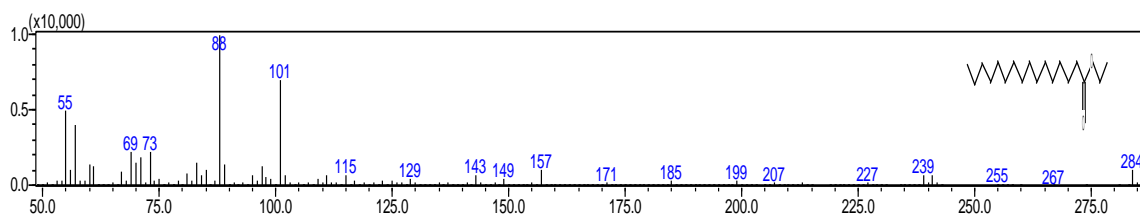
Legenda: Foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5Ms (L=30 m; d=0,25 µm) e hélio como gás de arraste, fluxo com taxa de 1 mL/min e injeção no modo *Split* com taxa 1:40.

Figura 45- Espectros de massas referentes aos picos com tempos de retenção (TR) de 16,77 min (área relativa de 26,53%) e 16,96 min (área relativa de 38,27%), do cromatograma da fração hexânica de EFXs por GC-MS.

Ácido palmítico (26,53%)

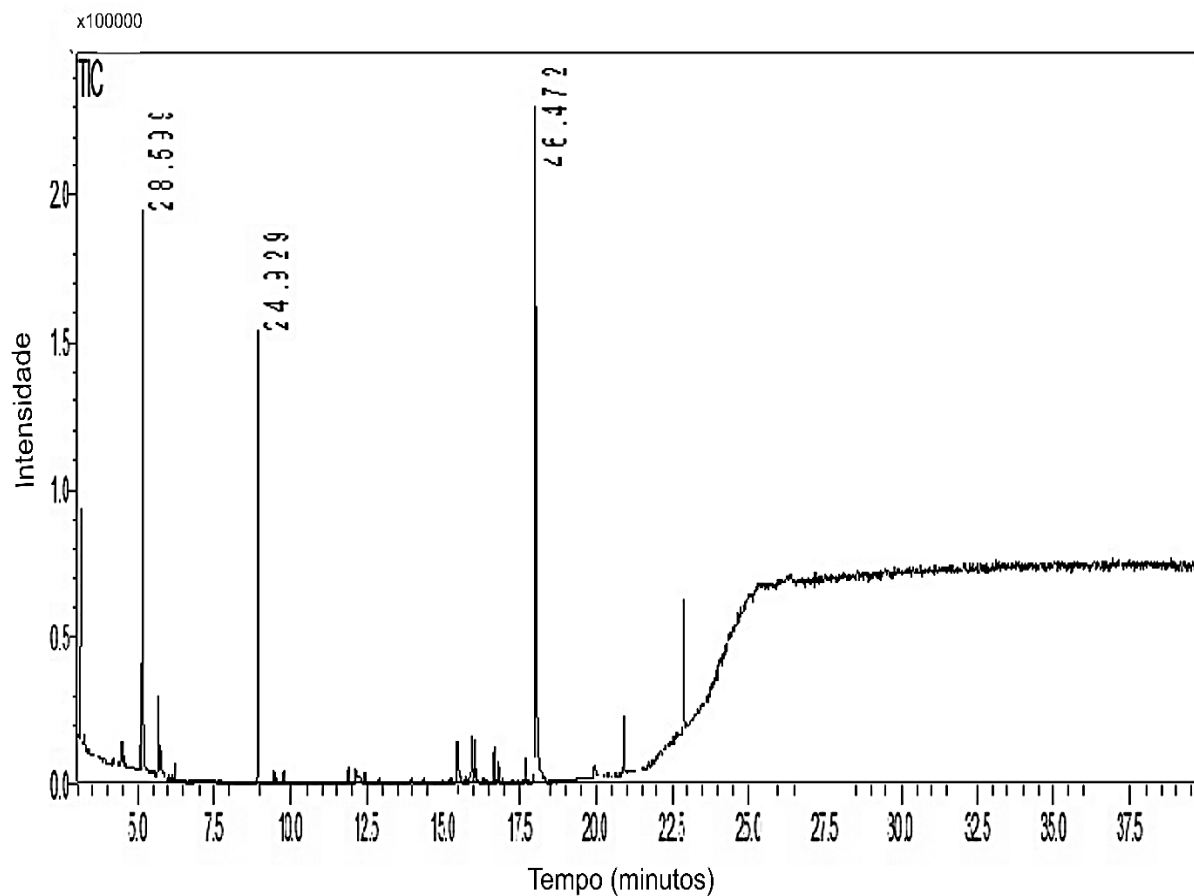


Palmitato de etila (38,27%)



Legenda: Foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5Ms (L=30 m; d=0,25 µm) e fluxo com taxa de 1 mL/min e injeção no modo split com taxa 1:40.

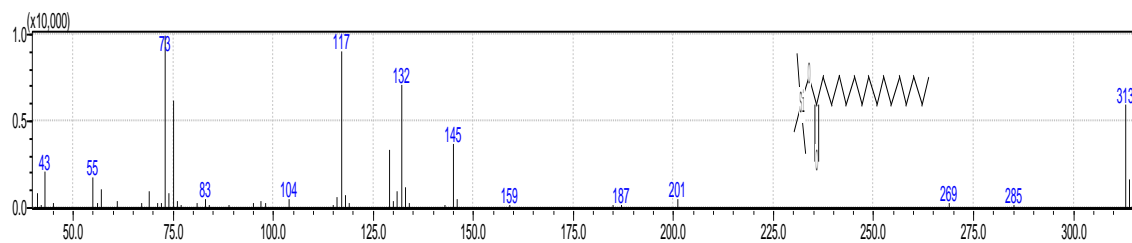
Figura 46- Cromatograma da FDCM, obtido por CG-EM.



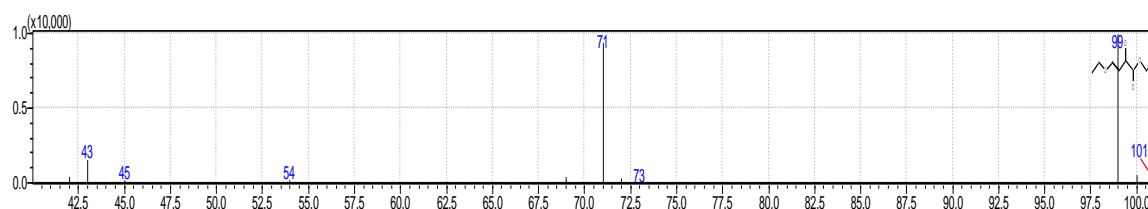
Legenda: Foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5Ms (L=30 m; d=0,25 μ m) e hélio como gás de arraste, fluxo com taxa de 1 mL/min e inje o no modo *split* com taxa 1:40.

Figura 47- Espectro de massas referentes aos picos majoritários do cromatograma da FDCM por CG-EM. (A) ácido palmítico. TR: 18,03 min e área relativa 46,47%; (B) ácido pentanoico. TR: 5,14 min e área relativa 28,60%; (C) Glicerol. TR: 8,93 min e área relativa de 24,93%.

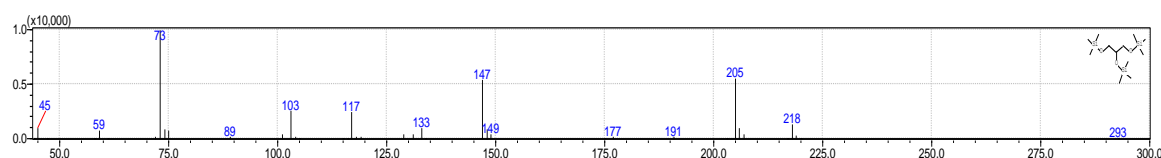
A. Ácido palmítico (46.47) (I)



B. Ácido pentanoico (28.60)(II)



C. Glicerol (24.93) (III)

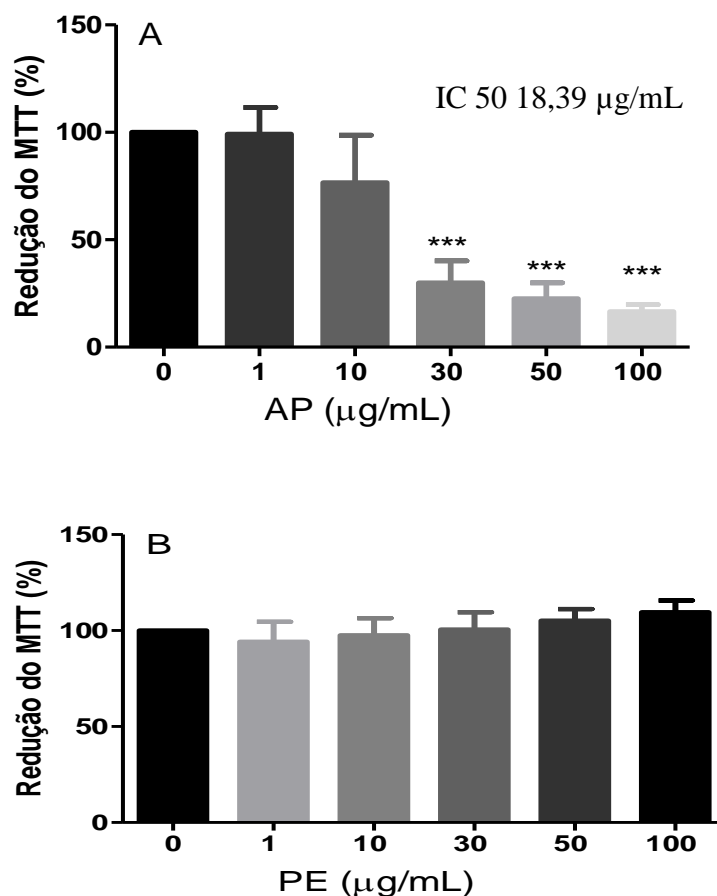


Legenda: Foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5Ms (L=30 m; d=0,25 µm) e fluxo com taxa de 1 mL/min e injeção no modo *split* com taxa 1:40.

4.4.4 Citotoxicidade do ácido palmítico e palmitato de etila sobre células Jurkat

Tendo observado que as frações apolares FHEX e FDCM possuem como constituintes majoritários o ácido palmítico e o palmitato de etila, o efeito citotóxico destas substâncias também foi investigado em células leucêmicas Jurkat. Assim como foi verificado com as frações apolares, o ácido palmítico reduziu a viabilidade das células de forma concentração dependente, com IC₅₀ de 18,39 µg/mL (Figura 48A). O palmitato de etila não mostrou efeito antileucêmico *in vitro* (Figura 48B). Esses resultados sugerem que o ácido palmítico, e não o palmitato de etila esteja envolvido na ação antileucêmica das amostras de *X. sagittifolium*, corroborando os dados da literatura que indicam a participação dos AG em diversos processos bioquímicos que levam à inibição do crescimento tumoral.

Figura 48- Efeito citotóxico do palmitato de etila (A) e ácido palmítico (B) em linhagem leucêmica Jurkat.

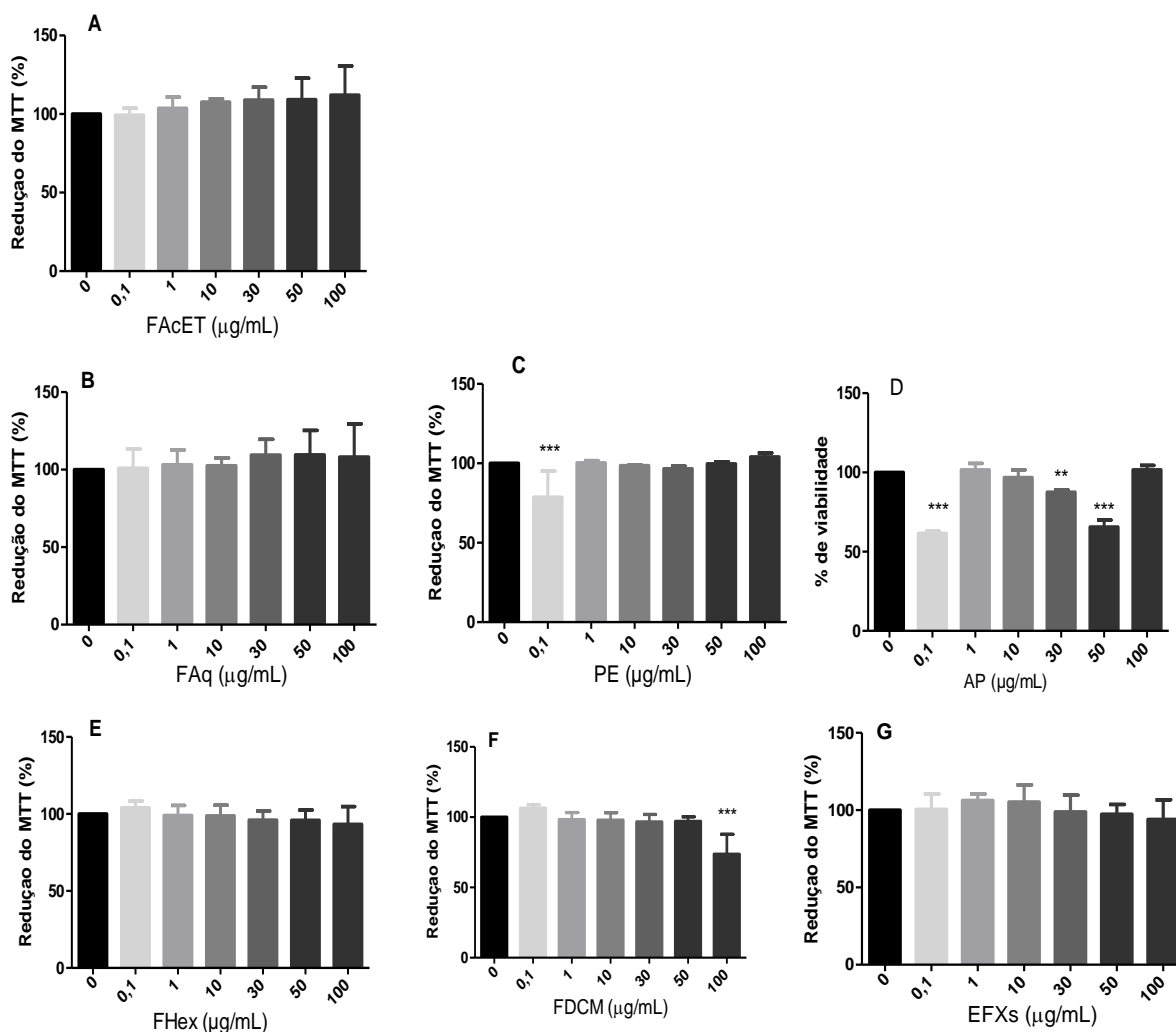


Legenda: As células Jurkat (1×10^5 /mL) foram tratadas com as substâncias majoritárias da FHEX e FDCM (AP e PE) por 48 h e a atividade redutora mitocondrial (ARM) determinada pela redução do sal de tetrazol MTT. O resultado representa a média \pm DP de dois experimentos independentes, com triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle (One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

4.4.5 Citotoxicidade do EFXs, frações, ácido palmítico e palmitato de etila sobre fibroblastos normais NIH/3T3

Tendo observado que as amostras de *X. sagittifolium* apresentam atividade antileucêmica em diferentes níveis, decidiu-se investigar seus efeitos citotóxicos das mesmas sobre células não tumorais. O tratamento de fibroblastos normais com as frações polares e apolares de *X. sagittifolium*, bem com o EFXs, ácido palmítico e palmitato de etila, identificados como constituintes majoritários nas frações apolares, não resultou em reduções significativas da viabilidade das células não tumorais (fibroblastos) na maioria das amostras (Figura 49). A citotoxicidade foi observada apenas nos tratamentos coma FDCM, na maior concentração (100 µg/mL) e com o ácido palmítico.

Figura 49- Efeito citotóxico do EFXs, frações, ácido palmítico e palmitato de etila em linhagem celular não tumoral (fibroblastos NIH-373). (A) Fração acetato de etila (FAcEt), (B) fração aquosa (FAq), (C) Palmitato de etila (PE), (D) Ácido palmítico (AP), (E) Fração hexânica (FHEX), (F) fração diclororometânica (FDCM) e (G) extrato bruto (EFXs).

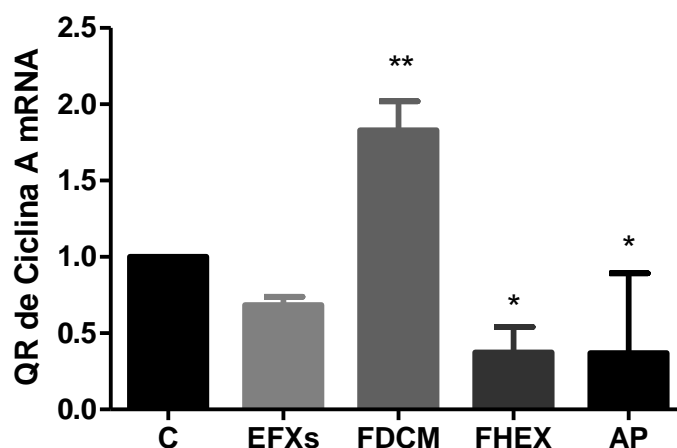


Legenda: Fibroblastos NIH-373 (1×10^5 /mL) foram tratados com as amostras por 48 h e a atividade redutora mitocondrial (ARM) determinada pela redução do MTT. O resultado representa a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

4.4.6 Estudo de possíveis mecanismos de ação antileucêmica de *X. sagittifolium*

Tendo observado inibição da proliferação de células Jurkat pelo EFXs e suas frações apolares, decidiu-se avaliar o efeito dessas amostras e do ácido palmítico sobre a expressão de uma das proteínas reguladoras do ciclo celular, a ciclina A. O tratamento com o EFXs mostrou uma tendência em diminuição da expressão desta ciclina, mas que não foi significativa. A FDCM aumentou em 83% a expressão, enquanto a FHEX e o ácido palmítico reduziram em 63% e 64% a expressão do mRNA da ciclina A, respectivamente (Figura 50).

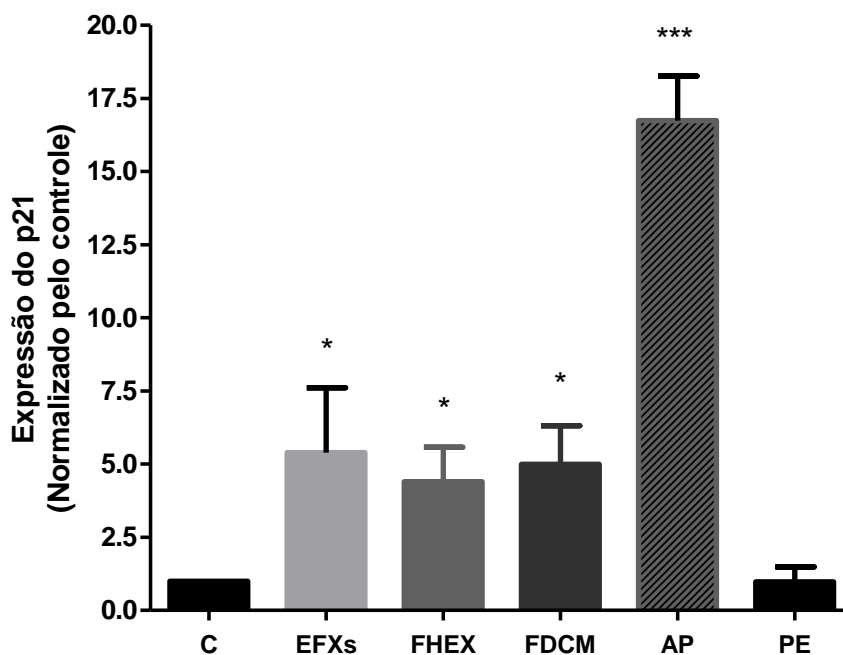
Figura 50- Efeito do EFXs, frações diclorometânica (FDCM), hexânica (FHEX) e ácido palmítico (AP) na expressão do mRNA da ciclina A em células Jurkat, PCR em tempo real.



Legenda: As células (1×10^5 /mL) foram tratadas com as amostras por 48 h, o mRNA foi extraído com trizol e a qPCR foi realizada, utilizando o gene da GAPDH como referência. A quantificação relativa (QR) de mRNA do gene alvo (ciclina A) foi feita pelo método de $\Delta\Delta C_t$, usando a cultura controle como amostra calibradora. Dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

Ainda avaliando os efeitos do EFXs e frações apolares na expressão do mRNA de proteínas reguladoras do ciclo celular, decidiu-se avaliar nas células Jurkat tratadas com todas as amostras, a expressão da proteína p21, um inibidor do ciclo celular. A Figura 51 mostra um aumento significativo da expressão da proteína p21 nas células tratadas com EFXs, FHEX e FDCM, aumento acentuado com ácido palmítico e nenhum efeito no tratamento com palmitato de etila.

Figura 51- Efeito do EFXs, frações apolares, ácido palmítico e palmitato de etila na expressão da proteína p21, por citometria de fluxo em células Jurkat.

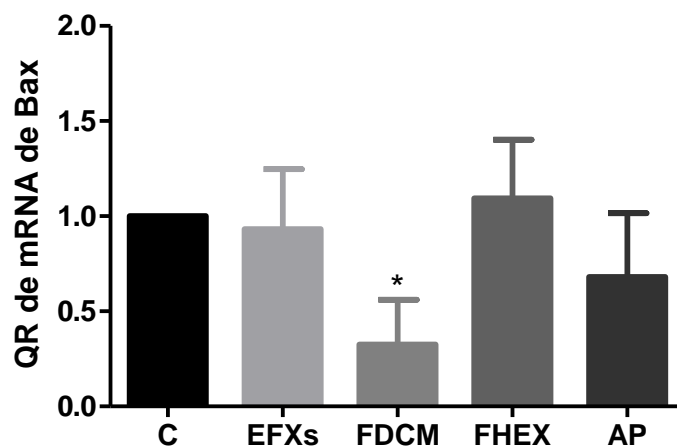


Legendas:

Células Jurkat (1×10^5 /mL) foram incubadas na ausência ou presença das amostras (50 μ g/mL) por 48 h a 5% CO_2 e 37°C. Os resultados representam a média \pm DP (três experimentos independentes) da mediana da intensidade de fluorescência (canal FL-2) das células Jurkat marcadas com anticorpo anti-p21 (marcado com PE). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Como o aumento da p21 também pode estar relacionado à indução de apoptose e o mecanismo de apoptose pode ser iniciado por múltiplas vias, a próxima etapa deste trabalho foi investigar se a apoptose das células leucêmicas estava relacionada com o mecanismo intrínseco de ativação da apoptose, avaliando a expressão do mRNA da proteína pró-apoptótica Bax. A Figura 52 mostra os efeitos do EFXs, FDCM, FHEX e ácido palmítico na expressão desta proteína. Nenhuma diferença significativa foi observada com os tratamentos pelo EFXs, FHEX ou ácido palmítico, enquanto a FDCM reduziu a expressão do mRNA desta proteína.

Figura 52- Efeito do EFXs, frações apolares e ácido palmítico na expressão do mRNA da proteína pró-apoptótica Bax em células Jurkat, PCR em tempo real.



Legenda: As células Jurkat (1×10^5 /mL) foram tratadas com as amostras por 48 h, o mRNA foi extraído com trizol e a qPCR foi realizada, utilizando o gene da GAPDH como referência. A quantificação relativa (QR) de mRNA do gene alvo (Bax) foi feita pelo método de $\Delta\Delta C_t$, usando a cultura controle como amostra calibradora. Dados representam a média \pm DP de dois (EFXs e AP) ou três (FHEX e FDCM) experimentos independentes. * $p < 0.05$, em relação ao controle (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

4.5 Discussão

As investigações epidemiológicas indicam que dietas com alto teor de frutas e vegetais fornecem um meio de quimioprevenção do câncer, devido à presença de componentes provenientes do metabolismo secundário das plantas (Dong *et al.*, 2013). Além disso, muitas drogas antitumorais foram elaboradas a partir de moléculas de ocorrência natural ou desenvolvidas a partir de seus análogos sintéticos (Montañez *et al.*, 2015).

O protocolo do NCI (National Câncer Institute) para a avaliação de fármacos antitumorais indica a determinação da atividade mitocondrial como uma ferramenta para *screening* de doses e de tempo, na avaliação de composto(s) a ser(em) testado(s) quanto à viabilidade ou crescimento celular. Este trabalho mostra os efeitos de extratos de *X. sagittifolium* e suas frações sobre células leucêmicas.

Diferentes efeitos citotóxicos dos extratos de rizoma e folhas em células leucêmicas, têm sido descritos para outras espécies vegetais como *Alpinia scabra* (Blume) e *Colocasia esculenta* (Brown *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2013). Esta diferença no efeito deve ter relação com os constituintes dos extratos, visto que estudos fitoquímicos têm mostrado a presença de lectinas nos rizomas, e compostos fenólicos no extrato da folha (Picerno *et al.*, 2003). É importante destacar que atividade antileucêmica semelhante à do EFXs tem sido descrita para o extrato de *Typhonium flagelliforme*, outra espécie da mesma família (Lai *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2010).

O fracionamento do EFXs indicou as frações apolares, FHEX e FDCM, como as mais ativas quanto ao efeito antileucêmico. Sugere-se que essa maior atividade esteja relacionada à maior facilidade com que os constituintes lipofílicos das mesmas devam se difundir pelas membranas biológicas e exercerem seus efeitos (Cahoon e Schimid, 2008). No entanto, a citotoxicidade dessas amostras se mostrou específica para as linhagens celulares leucêmicas, não sendo ativa sobre carcinoma de pulmão (A549), mama (MCF-7) ou próstata (PC3). Cada tumor apresenta características e vias de morte específicas, e alguns estudos indicam que, na leucemia, os ácidos graxos induzem morte celular atuando na expressão de genes específicos relacionados ao ciclo celular e apoptose (Cury *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Iburguren *et al.*, 2014). Desta forma, alguns aspectos moleculares envolvidos nos mecanismo de ação das amostras EFXs, FDCM e FHEX podem ser específicos para linhagens leucêmicas, não induzindo tais efeitos nas outras linhagens tumorais estudadas. Por outro lado, estudos com extratos de outras plantas da família Araceae apresentaram atividade citotóxica sobre diversos tipos de tumores, porém com IC50 maiores do que os observados neste estudo e tempos de incubação com as plantas também diferentes. A ausência de citotoxicidade do EFXs e da FHEX sobre fibroblastos não tumorais representa um resultado promissor desta planta na busca de potenciais agentes com ação antileucêmica, assim como demonstrado para o extrato de *Colocasia esculenta* Schoot (Brown *et al.*, 2005), uma planta desta mesma família.

Tendo observado que o EFXs e suas frações apolares reduziram a ARM de células leucêmicas, decidiu-se avaliar se tal efeito era produto de inibição da proliferação celular, indução de morte ou apenas redução do nível de ativação da célula. Para avaliar a influência das amostras na proliferação celular estudou-se seus efeitos nas diferentes fases do ciclo celular. As fases G1, S e G2 são pré-mitóticas e sem a progressão subsequente por tais etapas, a célula não entra em mitose, isto é, não se duplica (Bretones *et al.*, 2014). Os tratamentos das células leucêmicas com o EFXs e suas frações apolares reduziram o percentual de células na fase G2M, indicando redução do número de células com todo o seu conteúdo duplicado, resultando em redução da proliferação celular. Este efeito é de grande importância no tratamento do câncer uma vez que pode reduzir ou inibir a progressão da doença. O metotrexato (MTX) é um inibidor competitivo do metabolismo do folato, o qual é essencial para a síntese de bases nitrogenadas e de ácidos nucleicos. Desta forma, o MTX inibe o ciclo celular, sendo utilizado na clínica para o tratamento de artrite reumatoide, câncer e outras doenças relacionadas a processos inflamatórios (Genestier *et al.*, 2000; Wood e Wu, 2015). Entretanto, enquanto o MTX inibe a progressão do ciclo de G1 para S, aumentando o número de células em G1 e reduzindo na fase S, conforme demonstrado anteriormente (Tsurusawa *et al.*, 1988; Moralli *et al.*, 2013), as frações apolares do EFXs reduziram as células na fase G1, não alterando significativamente a fase S. O aumento no percentual de células na fase sub-G1

após tratamento com EFXs, FDCM e FHEX sugere que tais amostras estejam induzindo morte celular, em associação à redução da proliferação, o que também foi observado com o MTX, corroborando dados da literatura (Pavelié *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2015). Estudos com várias espécies da família Araceae vêm mostrando efeito inibidor do ciclo celular, embora em diferentes fases do mesmo, como listados a seguir. Hsu e colaboradores (2011) observaram que o tratamento com o extrato etanólico de folhas secas de *Typhonium blumei* promoveu a parada do ciclo celular de células A549 (câncer de pulmão) em G2/M. O mesmo efeito foi visto em tratamento de células de câncer de fígado com extrato metanólico de *Rhaphidophora korthalsii* (Yeap *et al.*, 2007). Em estudos com extrato de *Typhonium giganteum* Engl., Li e colaboradores (2011) constataram que o tratamento de células de câncer de fígado (SMC-7721) induziu parada do ciclo na fase S e G2/M, enquanto Wei e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento de células de câncer gástrico com extrato etanólico de *Alocasia cucullata* (Lour.) G. Don induziu parada do ciclo celular na fase G1, inibindo assim a progressão da divisão celular e proliferação do tumor. O mesmo efeito foi observado em estudos com células leucêmicas tratadas com extrato diclorometano de *Typhonium flagelliforme* (Mohan *et al.*, 2010).

Para estudar o tipo de morte envolvido na ação antileucêmica das amostras de *X. sagittifolium*, realizou-se a marcação de células com anexina V, técnica tradicionalmente utilizada para detecção de células apoptóticas. Os resultados deste ensaio indicaram que o EFXs e suas frações apolares induzem morte por apoptose em células leucêmicas, embora em menor intensidade do que o MTX. Entretanto, a FDCM mostrou efeito significativamente maior que o EFXs e FHEX. A indução de apoptose pelo MTX tem sido demonstrada na literatura (Mukherjee *et al.*, 2013; Nihal *et al.*, 2014). Tais resultados são de grande importância desde que a apoptose vem sendo descrita como um mecanismo comum de ação de quimioterápicos antitumorais, incluindo os medicamentos derivados de produtos naturais (Ferreira e Rocha, 2010). Os resultados significativamente diferentes entre a FDCM e o EFXs e FHEX levantaram o questionamento se tais diferenças poderiam estar relacionadas com a diferente composição química dos mesmos.

Para tentar entender essa questão, como as amostras mais ativas apresentavam grande apolaridade, e uma vez que os AG livres são conhecidos por desempenharem importante função em numerosos processos biológicos, como multiplicação celular e indução de apoptose (Takeara e colaboradores (2008), neste trabalho, as amostras tiveram as suas composições analisadas por GC-MS, e os efeitos citotóxicos das substâncias majoritárias foram avaliados sobre as células leucêmicas. A análise por GC-MS evidenciou o palmitato de etila (PE) (38,27%) como composto majoritário na FHEX, seguido do ácido palmítico (AP)

(26,53%), enquanto na FDCM o ácido palmítico apareceu como composto majoritário (46,47%), seguido do ácido pentanoico (28,60%) e glicerol (24,93%).

Inicialmente, a citotoxicidade dos compostos majoritários AP e PE foi avaliada sobre células leucêmicas, mostrando que o ácido palmítico é capaz de inibir, de forma concentração-dependente, a ARM destas células (Figura 48), com IC₅₀ de 18,39 µg/mL, conforme já descrito por outros autores (Takeara *et al.*, 2008, Harada *et al.*, 2002), o que não foi observado com o palmitato de etila em células leucêmicas, nas concentrações testadas (Figura 48). Desta forma, a presença do ácido palmítico como majoritário na FDCM (46,47%) e como segundo majoritário na FHEX (26,53%) pode estar contribuindo para os efeitos destas frações e para o efeito mais acentuado da FDCM (Figura 36), comparado ao da FHEX (Figura 36), na toxicidade sobre células Jurkat. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, que mostram ação citotóxica do AP sobre células leucêmicas (Pizer *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 2015).

Da mesma forma, a inibição de algumas fases do ciclo celular de células leucêmicas pelo tratamento com o EFXs e suas frações apolares, principalmente a FDCM, pode estar relacionada com a presença de quantidades significativas de AP nestas amostras, principalmente a FDCM, onde é majoritário, pois a inibição do ciclo celular pelo AP também tem sido descrita na literatura (Zeng *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2003). Embora neste trabalho o PE não tenha mostrado efeito citotóxico sobre células leucêmicas (Figura 48), Aydin e colaboradores (2005) demonstraram que o tratamento de células tumorais HEPG2 com o PE, não só induziu citotoxicidade, mas também inibiu o ciclo celular, acumulando células nas fases S e G₂/M. Entretanto, a ação antitumoral do AP e do PE é controversa. Takeara e colaboradores (2008) demonstraram atividade antileucêmica mais forte com a mistura dos ésteres palmitato de metila, miristato de metila e estearato de metila, do que com o ácido palmítico. Aydin e colaboradores (2004) verificaram ação antitumoral sobre células HEPG2 tratadas com palmitato de etila (PE) e estearato de etila (ES). Por outro lado, Nano e colaboradores (2003) demonstraram que o AP não inibe a proliferação de linhagem celular de tumor intestinal (Caco2) ou de pâncreas. Pode ser que a diferença do tipo de célula tumoral, tipo de ensaio e/ou condições experimentais estejam relacionados com as diferenças observadas entre os efeitos descritos para o AP e também para o PE.

A indução de apoptose em células de câncer representa um mecanismo bastante eficaz no tratamento da doença. A morte celular por apoptose é regulada por duas vias, extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca envolve receptores de morte e a via intrínseca ou via mitocondrial de ativação da apoptose depende de sinais de estresses intracelulares, incluindo as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, e as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, as quais desempenham funções importantes na regulação da apoptose. A ativação destas vias resulta

em ativação da caspase-3 e poli(ADP-ribose)-polimerase (PARP). No entanto, as células cancerosas, em especial as metastáticas, apresentam resistência a ambas as vias de ativação (Debatin, 2000; Fiandalo e Kyprianou, 2012). Tem sido demonstrado que os AG saturados parecem exercer efeito supressor da sobrevivência celular, o que parece ser causado por indução de apoptose, evidenciada pela fragmentação de DNA e marcação por anexina V (Mu e colaboradores 2001). A apoptose induzida pelas amostras de *X. sagittifolium*, e em nível mais acentuado na FDCM, demonstrada neste trabalho, também pode estar relacionada com a presença majoritária do AP nesta fração, já que tal efeito também tem sido demonstrado na literatura para este ácido graxo (Nagata *et al.*, 2015). Com relação aos efeitos do PE na apoptose, Aydin e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento de células tumorais HEPG2 com os ésteres PE e estearato de etila (ES) induziram morte celular com alterações morfológicas e moleculares típicas de apoptose.

Investigações realizadas *in vitro*, em células tumorais, ou em modelos de tumor *in vivo*, após condicionamento dietético, mostram evidências de que muitos lipídios e análogos lipídicos são reguladores críticos da tumorigênese (Kwam *et al.*, 2014). Além disso, anormalidades em moléculas reguladoras do ciclo celular, como perda ou redução da função dos inibidores do ciclo (ex. p21, p27, p14, etc.) e/ou alteração na expressão de ciclinas (A, D, E e B), têm sido associadas a muitos processos cancerígenos. A expressão do Cdk permanece relativamente constante ao longo do ciclo celular enquanto as ciclinas são sintetizadas e degradadas de uma forma cíclica durante o ciclo celular (Bretones *et al.*, 2015). Neste trabalho estudamos os efeitos do EFXs e suas frações FHEX e FDCM (ricas em constituintes apolares) na expressão de algumas dessas proteínas que regulam a proliferação celular.

Nossos resultados mostram que a expressão da ciclina A foi aumentada no tratamento da linhagem leucêmica Jurkat com a FDCM da taioba, enquanto a FHEX e o ácido palmítico isolados inibiram a expressão desta ciclina (Figura 51). A ciclina A é uma proteína reguladora do ciclo celular que se liga à CDK2, formando o complexo ciclina A-CDK2, o qual atua na fosforilação de proteínas responsáveis pela progressão da fase G2 para a fase M do ciclo celular (Liang *et al.*, 2015). Existem dois tipos de ciclina A: a ciclina A1 é expressa durante a meiose e na embriogênese, enquanto a ciclina A2 é expressa em células somáticas em divisão. A ciclina A ativa duas cinases dependentes de ciclina (CDKs) e participa da transição das fases G1/S e G2/M do ciclo celular (Liang *et al.*, 2015). A ciclina A2 pode ser utilizada para diagnóstico molecular, como um marcador de proliferação celular, e sua expressão aumentada está associada a um mau prognóstico em diversos tipos de câncer. A ciclina A1 encontra-se altamente expressa na leucemia mieloide aguda e no câncer testicular (Yasmeen *et al.*, 2003; Hseu *et al.*, 2014). A redução dos níveis de mRNA da ciclina A, observada após tratamento das células com a FHEX e ácido palmítico, pode estar relacionada com redução na expressão

da referida proteína, e portanto, com a inibição da proliferação, através da redução do percentual de células na fase G2/M. Como citado anteriormente, vários estudos com extratos de plantas da família Araceae e com ácido palmítico revelam efeitos no ciclo celular de células tumorais. Por outro lado, a FDCM mostrou aumento da expressão da ciclina A. Embora possamos pensar que o aumento desta ciclina possa estar relacionado com aumento da proliferação celular (já que sua redução inibe a proliferação), pode ser que isso não seja verdade e sim que o aumento de ciclina A também esteja relacionado com redução da proliferação, desde que as ciclinas são proteínas reguladoras do ciclo e precisam ter sua concentração muito bem definida para que o ciclo progrida normalmente (Aleem e Arceci, 2015).

A proteína p21 participa de diversas respostas a danos no DNA e está envolvida na regulação da transcrição gênica, do ciclo celular, da apoptose e da motilidade celular. As atividades quinase dos complexos ciclina/CDK são reguladas negativamente por proteínas inibidoras de CDK, incluindo as proteínas p21^{WAF1} (p21) e p27^{Kip1} (p27) (Li *et al.*, 2013). A p21 possui função inibidora de complexos ciclina/CDK envolvidos na transição G1-S (Zolota *et al.*, 2007). O aumento da expressão da proteína p21 nos tratamentos com o EFXs, frações apolares, e principalmente com o ácido palmítico, composto majoritário nestas frações (Figura 51), sugere que este aumento na expressão de p21 pode estar contribuindo para a inibição da proliferação celular e indução de apoptose, representando um importante mecanismo de ação antileucêmica das amostras de *X. sagittifolium*.

Os AG são sintetizados pela ácido graxo sintase (AGS), usando malonil-CoA e acetil-CoA como substratos, desempenhando, assim, função importante no armazenamento de energia, estrutura da membrana, acilação de proteínas, transdução de sinal e regulação da transcrição de genes (Zeng *et al.*, 2008). As células tumorais dependem da atividade da ácido graxo sintase (AGS) para a ativação da via de sinalização da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K)/Akt (Yellen e Foster, 2014), e a ativação da via da Akt (Murray *et al.*, 2015). A ativação desta via reduz a atividade de p21^{Cip1} e p27^{Kip1} (inibidores do ciclo celular) e inibe diretamente mediadores pró-apoptóticos como Bad, Bim e pro-caspase-9 (Murray *et al.*, 2015), aumentando a sobrevivência da célula tumoral e estimulando sua proliferação. Desta forma, uma ação inibidora da AGS sobre a via da PI3K/Akt não é favorável para a célula tumoral, uma vez que com a inibição da via da Akt, a atividade de p21^{Cip1} e p27^{Kip1} estaria aumentada, inibindo a proliferação da célula tumoral e induzindo apoptose (Yellen and Foster, 2014). Uma vez que tem sido descrito que o ácido palmítico pode inibir a síntese de AG pela AGS (Zeng *et al.*, 2008), que os AG inibem a via da Akt (Murray *et al.*, 2015), que a ação antileucêmica do AP foi demonstrada neste (Figura 48) e em outros trabalhos (Pizer *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 2015), e o fato deste composto ser majoritário nas frações apolares do

EFXs, sugere-se que tais mecanismos, podem estar contribuindo para a redução da proliferação celular e indução de apoptose pelas frações FDCM e FHEX de *X. sagittifolium*, envolvendo o aumento da expressão de p21.

Várias proteínas citoplasmáticas são fundamentais para a regulação da apoptose, particularmente as proteínas membros da família Bcl-2, em que o subgrupo pró-apoptótico, incluindo a Bax, Bak e Bad, promove a morte celular; enquanto o subgrupo anti-apoptótico, incluindo Bcl-2 e Bcl-xL, inibe a apoptose (Hsu et al., 2011). Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose sequestrando caspases ou impedindo a liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais. Por outro lado, as proteínas Bad, Bax e Bak inibem a ação da Bcl-2, promovendo a apoptose. A proteína Bax atua na via intrínseca de morte celular por apoptose, onde proteínas mitocondriais, tais como citocromo C, se ligam com a proteína Apaf-1 e a procaspase 9 para formar o apoptossomo, que por sua vez é responsável pela ativação da procaspase 9 em caspase 9, iniciando a cascata de ativação de caspases apoptóticas (Hsu et al., 2011). Esta atividade ativadora de Bax pode inibir a via da AKT e causar disfunções mitocondriais levando à apoptose (Liu *et al.*, 2015). Foi demonstrado também que AG saturados de cadeia longa reduzem a proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) e aumentam a proteína Bax (pró-apoptótica), corroborando a função dos AG na indução de apoptose pela via de ativação intrínseca ou mitocondrial (Mu *et al.*, 2001).

Embora vários medicamentos derivados de produtos naturais induzam apoptose através da ativação pela via mitocondrial, aumentando a proporção Bax/Bcl-2 (Ferreira e Rocha, 2010), neste trabalho, o tratamento com a FDCM (n=3) reduziu os níveis de mRNA da proteína Bax, enquanto os resultados com as outras amostras ainda estão indefinidos, devido aos altos desvios padrões encontrados e só termos conseguido realizar dois experimentos com tais amostras. Interessante destacar que a regulação negativa de Bax em células tumorais também tem sido demonstrada com o AP (Pereira *et al.*, 2014), evidenciando controvérsia em relação à ação antitumoral deste ácido graxo. Estes resultados sugerem uma via de ativação da apoptose diferente da via mitocondrial pela FDCM.

Alguns estudos demonstram que os níveis da AGS na célula refletem os níveis de ácido graxo endógeno, e que a inibição desta síntese pode inibir o crescimento de células neoplásicas, mesmo quando quantidades de AGs exógenos estão disponíveis (Pompéia, 2000). Células de câncer, em especial de mama, próstata, cólon, endométrio, ovário e tireoide expressam níveis muito elevados de AGS, o que está sob o controle da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da sinalização pela via da PI3K-Akt. Sugere-se que as células tumorais dependem da síntese de AG e que este processo desempenhe um papel central no processo de tumorigênese e progressão do tumor, ao conferir vantagem proliferativa, enquanto as células normais atendem à essa exigência pela ingestão dietética de

AG. Estes resultados suportam a hipótese de que o aumento da síntese de AG pode promover a tumorigênese (Zeng et al., 2008).

Tendo em vista o fato de que malignidades hematológicas são consideradas umas das mais complicadas para o manejo clínico e que a expressão da AGS é notavelmente alta nessas células, um estudo foi realizado para investigar se o orlistat, um inibidor de AGS, também poderia inibir a sobrevivência de células leucêmicas de origem linfocítica (Kant *et al.*, 2012). Cerulenina, outro potente inibidor específico não-competitivo da AGS, administrado a linhagens de células tumorais humanas *in vitro*, inibiu significativamente o crescimento destas células. As células SKBR3, em que a AGS constitui mais de 20% da proteína citosólica, são extremamente sensíveis à inibição da AGS, parecendo depender da síntese endógena de AG para sua sobrevivência/proliferação. Em contraste, células com nível mínimo de síntese de ácido graxo, semelhante a tecidos normais *in vivo*, são relativamente insensíveis à inibição da AGS. Estes dados sugerem que a síntese dos AG é requerida para o crescimento de alguns tumores (Kuhajda et al., 1994). Desta forma, a via de síntese dos AG pode proporcionar uma série de alvos moleculares para novos medicamentos, incluindo a AGS, bem como outras enzimas da biossíntese de AG, distintos dos alvos de agentes terapêuticos convencionais, tais como o DNA, podendo ser eficazes contra células tumorais resistentes a estes medicamentos.

Dada a expressão generalizada da AGS em muitos tipos de cânceres humanos, combinações de quimioterápicos convencionais com agentes possuindo novos alvos, como a via metabólica destinada à biossíntese de ácido graxo, podem proporcionar maior eficácia na terapia do câncer (Pizer *et al.*, 1996). É importante destacar que o ácido palmítico é capaz de inibir a AGS (Zeng *et al.*, 2008), e inibidores da AGS, como Cerilenina e Orlistat, também mostram indução da proteína p21 em células de melanoma (Rossato *et al.*, 2014). No entanto, o estudo da ação de ácidos graxos no tratamento de tumores ainda é controverso. Os resultados obtidos deste trabalho sugerem que o ácido palmítico e as frações de *X. sagittifolium* possam estar inibindo a síntese endógena de AG, mecanismo essencial para a sobrevivência e proliferação da célula tumoral.

Além do metabolismo exacerbado de AG no câncer conferir vantagem energética para o desenvolvimento do tumor, os AG também podem induzir ação antitumoral regulando outras funções na célula como a acilação de proteínas, alterando a transdução de sinal e regulação da expressão gênica (Zeng *et al.*, 2008). A acilação de proteínas, por exemplo, pode ocorrer através de ligação da proteína com o ácido mirístico (miristoilação) ou com o ácido palmítico (palmitoilação). A palmitoilação e despalmitoilação são processos reversíveis, catalisados enzimaticamente, relacionados ao ancoramento de proteínas na membrana e alteração de sua atividade, entre outras funções (Devlin, 2013).

Segundo Hattum e Waldman (2014), as proteínas Ras são componentes essenciais de diversas cascatas de sinalização (RAF / MEK / ERK e PI3K / PDK1 / AKT/N-Ras /H-Ras) e regulam múltiplas vias de transdução de sinais. O aparecimento/ativação de mutações nos oncogenes *RAS* contribui para o desenvolvimento de cerca de 30% dos tumores malignos humanos. As proteínas Ras existem em duas conformações na célula, uma forma ativa, ligada a GTP e ancorada na membrana plasmática, pelo processo de palmitoilação, e uma forma inativa, ligada a GDP, encontrada solúvel no citosol, após sofrer despalmitoilação (Downward, 1998). Muitos aspectos mecanicistas das vias das proteínas Ras fazem conexão com a modulação do processo de palmitoilação destas proteínas, envolvidas na sinalização do ciclo celular e apoptose. A inibição da palmitoilação de Ras, por exemplo, prejudicaria seu ancoramento na membrana, e conseqüentemente, a sinalização para a proliferação do tumor. Metilformina, por exemplo, mimetiza a inibição da palmitoilação de proteínas (Galluzzi *et al.*, 2012). No entanto, a complexa relação entre Ras e apoptose começou a ser esclarecida pela observação de que Ras pode regular múltiplas vias efetoras, tendo efeitos antiapoptóticos, com ativação da PI3-quinase e PKB/Akt e, em algumas circunstâncias efeitos pró-apoptóticos, através da ativação de RAF e MAP quinase. No entanto, existem grandes diferenças quanto aos efeitos da Ras na apoptose, dependendo do tipo de célula, não podendo simplesmente ser explicado pelo uso diferencial dessas duas vias. Outro efeito importante do processo de palmitoilação de proteínas é a indução de p21 e Bax, e fosforilação e estabilização da p53, resultando em indução de apoptose, em resposta a algum estresse genotóxico. Em alguns tipos de células, os AG saturados regulam a expressão de p21 e Bax mesmo na ausência de estresse genotóxico (Zeng *et al.*, 2008).

Qualquer protocolo experimental destinado à busca de novos medicamentos deve incluir um completo estudo dos aspectos toxicológicos da substância em estudo. Estudos *in vitro* com células não tumorais constituem ensaios toxicológicos preliminares na busca de novos agentes antineoplásicos. Neste trabalho, nem o EFXs nem as amostras apolares mostraram efeito citotóxico sobre fibroblastos murinos NIH-3T3 não tumorais, o que representa um bom resultado desde que a ausência de toxicidade constitui um requisito fundamental para uma substância com promissora ação antineoplásica.

Ao longo deste trabalho demonstrou-se que o EFXs e sua frações apolares (FDCM e FHEX) foram as amostras mais ativas quanto à citotoxicidade sobre células leucêmicas, que linhagens celulares de tumores sólidos não foram sensíveis a estas amostras e que tais amostras inibem o ciclo celular e induzem apoptose de células leucêmicas. Também demonstramos que o ácido palmítico e o palmitato de etila foram as substâncias majoritárias nas frações apolares e que tanto o EFXs, as frações apolares, como o composto majoritário

ácido palmítico, foram capazes de aumentar a expressão da proteína p21, um inibidor do ciclo celular.

Embora os mecanismos envolvidos nos efeitos observados pelo EFXs e frações apolares ainda precisem ser investigados, não podemos deixar de chamar atenção para as possibilidades de inibição da AGS, regulação da palmitoilação/despalmitoilação de proteínas, regulação da expressão gênica e alteração nos níveis de ciclina A. Estes resultados sugerem que a presença do AP nas amostras de *X. sagittifolium* esteja contribuindo para a citotoxicidade, inibição da proliferação e indução de apoptose de células leucêmicas por essas amostras, tendo como um dos mecanismos de ação o aumento da expressão de p21.

4.6 Conclusões

- O extrato bruto das folhas de *X. sagittifolium* (EFXs) apresentou citotoxicidade sobre células leucêmicas, o que não ocorreu com o extrato de rizoma.
- As frações apolares foram as mais ativas quanto à atividade citotóxica sobre células Jurkat.
- Nem o EFXs nem as suas frações apolares exerceram ação tóxica sobre linhagens celulares de tumores sólidos.
- O ácido palmítico, um dos compostos majoritários em ambas as frações apolares, também apresentou citotoxicidade sobre células Jurkat, indicando que, muito provavelmente, contribui para a atividade antileucêmica das frações apolares.
- A ação antileucêmica *in vitro* do EFXs e das frações apolares foi demonstrada pela redução na proliferação celular e indução de morte celular por apoptose, muito provavelmente mediados pela expressão de aumentada de p21, um inibidor do ciclo celular.
- As frações e o extrato bruto não apresentaram atividade citotóxica em células não tumorais.

5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE *Xanthosoma sagittifolium* (L.)SCHOTT.

5.1 Introdução

As plantas produzem um grande número de substâncias naturais com diferentes potenciais biológicos, incluindo o efeito antimicrobiano, na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Evidências científicas indicam que plantas usadas pela população modulam a resposta imunológica (Carlos *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2014), sendo os metabólitos secundários das mesmas os responsáveis pelos efeitos benéficos sobre o sistema imune dos animais (Hashemi e Davoodi, 2014). O inhame, (*Colocasia esculenta*), por exemplo, planta da família Araceae, possui atividade imunomoduladora e, atualmente, é considerada um alimento funcional (Brown *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2013). Diante disso, despertou-se o interesse pelo potencial imunomodulador de *Xanthosoma sagittifolium*, espécie também pertencente à família Araceae.

5.1.1 Imunidade inata e adaptativa

A imunomodulação pode ser definida como alterações na estimulação e/ou supressão das células envolvidas na resposta imune celular, humoral ou inespecífica (inata). Uma variedade de células e mediadores imunológicos está envolvida na regulação do sistema imune (Becker *et al.*, 2013). Além disso, a resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa/adquirida. A imunidade inata é aquela formada por elementos presentes no indivíduo desde o nascimento e incluem componentes da superfície do corpo e componentes internos: Pele, membranas mucosas, reflexos de tosse, interferons, proteínas séricas, enzima lisozima, e células fagocíticas, como granulócitos e macrófagos. Já a imunidade adquirida é mais especializada e se desenvolve após contato com o antígeno (Ag), além de ser específica para aquele Ag.

Entre os principais tipos celulares envolvidos na imunidade adquirida estão as células T, que maturam no timo, e as células B, que passam por maturação na medula óssea. Estas células diferem-se em vários aspectos funcionais, mas compartilham uma das mais importantes propriedades da resposta imune, a especificidade em relação a um antígeno. O sistema imunológico é capaz de reconhecer as diferenças químicas sutis que caracterizam um

Ag ou patógeno e, além disso, é capaz de discriminar entre moléculas externas, células e proteínas do próprio corpo (Kuby, 2012). Devido às suas importantes características de memória, especificidade e reconhecimento do não próprio, o sistema imunitário adaptativo é mais rápido e eficaz na defesa do organismo (Roitt *et al.*, 2013).

A resposta imune adaptativa pode ser dividida em duas etapas relacionadas: o reconhecimento do antígeno (Ag) ou patógeno, e a resposta específica. O contato inicial com o Ag (imunização) dá origem a uma cadeia de eventos que leva à ativação de linfócitos e à síntese de proteínas (anticorpos (Ac), citocinas, etc.), algumas das quais (Ac) exibem reatividade específica contra esses Ags (Benjamini *et al.*, 2002; Vasquez *et al.*, 2015). As células T *naive* produzem várias citocinas após ativação, enquanto a produção de citocinas por células B ativadas depende do grau de ativação e de diferenciação. Interleucinas (IL) como IL-7, IL-4, IL-6, IL-10 e interferons (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) são citocinas que desempenham um papel importante no desenvolvimento, sobrevivência, diferenciação e/ou proliferação de células B. Certas quimiocinas também desempenham papéis importantes na função das células B, ou seja, na produção de anticorpos (Vasquez *et al.*, 2015).

Mais de 70% dos linfócitos circulantes são da linhagem T, caracterizados pela expressão do marcador de membrana CD3. As células T reguladoras (Tregs), anteriormente conhecidas como células T supressoras, representam uma subpopulação de células T que modulam o sistema imunológico. Linfócitos Tregs atuam na regulação e modulação de uma série de eventos imunomoduladores (Niaragh *et al.*, 2013). Outras subpopulações de linfócitos T podem ser do tipo T CD8, que expressam o marcador CD8, e T CD4, que expressam o marcador CD4. Os linfócitos T reconhecem os Ags pelos seus receptores específicos TCR (T cell receptor), apresentados por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na membrana de outras células. O contato com um Ag específico, apresentado pelo MHC classe I ao linfócito T CD8 provoca a fase final do desenvolvimento e diferenciação em células T CD8 citotóxicas, capazes de matar diretamente células alvo contendo tais antígenos, como células cancerosas (Campbell *et al.*, 2010). As células T CD4 reconhecem o Ag quando este é apresentado por moléculas do MHC classe II na membrana de células apresentadoras de Ag (células dendríticas, macrófagos e células B). A interação entre as duas células desencadeia a liberação de citocinas em ambas as células. Citocinas liberadas por células apresentadoras de antígeno estimulam células T auxiliares (CD4+) a produzirem seu próprio conjunto de citocinas e assim serem ativadas (Campbell *et al.*, 2010). As células T CD4 tornam-se células T auxiliares (helper), podendo se diferenciar em Th1, Th2 ou Th17, dependendo do perfil de citocinas no microambiente. Estas células se diferenciam quanto às citocinas que produzem e funções que exercem. Os linfócitos Th1 são caracterizados pela produção de interferon-gama, que ativam macrófagos, e são importantes para respostas

imunoinflamatórias crônicas. Os linfócitos Th2 caracterizam-se pela produção de IL-4 e IL-13, sendo importantes para respostas contra helmintos e resposta humoral. Os linfócitos Th-17 são caracterizados pela produção de IL-17 e IL-22, estas células são importantes para a resposta imune de mucosas a bactérias e fungos (Pardoll, 2012).

Linfócitos Tregs protegem o hospedeiro de doenças autoimunes através da supressão de células auto-reativas, no entanto, Tregs também bloqueiam as respostas imunes antitumorais. Há vários estudos em relação à imunobiologia de Tregs em tumores sólidos mostrando os efeitos deletérios destas células na imunopatogênese de tumores. A maioria dos resultados mostra a relevância do aumento da frequência de Tregs com a progressão do câncer em diferentes tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, o câncer de mama, o câncer de ovário, câncer gástrico, câncer de fígado, e melanoma. Contrariamente, poucas investigações têm sido realizadas em Tregs em malignidades hematológicas (Niaragh *et al.*, 2013). Além destes linfócitos, ainda existem outros tipos como as células NK, NKT e os linfócitos γ -delta (Abbas, 2012), os quais também apresentam marcadores celulares específicos. A Tabela 7 mostra as características gerais e funções de alguns tipos de linfócitos.

Por outro lado, os macrófagos são as primeiras células que participam da resposta imunológica e podem ser ativados por uma variedade de estímulos. Eles participam tanto da resposta imune inata (inespecífica) quanto representam reguladores centrais da resposta imune adquirida (específica), fagocitando, processando e apresentando Ags aos linfócitos T, através de moléculas de superfície específicas do MHC, pois, ao contrário das células B, as células T não são ativadas por antígenos solúveis (Rao *et al.*, 2007).

Os macrófagos também são capazes de lisar células tumorais através da produção de metabólitos tóxicos e enzimas proteolíticas, sendo importantes no processo de vigilância imunológica (Cotran *et al.*, 2012). São descritas três subpopulações de macrófagos: macrófagos ativados, de reparo tecidual e macrófagos reguladores. Os primeiros seriam os macrófagos clássicos, com atividade microbicida e tumoricida, os quais secretam grandes quantidades de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, quando ativados, apresentam antígenos aos linfócitos e estão envolvidos com a resposta imune celular. O segundo tipo, ativado por IL-4, estaria basicamente envolvido no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular. O terceiro tipo exerceria atividade reguladora mediante liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Cruvinel *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

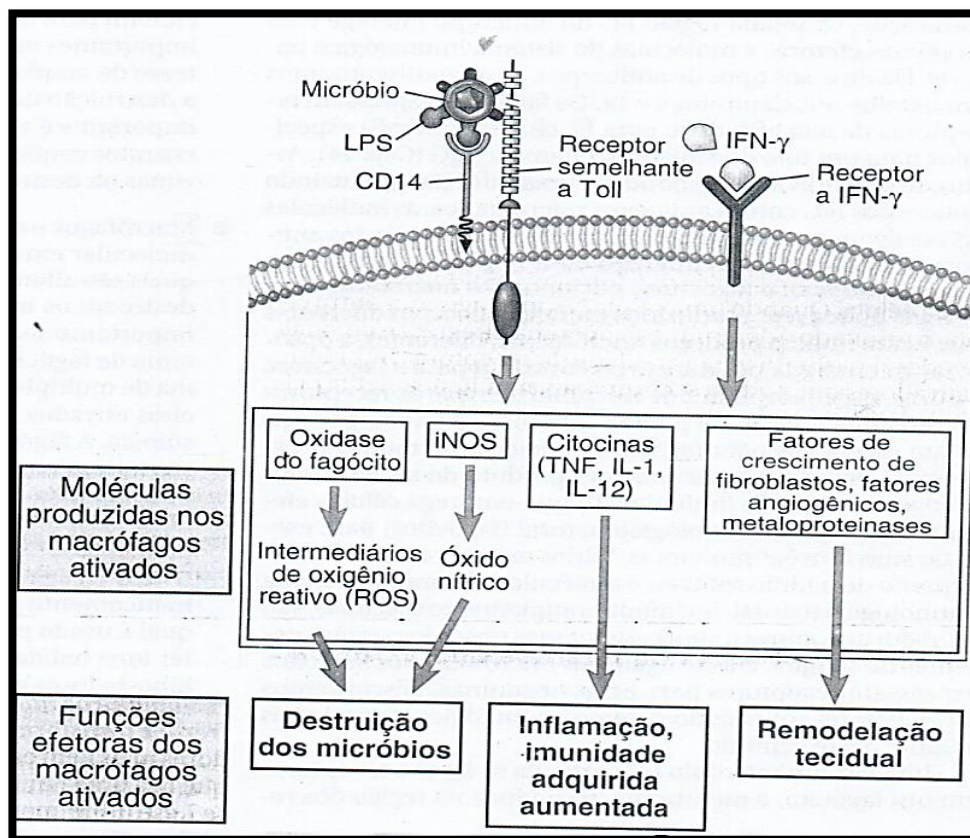
Tabela 7- Populações e subpopulações de linfócitos e suas características

Classe	Funções	Receptor a antígeno e especificidade	Marcadores selecionados
Linfócitos T $\alpha\beta$			
Linfócitos T auxiliares CD4 ⁺	Diferenciação das células B (imunidade humoral) Ativação de macrófagos (imunidade celular)	Heterodímeros $\alpha\beta$ Diversas especificidades para complexos peptídeo-MHC classe II	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻
Linfócitos T citotóxicos CD8 ⁺	Destruição de células infectadas com micróbios, destruição de células tumorais	Heterodímeros $\alpha\beta$ Diversas especificidades para complexos peptídeo-MHC classe I	CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺
Células T reguladoras	Suprimir a função de outras células T (regulação de respostas imunes, manutenção da autotolerância)	Heterodímeros $\alpha\beta$	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ (Mais comuns, mas também outros fenótipos)
Linfócitos T $\gamma\delta$	Funções auxiliares e citotóxicas (imunidade natural)	Heterodímeros $\gamma\delta$ Especificidades limitadas para todos os tipos de moléculas	CD3 ⁺ , CD4 e CD8 variável
Linfócitos B	Produção de anticorpos (imunidade humoral)	Anticorpo de superfície Diversas especificidades para todos os tipos de moléculas	Receptores a Fc; MHC classe II; CD19; CD21
Células <i>natural killer</i>	Destruição de células infectadas por vírus ou danificadas (imunidade natural)	Vários receptores ativadores e inibidores Especificidades limitadas para MHC ou moléculas semelhantes a MHC	CD16 (Receptor a Fc para IgG)
Células NKT	Suprimir ou ativar respostas imunes naturais e adquiridas	Heterodímeros $\gamma\delta$ (Especificidade limitada para complexos glicolipídeo-CD1)	CD16 (Receptor a Fc para Ig); CD3

Legenda: adaptado de Abbas e colaboradores, 2012

A Figura 53 mostra alguns mecanismos de ativação de macrófagos, as moléculas produzidas por tal ativação, e suas funções. Quando o CD14, na membrana do macrófago, reconhece o LPS do patógeno, muitas vias de sinalização são ativadas. O óxido nítrico (NO) é produzido a partir de L-arginina, numa reação catalisada por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). As três principais isoformas são NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), as quais são constitutivas, e a induzível (iNOS), secretada por macrófagos. O LPS ativa no macrófago a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e oxidases a secretarem o óxido nítrico (NO) e espécies ativas do oxigênio (ROS), respectivamente, com função microbicida. Já quando o macrófago é ativado pelo IFN- γ , o macrófago libera citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-12, mediando a resposta imune celular, envolvida no desenvolvimento da resposta inflamatória crônica, pois a IL-12 estimula o linfócito Th1 a liberar mais IFN- γ , tornando uma ativação cíclica entre linfócito Th1 e macrófago. O IFN- γ também estimula o macrófago a secretar fatores de crescimento, fatores angiogênicos e metaloproteinasas, envolvidos no remodelamento tecidual (Cruvinel *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

Figura 53- Mecanismos de ativação de macrófagos



Fonte: Adaptado de Abbas e colaboradores, 2012.

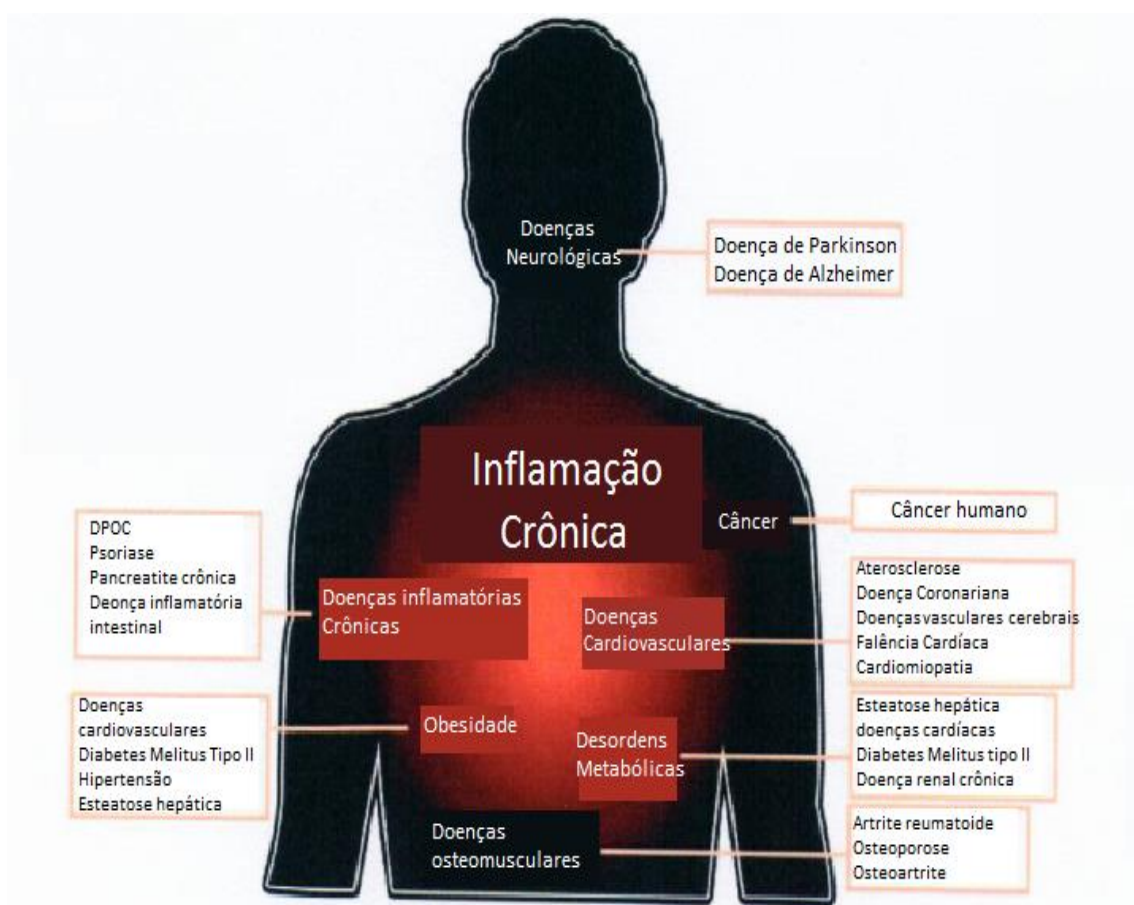
5.1.2 Inflamação e inflamação crônica

A inflamação é uma resposta normal do hospedeiro que ocorre em resposta à uma lesão tecidual, infecção ou irritação química. Os sintomas clássicos associados a respostas inflamatória incluem o calor, vermelhidão, inchaço, dor e perda de função. A resposta inflamatória ocorre em três fases distintas: (1) uma fase transitória aguda, que se caracteriza pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; (2) uma fase subaguda tardia, caracterizada pela infiltração dos leucócitos e células fagocíticas; (3) uma fase proliferativa crônica, em que ocorrem degeneração tecidual e fibrose e (4) fase de remodelação tecidual. Participam na resposta inflamatória componentes tanto da resposta imune inata como da adaptativa (Pan *et al.*, 2010), envolvendo interações entre diferentes tipos de células. Após a injúria, a inflamação é iniciada no local por migração de células do sistema imune através dos vasos sanguíneos e liberação de mediadores, resultando no recrutamento de mais células inflamatórias e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e citocinas pró-inflamatórias, com o objetivo de neutralizar a injúria ou o agente agressor.

Normalmente, a inflamação é transitória, mas sob algumas circunstâncias, a resposta aguda pode se tornar crônica (Fritsche, 2015), com a ativação de células do sistema imunológico adaptativo, incluindo os linfócitos T e/ou B, que amplificam a resposta inflamatória inicial (Li *et al.*, 2013). Como dito anteriormente, as células T helper do tipo 1 (células auxiliares Th1) ativam macrófagos tanto através de contato célula-célula quanto pela secreção de IFN- γ , tornando a resposta crônica. As células Th2 ativam eosinófilos, através da liberação de citocinas, e ativam também células B, as quais secretam anticorpos que podem ativar a cascata do sistema complemento, bem como fagócitos, células NK e mastócitos - através da interação dos anticorpos com os receptores FC (Goodman, 2005; Shalpour e Kim, 2015). Portanto, a inflamação crônica desenvolve-se a partir de ativação contínua de células do sistema mononuclear (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) e é bastante prejudicial ao organismo, podendo levar a doenças cardiovasculares, neurológicas, pulmonares, autoimunes, diabetes, artrite, Alzheimer e câncer, como exemplificado na Figura 54 (Pan *et al.*, 2010).

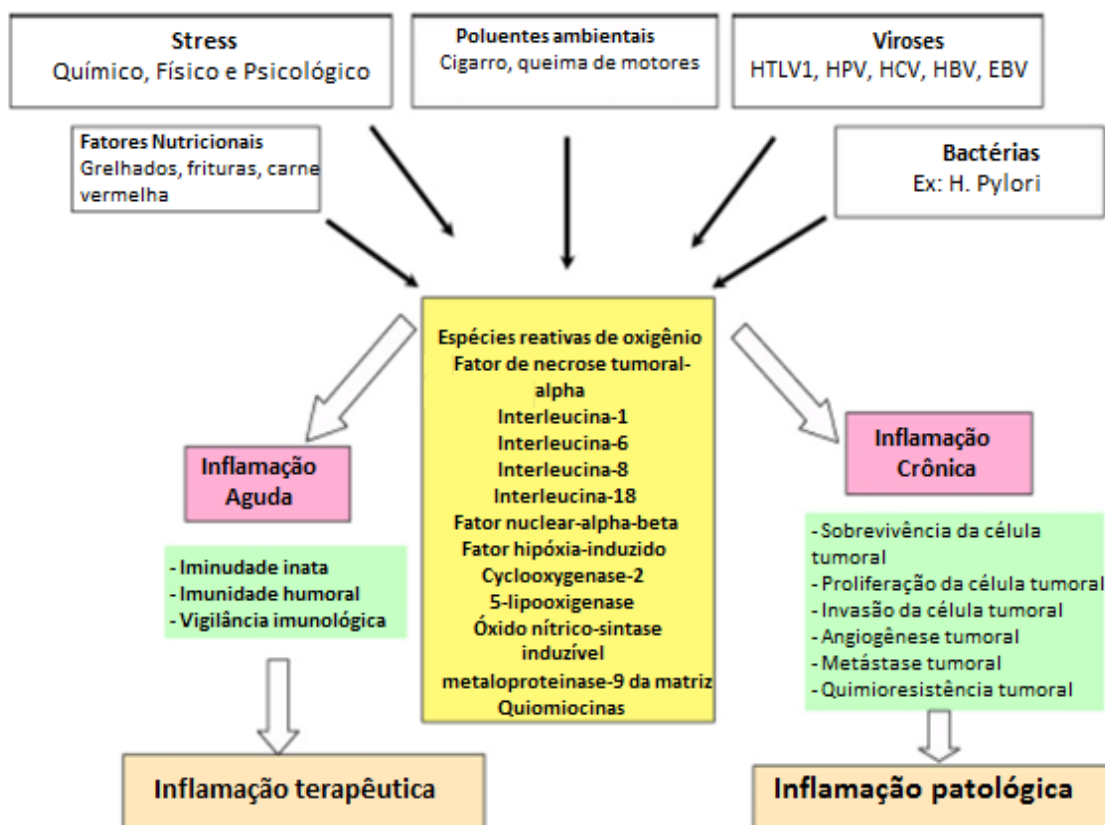
Acredita-se que o câncer se desenvolva a partir de processos inflamatórios crônicos mediados pelas células inflamatórias e imunológicas responsáveis pela produção diversificada de citocinas pró-inflamatórias, ERO, RNS e enzimas no local da lesão ou região inflamada. Juntos esses efeitos estabelecem um microambiente inflamatório favorável ao crescimento do tumor (Lu *et al.*, 2006), induzindo alterações genéticas, que aumentam a incidência de transformação celular maligna e proliferação das células tumorais já iniciadas. A inflamação crônica tem sido associada a várias etapas da tumorigênese, incluindo transformação celular, promoção do tumor, sobrevivência da célula tumoral, proliferação e angiogênese, facilitando o crescimento e a invasão do tumor, assim como o desenvolvimento de metástases (Grivennikov *et al.*, 2010). Aproximadamente 15-20% de todos os tipos de câncer são iniciados ou exacerbados pela inflamação crônica (Figura 55).

Figura 54- Doenças cujos desenvolvimentos estão relacionados à inflamação crônica.



Fonte: Adaptado de Pan e colaboradores, 2010.

Figura 55- Diferentes faces da inflamação e seu envolvimento na tumorigênese



Fonte: Adaptado de Aggarwal, 2006.

A inflamação crônica promove e potencializa o desenvolvimento, o crescimento e a progressão tumoral, as frutas e hortaliças têm sido apresentadas como principais fontes de compostos bioativos, e muitos dos extratos destas plantas são atualmente utilizados em terapia e prevenção do câncer (Saed *et al.*, 2015). Assim, uma investigação dos potenciais efeitos das amostras ativas de *X. sagittifolium* sobre a resposta imunoinflamatória, pode despertar o interesse para novas alternativas preventivas ou terapêuticas contra o câncer, de origem vegetal, com mecanismos de ação direcionados à imunoregulação. Como no capítulo anterior observou-se que o extrato de folhas de *Xanthosoma sagittifolium* e suas frações apolares de taioba apresentaram efeito antileucêmico, resolveu-se investigar o efeito de tais amostras sobre algumas características e funções de células relacionadas ao sistema imune.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico de *Xanthosoma sagittifolium* (EFXs) e suas frações na produção *in vitro* de NO por linhagem celular macrofágica.
- Determinar o IC50 das frações mais ativas quanto à inibição da produção de NO.
- Avaliar os efeitos *in vitro* do EFXs e das frações mais ativas sobre a produção *in vitro* de TNF- α , IL-1 e IL-10 por linhagem celular macrofágica.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do EFXs e das frações mais ativas sobre linfócitos.
- Avaliar os efeitos *in vitro* do EFXs sobre diferentes subpopulações de linfócitos.
- Investigar os efeitos dos componentes majoritários das amostras mais ativas na produção *in vitro* de NO.

5.3 Material e métodos

5.3.1 Linhagem celular

A produção *in vitro* de NO foi realizada com a linhagem celular macrofágica murina RAW 264.7, adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro, RJ. As células são mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (UERJ). Após descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com 5 mL de meio DMEM (Sigma Chemicals, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®). A viabilidade celular foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase ou por exclusão do corante azul de tripano, em câmara de Neubauer, e os repiques foram realizados duas vezes por semana. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO₂.

5.3.2 Animais

Camundongos *Swiss webster* (SW) fêmeas, com peso entre 30 e 35 g, foram utilizados para estudos de citotoxicidade das amostras e para análise de subpopulações de linfócitos. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ, em ciclos de 12 h de luz e 12 h de escuro, com água e alimentação livre. Os protocolos utilizados com os animais foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética do Centro Biomédico do IBRAG-UERJ (protocolo CEUA/007/2013).

5.3.3 Produção *in vitro* de NO por células RAW 264.7

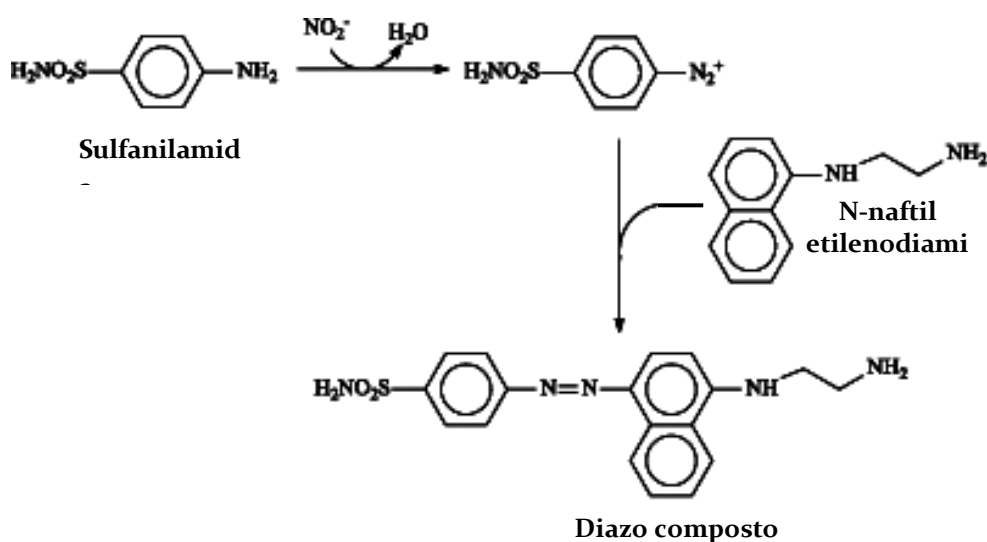
A produção *in vitro* de NO foi avaliada após 24 h de incubação das células RAW 264.7 (5×10^5 /mL, volume final de 100 µL) estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, Sigma Chemicals, EUA) de *E. coli* (1 µg/mL) e tratadas com as amostras vegetais nas concentrações finais de 10, 30, 50, 70 e 100 µg/mL. A cultura controle foi preparada apenas com meio de cultura e LPS. Não foram adicionadas células nos ensaios de branco das amostras.

A dosagem de NO foi determinada no sobrenadante, após o tempo de incubação, de forma indireta, através da dosagem de nitrito, um produto estável do NO em solução, pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Após a incubação da cultura por 24 h de cultura, foram transferidos 50 µL de sobrenadante de cada poço para outra placa de 96 poços, sendo adicionados 25 µL de ácido sulfanílico 1% diluído em H₃PO₄ 5%. A placa foi mantida ao

abrigo de luz por 10 min e então foram adicionados 25 μL de solução aquosa de ácido N-naftil etilenodiamina 0,1% (Sigma Chemicals, EUA). A reação transcorreu por 10 min e as absorvâncias foram lidas em 550 nm.

Na reação de Griess, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O composto formado reage com o N-naftil etilenodiamina e gera um composto de coloração vermelha, como representado na Figura 56.

Figura 56- Representação química da reação de Griess



Fonte: Adaptado de Ramos *et al.*, 2006

Para o cálculo da concentração de nitrito no sobrenadante, foi construída uma curva padrão nas mesmas condições citadas, utilizando diferentes concentrações de nitrito de sódio (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μM). Os resultados foram expressos em concentração micromolar de nitrito.

5.3.4 Isolamento de esplenócitos

Após anestesia e eutanásia do animal, o baço foi retirado assepticamente, em câmara de fluxo laminar, e macerado em 5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma Chemicals, EUA) diluído em PBS (tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4, contendo 0,9% NaCl). As células foram isoladas por dissociação mecânica manual, utilizando-se um bastão e uma cesta de tela de aço inoxidável, de acordo com Pinto e colaboradores (2007). Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução hipotônica ACK (145 mM cloreto de amônio, 10 mM bicarbonato de potássio e 2 mM ácido etilenodiaminotetracético), para rompimento das hemácias. Após homogeneização, o material foi centrifugado por 3 min a 400 x g, a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado duas vezes sucessivas com meio RPMI contendo 2 mM EDTA. Após

centrifugação, as células foram suspensas em meio RPMI 1640 contendo 5% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina e 0,05 mM 2-mercaptoetanol e as células viáveis contadas, utilizando-se o corante azul de tripano 0,4%.

5.3.5 Cultura de macrófagos RAW 264.7 e linfócitos para ensaio de citotoxicidade

Para verificar se a inibição da produção de óxido nítrico pelas amostras não tinha relação com a indução de morte das células RAW 264.7, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (5×10^5 /mL, volume final de 100 μ L). Após 24 h a 37°C e 5% de CO₂, para adesão das células à placa, as amostras vegetais foram adicionadas ou não para as devidas concentrações e a placa foi incubada por mais 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Ao término da cultura as células foram avaliadas quanto à citotoxicidade das amostras pelo ensaio do MTT. Também foram realizados ensaios de citotoxicidade das amostras de *X. sagittifolium* sobre as células do baço (2×10^6 /mL), após cultivo por 72 h com o mitógeno Concanavalina A (Sigma Chemicals, EUA).

5.3.6 Ensaio de citotoxicidade

Este ensaio foi realizado através do método do MTT (Sigma Chemicals, EUA), que se baseia na redução do sal de tetrazólio MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo), amarelo, em formazan, cristal azul, por desidrogenases mitocondriais de células vivas (Mossman, 1983). Para a realização deste ensaio, foram adicionados 10 μ L/poço de MTT (5 mg/mL em PBS) e após 3 h a 37°C e 5% de CO₂, adicionou-se 100 μ L de SDS 10% contendo HCl 0,01N, para solubilizar os cristais de formazan. Após incubação *overnight* a 37°C, realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle (sem amostras), considerado como 100% de viabilidade celular.

5.3.7 Análise de subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo

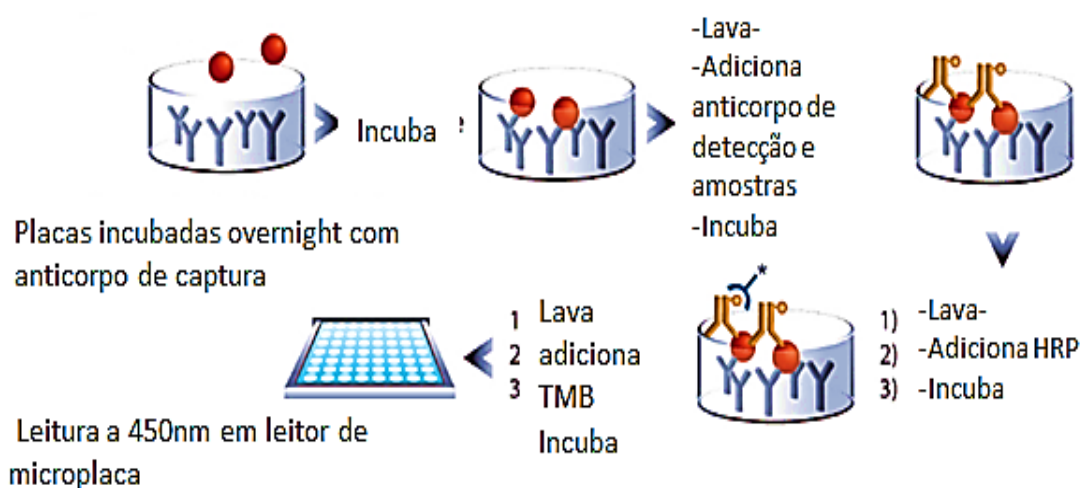
As culturas de linfócitos (2×10^6 /mL) estimulados com Con A ($10 \mu\text{g/mL}$) e tratadas ou não com o extrato hidroetanólico de *X. sagittifolium* ($50 \mu\text{g/mL}$) por 72 h foram realizadas em garrafa média de cultura (75 cm^2), com volume final de 8 mL. Após a incubação, as células foram contadas e posteriormente marcadas com anticorpos (Ac) específicos fluorescentes, em gelo e no escuro. Foram realizadas três marcações duplas (CD4 x CD69; CD8 x CD69; CD19 x CD69). O marcador de superfície CD19 é encontrado em linfócitos B e determina o total desta população celular. O CD4 é uma proteína expressa em linfócitos T do tipo auxiliar (T helper-Th) e linfócitos T reguladores (Treg), enquanto o CD8 é expresso em linfócitos T citotóxicos. A proteína de membrana CD69 é um marcador de ativação inicial expresso em vários tipos de leucócito (Sancho *et al.*, 2005). Para cada marcação dupla 1×10^6 células foram lavadas com meio RPMI 1640 diluído 1:1 com PBS, contendo 5% de SFB (meio diluído) e incubadas simultaneamente durante 30 min com os dois Acs. Os anticorpos anti-CD4 (BD Pharmigen, EUA) e anti-CD8 anti-murinos (BD Pharmigen) encontram-se marcados com o fluorocromo Cychrome (fluorescência lida pelo canal FL-4), enquanto o Acanti-CD69 anti-murino (BD Pharmigen) encontra-se marcado com a ficoeritrina (PE), com fluorescência lida no canal FL-2, e o anti-CD19 (BD Pharmigen) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), cuja fluorescência é lida no canal FL1. Também foram realizadas marcações simples para calibração das diferentes fluorescências nos seus respectivos canais de detecção. As marcações foram realizadas em um volume final de $50 \mu\text{L}$, com $1 \mu\text{L}$ de cada anticorpo. Após incubação com os anticorpos, as células foram lavadas com meio diluído duas vezes com PBS, centrifugadas ($1000 \times \text{g}$, 3 min, 8°C) e suspensas em $400 \mu\text{L}$ de PBS. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo Gallios (Beckman), utilizando-se o procedimento de compensação para evitar sobreposição de fluorescências. Cem mil eventos foram capturados por amostra. As células marcadas com os anticorpos foram analisadas utilizando-se o software Summit versão v4.3 e expressas em percentuais relativos ao grupo controle (incubado sem amostra vegetal).

5.3.8 Quantificação dos níveis de citocinas por ensaio imunoenzimático

A determinação dos níveis de citocinas (TNF- α , IL1- β e IL-10) nos sobrenadantes de cultura de macrófagos RAW 264.7 foi realizada pela técnica de ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA), conforme esquematizado na Figura 57. A quantificação foi realizada nos sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não por LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) e tratados ou não com o EFXs ou frações por 24 h. Os ensaios foram

realizados usando kits específicos para camundongos de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, California, USA). Em uma placa de 96 poços cada poço foi sensibilizado com 2 µg do anticorpo de captura diluído em 100 µL de tampão do fabricante. As placas foram, em seguida, incubadas overnight a 4°C. Após esta etapa, o excesso de antígeno foi lavado com solução de lavagem fornecida pelo fabricante. Foram adicionados 150 µL/poço de solução para bloqueio de sítios inespecíficos, seguida de incubação por 60 min a 37°C. O excesso de solução de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas (100 µL/poço). Os sobrenadantes de cultura foram distribuídos na placa em duplicata. Em seguida, foi realizada uma incubação por 45 min a 37°C e retirado o excesso do sobrenadante de cultura por uma série de cinco lavagens. O anticorpo de detecção adicionado à biotina foi diluído e 100 µL desta diluição foram acrescentados a cada poço. Após nova incubação por 45 min a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. Foi então adicionado 100 µL da enzima avidina (HRP) que foi incubada 30 min a temperatura ambiente. A solução do substrato foi então preparada e 100 µL foram acrescentados a cada poço. O cromógeno utilizado foi o tetrametilbenzidina (TMB). A reação ocorreu por 10 min em temperatura ambiente e no escuro, quando então foi interrompida pela adição de 25 µL/poço de uma solução de parada da reação (4 N H₂SO₄). Em todas as etapas, após cada lavagem, as placas foram secas por inversão sobre papel absorvente. As reações tiveram a absorvância lidas em leitor de microplacas (BioRad modelo 550, Brasil) entre os comprimentos de onda 450 nm e 570 nm. A quantificação das citocinas foi baseada na diferença dos valores de absorvância sobre a curva de concentração das respectivas citocinas padrão fornecidas pelo kit.

Figura 57- Figura esquemática do imunoensaio enzimático



Fonte: Adaptado de <http://www.enzolifesciences.com>, 2016.

5.3.9 Análise estatística

A análise de variância foi analisada pelo teste One-way ANOVA e a significância das diferenças entre três ou mais grupos foi avaliada pelo teste de Tukey (Prism 5 Graphpad). A significância das diferenças entre dois grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5.4. Resultados

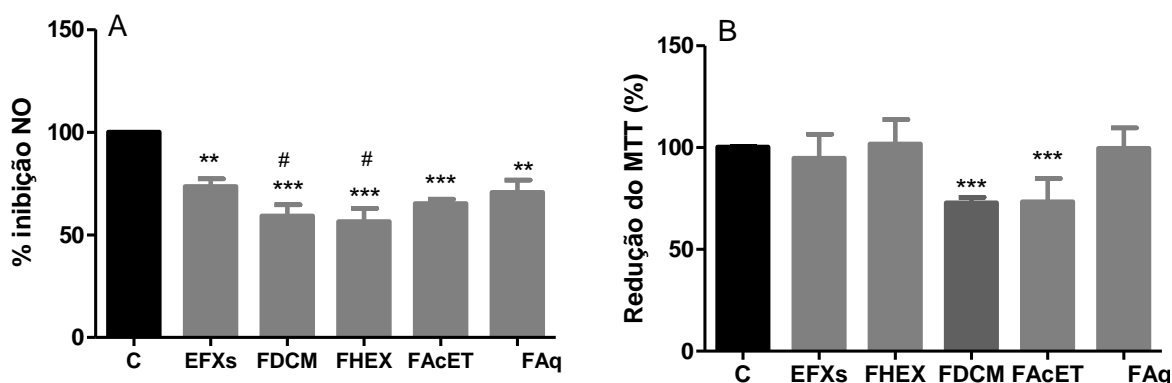
5.4.1 Estudo dos efeitos dos extratos de folhas de *X. sagittifolium* na produção de óxido nítrico (NO) por células macrofágicas RAW 264.7 e citotoxicidade

A Figura 58A mostra a inibição da produção de NO pelas células tratadas com o extrato hidroetanólico de folhas de *X. sagittifolium* (EFXs) e a potencialização do efeito pelo tratamento com as frações apolares desse extrato. O EFXs inibiu 26,5% da produção de NO, enquanto as frações FHEX e FDCM aumentaram significativamente esta inibição em relação ao EFXs, levando a 44,8 % e 42,8% de inibição, respectivamente. Para verificar se a inibição de óxido nítrico não sofria influência de citotoxicidade das amostras, o ensaio de viabilidade celular foi realizado com o teste do MTT. Foi verificada uma pequena inibição da viabilidade das células tratadas apenas com a FDCM (27,0%) e FAcET (26,5%), não havendo variações significativas em relação ao controle para o extrato bruto e demais frações (Figura 58B).

Uma vez verificada a inibição da produção NO pelo EFXs, o efeito de diferentes concentrações do EFXs foi determinado para calcular o IC50. Como pode ser verificado na Figura 59A, o efeito inibidor da produção de óxido nítrico mostrou-se concentração-dependente a partir de 50 µg/ mL. Foram observadas inibições de 28%, 45% e 57% para as concentrações de 50, 70 e 100 µg/mL, respectivamente, com IC50 de 90 µg/mL. É importante destacar que o EFXs foi capaz de inibir a produção de NO sem causar citotoxicidade às células submetidas ao tratamento (Figura 59B), mesmo na mais alta concentração testada.

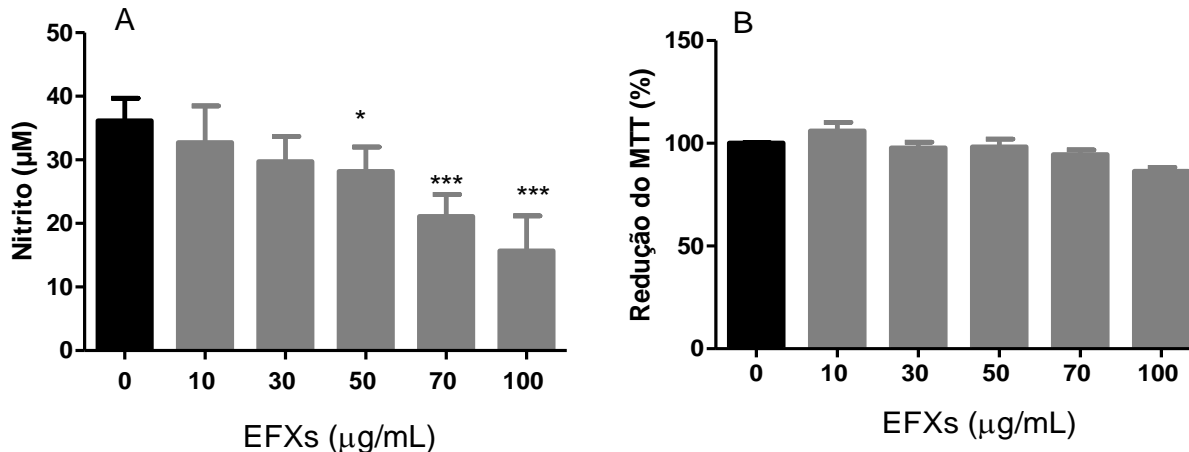
Como as frações apolares do EFXs foram as que mostraram maior redução na produção de NO pelas células RAW 264.7 (Figura 58A), os efeitos de diferentes concentrações destas amostras também foram avaliados para determinação do IC50. Como mostra a Figura 60, as frações FDCM (Figura 60A) e FHEX (Figura 60B) também mostraram inibição da produção de NO de forma concentração dependente, assim como o EFXs (Figura 59A). As frações apolares (Figuras 60A e 60B) apresentaram inibições significativas já com 1 µg/mL, o que não se observou com o EFXs, e as inibições com 50 µg/mL foram maiores do que a induzida pelo EFXs, embora com 100 µg/mL os efeitos tenham sido semelhantes (inibição de cerca de 55%).

Figura 58- Efeito do extrato hidroetanólico de *Xanthosoma sagittifolium* (EFXs) e suas frações sobre linhagem macrofágica RAW 264.7. (A) Produção de NO. (B) Viabilidade celular.



Legenda: As células (5×10^5 /mL) foram estimuladas com Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) 1 μ g/mL e tratadas ou não com as frações hexânica (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etila (FAcET) e aquosa (FAq) a 50 μ g/mL por 24 h. O nitrito foi determinado pelo reagente de Griess e a viabilidade celular pelo ensaio do MTT. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle, e # $p < 0,05$ vs EFXs (teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey).

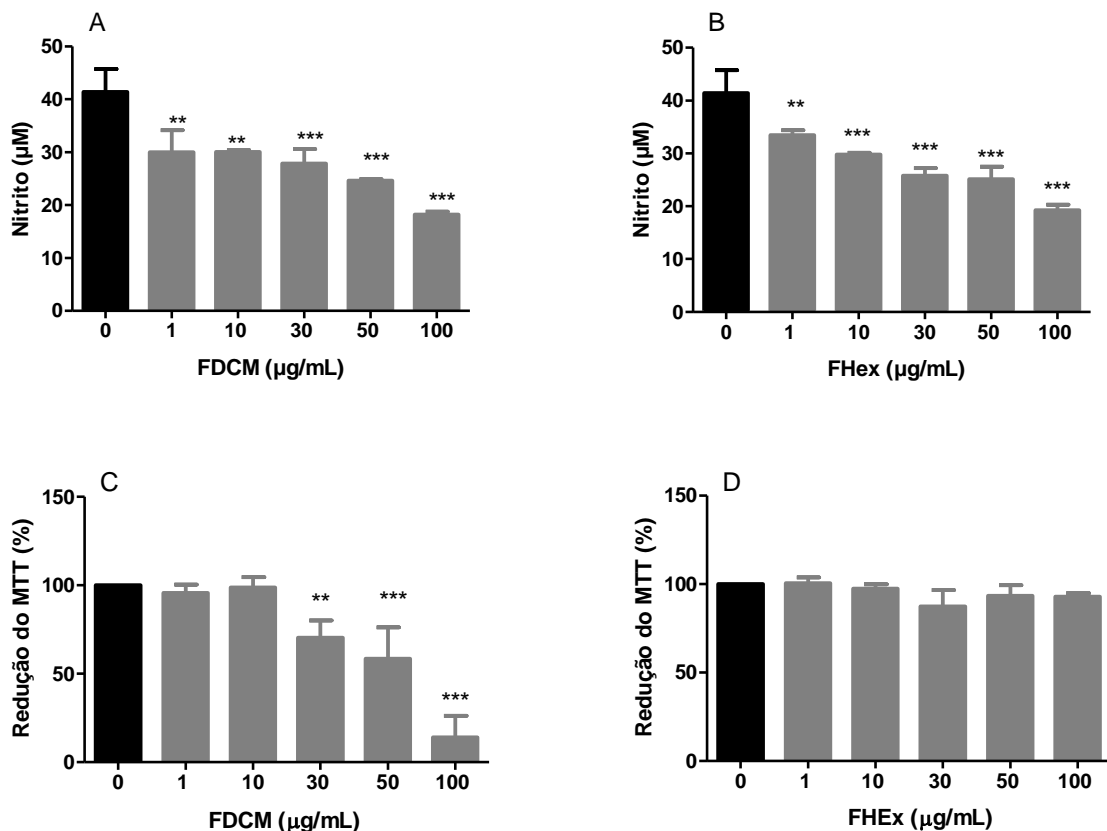
Figura 59- Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de *Xanthosoma sagittifolium* (EFXs) sobre a linhagem celular macrofágica RAW 264.7. (A) Produção de NO. (B) Atividade redutora mitocondrial (ARM).



Legenda: As células (5×10^5 /mL) foram estimuladas com LPS 1 μ g/mL e tratadas ou não com o EFXs em diferentes concentrações por 24 h. O nitrito foi determinado pelo reagente de Griess e a viabilidade celular pelo ensaio do MTT. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes, com triplicata. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs controle (teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey).

As Figuras 60C e 60D mostram as viabilidades das células tratadas com as frações FDCM e FHEX, respectivamente. A inibição significativa da FDCM na produção de NO por (Figura 60A) parece estar relacionada com efeito citotóxico, já que esta fração mostrou toxicidade sobre tais células nas concentrações de 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 60C). Por outro lado, as inibições na produção de NO, apresentadas pela FHEX (Figura 60B) não parecem ter relação com citotoxicidade, já que as alterações da viabilidade de macrófagos induzidas por esta fração não foram significativas em relação ao controle (Figura 60D). Os valores de IC50 para as frações FHEX e FDCM foram de 56 $\mu\text{g/mL}$ e 70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 60- Efeito das frações apolares diclorometano (FDCM) e hexânica (FHEX) sobre células da linhagem RAW 264.7. (A) Produção de NO (FDCM). (B) Produção de NO (FHEX). (C) Viabilidade celular (FDCM). (D) Viabilidade celular (FHEX).



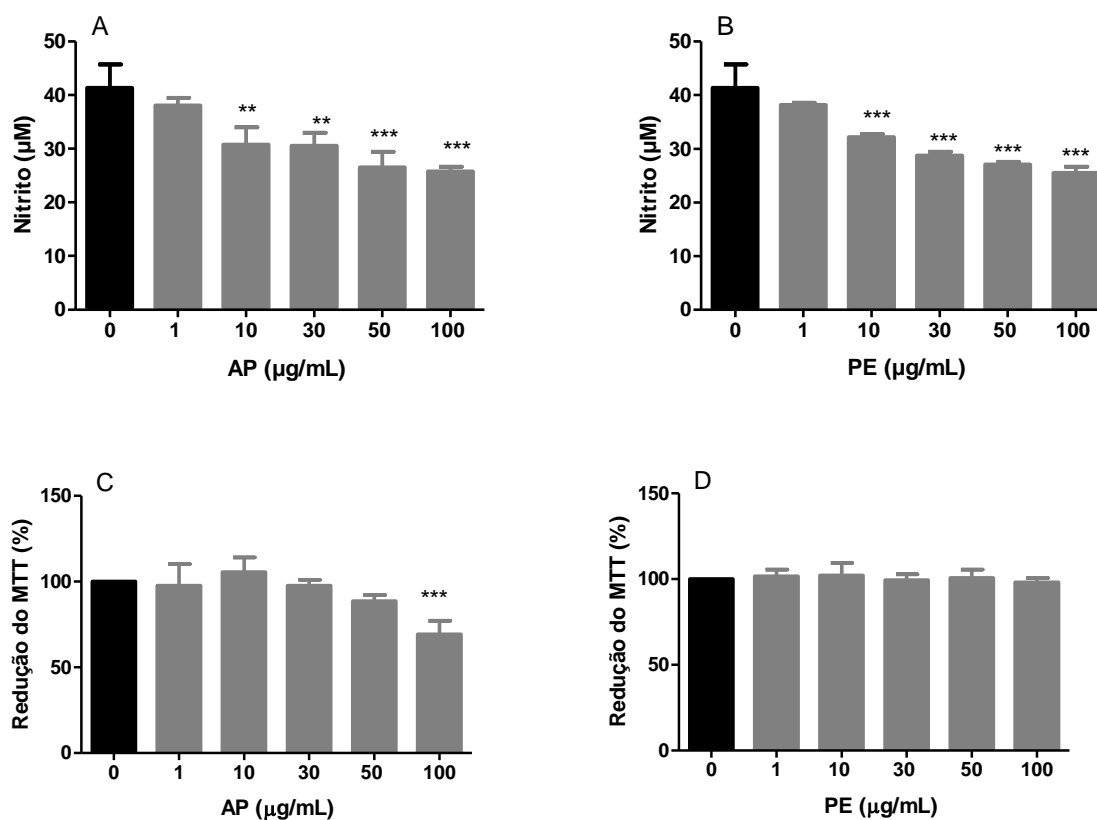
Legenda: As células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ e tratadas ou não com as frações em diferentes concentrações por 24 h. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey).

Conforme demonstrado no capítulo 2, os compostos majoritários da FHEX (Figura 45) e FDCM (Figura 47) estão representados pelo ácido palmítico (AP) e palmitato de etila (PE). Desta forma, o efeito destas substâncias foi verificado na produção de NO, na tentativa de avaliar a participação destas moléculas nos efeitos observados com as respectivas frações. Observa-se nas Figuras 61A e 61B que ambas as substâncias isoladas foram capazes de inibir a produção de NO por macrófagos, porém com intensidade menor (ambos com inibição de 30% com 100 µg/mL) do que as frações apolares de *X. sagittifolium*, que apresentaram inibições de 54% e 57%, respectivamente (Figuras 60A e 60B). Desta forma, os efeitos moduladores da FHEX e FDCM devem resultar da ação conjunta de seus constituintes. Entretanto, quando se avalia o grau de toxicidade do ácido palmítico (Figura 61C) e do palmitato de etila (Figura 61D) sobre as células RAW 264.7, observa-se que o efeito citotóxico destas moléculas isoladas não foi tão expressivo quanto o da fração apolar FDCM, sugerindo que a citotoxicidade da FDCM deve resultar da ação sinérgica de constituintes majoritários e minoritários.

5.4.2 Efeito do extrato bruto de *Xanthosoma sagittifolium* e suas frações apolares sobre a produção de IL-1, TNF- α e IL-10 por macrófagos RAW 264.7

Tendo verificado que o EFXs e as frações apolares inibiram a produção *in vitro* de NO, um modulador da resposta imunoinflamatória, nosso interesse se voltou para a investigação dos efeitos destas amostras sobre a produção de outros moduladores deste tipo de resposta, como a IL-1, TNF- α e IL-10. Como pode ser observado na Figura 62A, o estímulo com LPS aumentou a produção de IL-1 (49,76%), em relação aos macrófagos RAW 264.7 não estimulados, e todas as amostras de *X. sagittifolium*, assim como a dexametasona (57,6%), foram capazes de inibir a produção desta citocina pró-inflamatória, em relação às células estimuladas com LPS. Os percentuais de inibição da produção de IL-1 na maior concentração testada (50 µg/mL) de EFXs, FHEX e FDCM foram de 51,7%, 57,4% e 42,4%, respectivamente. Várias condições testadas com as amostras de *X. sagittifolium* reduziram a produção de IL-1 ao nível das células não estimuladas com LPS, com exceção da FHex a 50 µg/mL e da FDCM a 25 µg/mL, que mostraram concentração de IL-1 (19,04 pg/mL e 15,57 pg/mL, respectivamente) menor que o controle não estimulado com LPS (31,23 pg/mL).

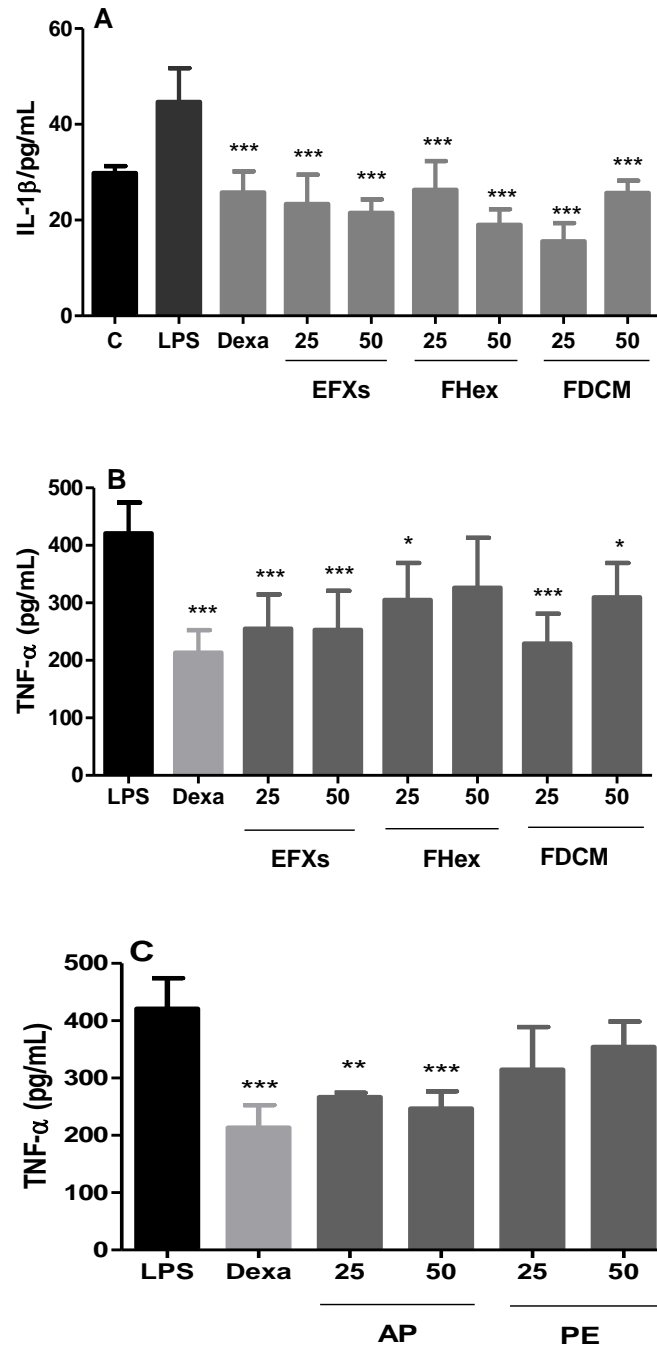
Figura 61- Efeitos do ácido palmítico (AP) e do palmitato de etila (PE) sobre a linhagem celular RAW 264.7. Produção de NO após tratamento com (A) Ácido palmítico. (B) Palmitato de etila. Viabilidade celular após tratamento com (C) Ácido palmítico. (D) Palmitato de etila.



Legenda: As células (5×10^5 /mL) foram estimuladas com LPS 1 µg/mL e tratadas ou não com as amostras em diferentes concentrações. Os resultados representam a média \pm DP de um experimento realizado em triplicata. **p<0,01; ***p<0,001 (teste One-way ANOVA seguido de Tukey).

Como foi observado que o EFXs foi capaz de inibir a produção *in vitro* de IL-1, uma citocina pró-inflamatória, também houve interesse neste trabalho em avaliar o efeito do EFXs sobre a produção de TNF- α , outra citocina pró-inflamatória, por células macrofágicas RAW 264.7. A Figura 62B mostra que todas as amostras testadas de *X. sagittifolium* (EFXs, FHEX e FDCM) inibiram a produção *in vitro* desta citocina com 25 µg/mL (39,9%, 28,2% e 46,0%, respectivamente). A dexametasona, medicamento imunossupressor, também foi capaz de inibir (49,7%) a produção de TNF-alfa. Na concentração de 50 µg/mL somente a FHEX não inibiu significativamente a produção desta citocina, o que pode ser explicado pelo alto desvio padrão observado.

Figura 62- Efeito do EFXs, frações apolares, ácido palmítico (AP) e palmitato de etila (PE) sobre a produção *in vitro* de IL-1 e/ou TNF- α por macrófagos RAW 264.7. (A) IL-1 de EFXs e frações apolares, (B) TNF- α de EFXs e frações apolares, (C) TNF- α de AP e PE.

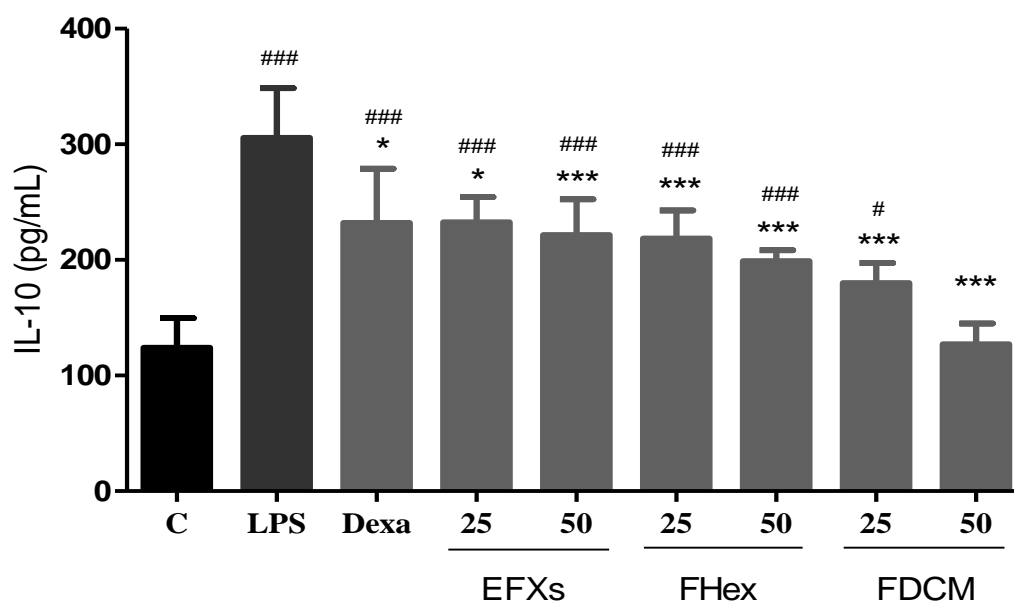


Legenda: As células (5×10^5 /mL) foram estimuladas com LPS 1 μ g/mL e tratadas ou não com as amostras ou dexametasona (10 μ M) por 24 h. A IL-1 e o TNF- α foram determinados no sobrenadante de cultura por ELISA, utilizando curvas padrão das respectivas citocinas recombinantes. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs LPS (teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey).

Sabendo-se que as amostras de *X. sagittifolium* foram capazes de reduzir a concentração de TNF- α no sobrenadante dos macrófagos e que tais amostras possuem o AP e o PE como compostos majoritários, estes também foram testados na produção de TNF- α , o que pode ser observado na Figura 62C. O ácido palmítico inibiu a produção de TNF- α (37,1%), mas não o palmitato de etila.

Com relação aos efeitos das frações apolares na produção de IL-10 por células RAW 264.7, podemos observar na Figura 63 que a estimulação com LPS aumentou a produção de IL-10 em 146,0%, em relação às células não estimuladas, e que os tratamentos com EFXs, FHEX e FDCM, ambas a 50 $\mu\text{g/mL}$, inibiram a produção desta citocina em 27,5%, 34,9% e 58,4%, respectivamente, em relação às células estimuladas com LPS, inclusive o tratamento com a dexametasona (24,1%), um glicocorticoide com ação imunossupressora. Entretanto, esta citocina anti-inflamatória (IL-10) encontra-se significativamente aumentada em quase todos os tratamentos em relação ao controle não estimulado, com exceção da FDCM a 50 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 63- Efeito do EFXs e frações apolares sobre a produção *in vitro* de IL-10 por macrófagos RAW 264.7.



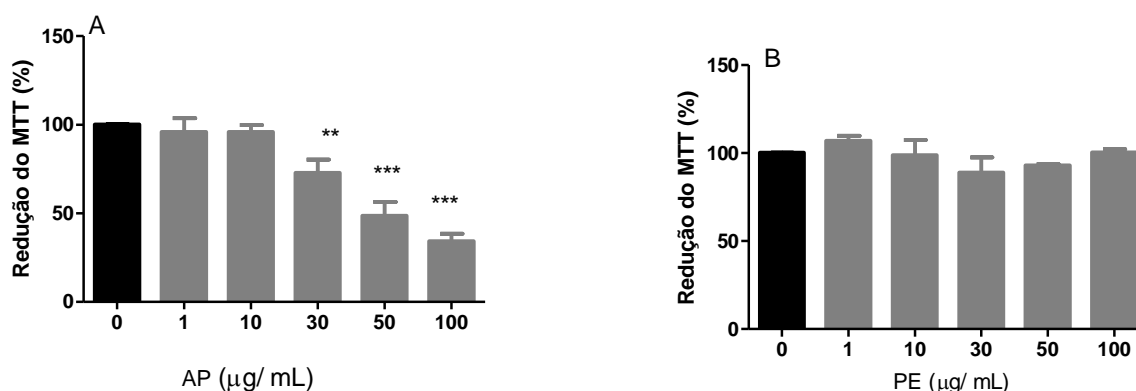
Legenda: As células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ e tratadas ou não com as amostras ou Dexametasona (10 μM) por 24 h. A IL-10 foi determinada no sobrenadante de cultura por ELISA, utilizando curva padrão de IL-10 recombinante. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs LPS, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs controle (teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey).

Tendo avaliado um baixo nível de toxicidade sobre a linhagem celular macrofágica não tumoral RAW 264.7 pelo EFXs (Figura 61), FHEX (Figura 62), Ácido palmítico e palmitato de etila (Figura 63), e sabendo que macrófagos e linfócitos atuam em conjunto no sistema imune e no desenvolvimento da inflamação crônica, decidimos avaliar o grau de toxicidade de todas as amostras sobre linfócitos normais. Como a linhagem macrofágica utilizada neste capítulo é de origem murina, optamos por utilizar linfócitos também murinos (de baço) para avaliar a citotoxicidade.

5.4.3 Efeitos do EFXs, FDCM, FHEX e compostos majoritários destas frações sobre a viabilidade de linfócitos de animais saudáveis.

Após incubação dos linfócitos com o ácido palmítico por 72 h verificamos que este composto majoritário isolado inibiu a viabilidade de linfócitos em 51,4%, e 65,8% com 50 e 100 µg/mL, respectivamente (Figura 64A). O palmitato de etila não apresentou efeito citotóxico para linfócitos (Figura 64B).

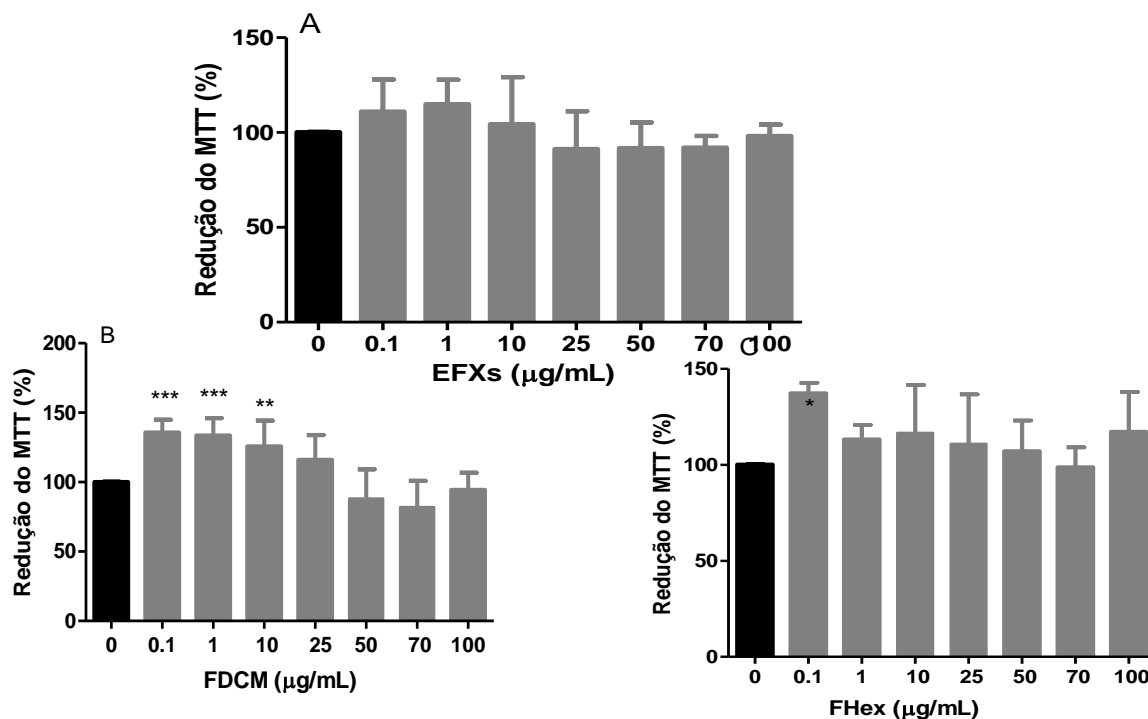
Figura 64- Efeito dos compostos majoritários das frações apolares do EFXs sobre a viabilidade de linfócitos de camundongos saudáveis. (A) Ácido palmítico. (B) Palmitato de etila.



Legenda: As células (2×10^6 /mL) foram estimuladas com Concanavalina A 5 µg/mL e tratadas ou não com as amostras em diferentes concentrações. Os resultados representam a média \pm DP de um experimento com triplicata. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (teste One-way ANOVA seguido de Tukey).

Quando testamos as amostras de *X. sagittifolium*, verificamos que embora a fração FDCM tenha apresentado citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 (Figura 60C), nem o EFXs (Figura 65A) nem a fração FDCM (Figura 65B) ou FHEX (Figura 65C) apresentaram citotoxicidade para linfócitos de camundongos saudáveis estimulados com Concanavalina A. Pelo contrário, a FDCM e a FHEX apresentaram efeito estimulador de linfócitos quando testadas em baixa concentração.

Figura 65- Efeito do extrato bruto de taioba (EFXs) e das frações diclorometânica (FDCM) e hexânica (FHEX) sobre a viabilidade de linfócitos normais. (A) EFXs, (B) FDCM e (C) FHEX.



Legenda: As células (2×10^6 /mL) foram estimuladas com Concanavalina A 5 µg/mL e tratadas ou não com as amostras em diferentes concentrações por 72 h. Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes, com triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey).

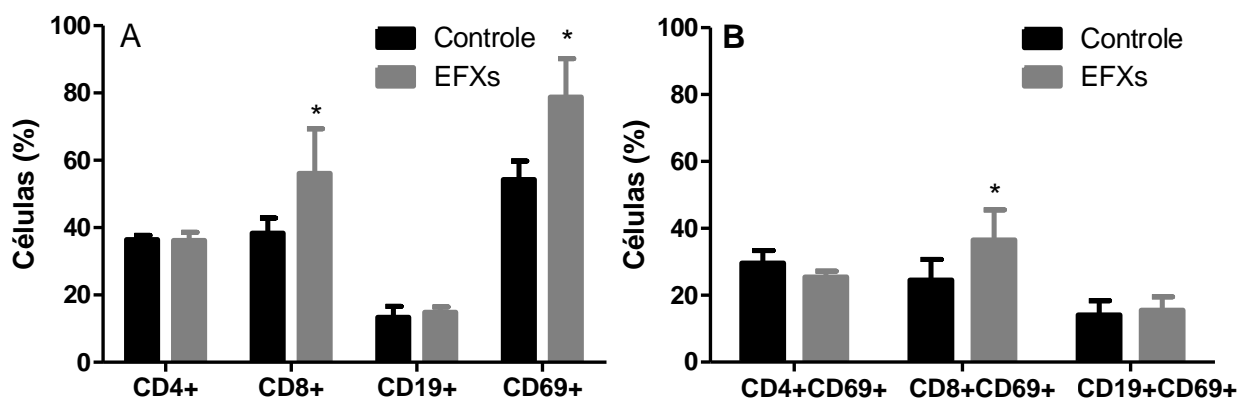
Alguns estudos têm mostrado atividade imunoestimuladora sobre linfócitos para plantas da família Araceae, como demonstrado por Brown e colaboradores (2005), com extratos de *Colocasia esculenta* sobre linfócitos. Como o EFXs não mostra citotoxicidade para macrófagos e linfócitos, modula algumas funções de macrófagos e tais células atuam em conjunto com os linfócitos na resposta imunoinflamatória crônica, decidiu-se avaliar os efeitos do EFXs sobre diferentes populações de linfócitos.

5.4.4 Efeitos do EFXs sobre diferentes populações de linfócitos

Para verificar o efeito *in vitro* sobre as populações de linfócitos e seus níveis de ativação na cultura, as células foram incubadas *in vitro* por 72 h na presença do mitógeno Concanavalina A, juntamente com o EFXs, e posteriormente marcadas com os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 e anti-CD69. É importante destacar que as médias das contagens de células viáveis na cultura controle ($58,92 \pm 10,49$) e tratada com EFXs ($43,65 \pm 7,84$), não variaram significativamente (dados não mostrados). Os resultados mostram aumento no percentual de células TCD8⁺ totais (T citotóxicas) e células CD69⁺ totais (células ativadas), enquanto os percentuais de células CD4⁺ totais e CD19⁺ totais (linfócitos B) não sofreram alteração significativa (Figura 66A).

Sabendo-se que o CD69 é um marcador de superfície de ativação inicial de leucócitos, expresso em células T, B e NK, dentre outras, após estímulos provocados por mitógenos ou durante processos infecciosos ou inflamatórios, foi de grande interesse investigar sobre quais destas populações de linfócitos o EFXs poderia estar exercendo efeito de ativação ou inibição. O efeito do EFXs sobre as células CD8⁺ se tornou ainda mais interessante com a observação de que este extrato não só aumentou o percentual de células T CD8⁺ totais, mas também aumentou o percentual de células CD8⁺ ativas (CD8⁺CD69⁺) (Figura 66B), sem alterar significativamente o nível de ativação dos linfócitos TCD4⁺ ou linfócito B (CD19⁺).

Figura 66- Efeito do EFXs em diferentes populações de linfócitos. (A) Linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD69⁺. (B) Linfócitos ativados (CD4⁺CD69⁺, CD8⁺CD69⁺ e CD19⁺CD69⁺).



Legenda: Os linfócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) de baço de camundongos saudáveis foram estimulados com ConA na ausência (controle) ou na presença de EFXs $50 \mu\text{g/mL}$ durante 72 h. Os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos para estudo de fenotipagem e nível de ativação, conforme descrito em métodos, e analisados por citometria de fluxo. Dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle (teste t de Student).

5.5 Discussão

Durante o processo inflamatório, células do sistema imunológico, principalmente os macrófagos e os neutrófilos, produzem níveis elevados de moléculas reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). O óxido nítrico (NO), um representante da família das RNS, é um importante mensageiro intercelular (Yang *et al.*, 2013), desempenha papel crucial nas respostas antimicrobianas e antivirais (Punturee *et al.*, 2004), porém quando produzidos em altos níveis por macrófagos contribui para o desenvolvimento da inflamação crônica (Napolitano *et al.*, 2005). Elevados níveis de ROS e RNS conduzem ao estresse oxidativo e indução de modificações deletérias no DNA, lipídios e proteínas (Napolitano *et al.*, 2005; Tarlovsky, 2013). Estudos epidemiológicos têm mostrado que a inflamação crônica predispõe os indivíduos a diferentes tipos de câncer (Mantovani *et al.*, 2008).

O EFXs reduziu o nível de NO em sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264,7 estimulados com LPS, o que já foi descrito para outras plantas da família Araceae (Kim *et al.*, 1998). Este efeito inibidor do EFXs foi potencializado pelas frações apolares FDCM e FHEX, as quais possuem o ácido palmítico (AP) e o palmitato de etila (PE) como constituintes majoritários. Estes resultados são de grande relevância desde que o NO em excesso pode contribuir para a patogênese de muitas doenças inflamatórias.

Tanto o AP como o PE inibiram a produção de NO, quando testados isoladamente, porém com efeitos ligeiramente menores do que as frações FDCM e FHEX, portanto os

efeitos observados com as frações podem resultar da ação conjunta desses dois constituintes e possivelmente de outros minoritários. Othman e colaboradores (2015) também demonstraram atividade anti-inflamatória *in vitro* da fração hexânica de *J. curcas*, enriquecida com ácido palmítico, uma planta da família Euphorbiaceae. Cai e colaboradores (2005) também mostraram que o aumento da concentração de ácido palmítico em células e/ou meios de cultura de células pode ser um fator que acarreta a diminuição dos níveis de óxido nítrico. Por outro lado, o ácido palmítico e o palmitato de etila provavelmente não são os responsáveis pela citotoxicidade observada na fração FDCM, uma vez que o palmitato de etila não apresentou citotoxicidade e o ácido palmítico apresentou citotoxicidade apenas na maior concentração testada (100 µg/mL), e ainda assim, bem menor do que a observada com a fração FDCM.

Ácidos graxos são componentes essenciais intracelulares que servem como uma fonte de energia, como componentes estruturais de membranas e como mediadores da sinalização celular. Por conseguinte, a manutenção de quantidades adequadas de ácidos graxos é crítica para as funções celulares e sobrevivência da célula (Park *et al.*, 2014). O AP, ácido graxo C16 saturado mais comum encontrado em animais, plantas e microrganismos, também é utilizado pela célula para fornecimento de energia e sua concentração intracelular é capaz de regular várias funções na célula, como a atividade da ácido graxo sintase (AGS) (Zhou *et al.*, 2013), enzima responsável pela síntese de ácidos graxos. Quando presente em excesso, o AP desencadeia estresse do retículo endoplasmático e é capaz de induzir morte celular por apoptose, no entanto, a compreensão do mecanismo de sua toxicidade permanece ainda incompleta (Park *et al.*, 2014). Várias vias intracelulares de transdução de sinal estão associadas com o ácido palmítico, como por exemplo, a ativação da família de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), que atuam na regulação do crescimento e diferenciação celular (Kim *et al.*, 2015).

Além disso, o ácido palmítico encontra-se envolvido num importante mecanismo de regulação da função de proteínas através da palmitoilação/despalmitoilação das mesmas (Linder, 2007). Neste processo o ácido palmítico é unido à proteína através de uma ligação tioéster a um resíduo específico de cisteína. As proteínas palmitoiladas ocorrem quase que exclusivamente na superfície citoplasmática da membrana plasmática, onde muitas delas participam de processos de sinalização transmembrana. A palmitoilação de proteínas é uma modificação covalente pós-traducional, implicada nas interações proteína-proteína e regulação da localização subcelular da proteína, estabilidade, tráfego, atividade enzimática, degradação, direcionamento para *lipid rafts* na membrana, interação com efetores e outros aspectos da função da proteína. A palmitoilação é uma modificação reversível, capaz de regular a função de proteínas através de ciclos de palmitoilação e despalmitoilação, reações estas catalisadas

pelas enzimas proteína-palmitoil transferase e proteína tioesterase, respectivamente. A função mais comum da palmitoilação de proteínas é permitir o ancoramento das mesmas à membrana plasmática, o que determina sua proximidade a outras proteínas, substratos e enzimas de membrana, permitindo participar do processo de sinalização intracelular, enquanto a despalmiteilação faz com que a proteína retorne ao citosol, muitas vezes perdendo sua atividade (Voet *et al.*, 2008, Korycka *et al.*, 2012, Blaskovi, 2013). Neste sentido, uma enzima importante a ter sua atividade regulada seria a proteína palmitoil-transferase, responsável pela ligação do AP à proteína e incorporação da mesma à membrana plasmática (Kerner *et al.*, 2014).

No que se refere ao sistema imune, as vias de sinalização tanto da resposta imune inata e adaptativa, quanto de suas funções efetoras, frequentemente ocorrem em nível de membranas celulares e são reguladas por mecanismos complexos, incluindo a palmitoilação de proteínas, como por exemplo, na sinalização da ativação da célula T induzida pelo *T cell receptor* (Ladygina *et al.*, 2011; Yount *et al.*, 2013). Outra evidência importante é que a palmitoilação/despalmiteilação de proteínas também sofre regulação por modificações pós-traducionais como fosforilação e nitrosilação de proteínas (Salaun *et al.*, 2010). A iNOS, além de ser regulada em nível de transcrição, tradução e pós-tradução, por palmitoilação/despalmiteilação, também é regulada pós-traducionalmente por fosforilação em tirosina, com seu nível de fosforilação coincidindo positivamente com a produção de NO. A fosforilação da iNOS é importante para a localização subcelular e função da iNOS (Ben *et al.*, 2011). Quando ela está fosforilada ocorre o aumento da síntese de NO. É possível que a presença majoritária de ácido palmítico e palmitato de etila nas frações apolares da taioba possa estar interferindo (diminuindo a palmitoilação) no processo de palmitoilação/despalmiteilação da iNOS, sub-localização (reduzindo o seu ancoramento na membrana e reduzindo sua ativação) e atividade na célula (diminuindo a produção de NO). Dados da literatura mostram que o excesso de ácido palmítico inibe a palmitoilação (Blacovik *et al.*, 2013), e indicam que ácido palmítico inibe a liberação de óxido nítrico (Wu *et al.*, 2014). Por outro lado, a atividade anti-inflamatória em macrófagos estimulados com LPS, através da inibição da iNOS tem sido demonstrada para outras espécies de plantas, como a *Arisaema cum Bile* (Ahn e Je, 2012).

Embora nossos resultados demonstrem que o ácido palmítico isolado, bem como as frações em que este é majoritário, foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico *in vitro*, alguns estudos indicam que ácidos graxos saturados livres como o ácido láurico (12: 0) e ácido palmítico (PA, 16: 0) podem apresentar efeitos pró-inflamatórios (Wu *et al.*, 2014), atuando como um agonista e ativando o receptor *toll-like* (TLR)-2 e TLR-4, respectivamente, os quais em última análise podem estimular a expressão de genes pró-inflamatórios mediados

pelo NFkB, como as citocinas, em macrófagos (Boer *et al.*, 2014). No entanto, estes efeitos só podem ser evidentes em doses bem elevadas (200-500 mM) e em incubações com mais de 12 h (Boer *et al.*, 2014).

Por outro lado, existem evidências de que o palmitato de etila (PE) inibe a função de células macrofágicas, como demonstrado *in vivo* pela redução da fagocitose de hemácias por células do sistema reticulo endotelial do baço (Sebestik e Brabec, 1983). Também foi demonstrado que o PE, dependendo da dose, é capaz de induzir certo grau de morte celular no baço, e que este efeito é seletivo, não mostrando sinais histológicos de toxicidade para fígado, pulmões, rins, coração, medula óssea, linfonodos ou timo (Sebestik e Brabec, 1983). Em nosso trabalho, o PE também inibiu a função de células macrofágicas, reduzindo a produção de óxido nítrico, porém não apresentou citotoxicidade para estas células.

As citocinas podem estar associadas com a resposta inflamatória (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α) ou anti-inflamatória (IL-10 e o fator de crescimento tumoral TGF- β). Várias delas interferem na síntese e liberação de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, prostaglandinas e leucotrienos (Franke *et al.*, 2002). O TNF- α , a IL-1, IL-6, por exemplo, são secretados principalmente por macrófagos, embora estas células também secretem em menor intensidade a IL-10 (Roitt, 2013).

Neste trabalho, o EFXs e sua frações apolares foram capazes de inibir a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β por células macrofágicas, sugerindo um potencial efeito anti-inflamatório para estas amostras. A dexametasona também inibiu a produção desta citocina, confirmando dados da literatura (Dip *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2008). O EFXs e suas frações apolares também inibiram a produção de TNF- α , corroborando o potencial anti-inflamatório destas amostras. O extrato de *Rhaphidophora korthalsi*, outra espécie da família Araceae, também apresentou efeito regulador sobre a secreção de citocinas (Yeap *et al.*, 2013).

A atividade dos macrófagos é regulada por mediadores como o NO, uma molécula altamente reativa. Por outro lado, a iNOS, presente em macrófagos, tem sua síntese e atividade estimulada por citocinas, como o TNF- α , e outros estímulos como LPS (Green *et al.*, 1990; Punturee *et al.*, 2004). Sendo assim, a diminuição de TNF- α observada com o EFXs e frações apolares pode estar contribuindo para a diminuição da produção de NO observada com as mesmas amostras. A erva medicinal chinesa *Arisaema rhizomatum* também apresentou redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α , porém em ensaios *in vivo* em camundongos BALB/c, além de reduzir outras citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e IL-33 (Chunxia *et al.*, 2011).

Saeed e colaboradores (2012) demonstraram que o palmitato de metila e palmitato de etila inibem o processo inflamatório *in vivo*, reduzindo o edema de pata e de orelha, e os

níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6. No entanto, em nosso trabalho o PE não reduziu a produção *in vitro* de TNF-alfa no sobrenadante de macrófagos. Cai e colaboradores (2005) também mostraram que o aumento da concentração de AP em células e/ou meios de cultura de células podem diminuir os níveis de TNF- α , e provavelmente outros mediadores. Desta forma, a discrepância nos resultados pode estar na diferença dos modelos experimentais utilizados.

Mocellin e colaboradores (2003) afirmam que a classificação das citocinas como pró e anti-inflamatória talvez não se aplique aos efeitos pleiotrópicos de interleucina 10 (IL-10). Segundo os autores, a função da citocina é determinada pelos seus níveis teciduais, natureza da célula alvo e sinal de ativação. O tempo de incubação, a sequência de exposição às citocinas e o modelo experimental testado também interferem na síntese e atividade. O EFXs e frações apolares inibiram a produção da IL-10. Dados da literatura mostram que a interação do macrófago com o LPS ativa a via da p38 MAPK, a qual ativa a produção de IL-10, IL-1 β e TNF- α (Foey *et al.*, 1998; Bruggen *et al.*, 1999). Mais detalhadamente, o TNF- α estimula a produção de IL-10 em monócitos estimulados por LPS (Wanidworanun e Strober, 1993). Desta forma, a redução dos níveis de IL-10 no sobrenadante de macrófagos *in vitro*, induzido pelas amostras de *X. sagittifolium*, pode ter relação com o efeito inibidor destas amostras sobre a produção de TNF- α , citocina que estimula a produção de IL-10. Além disso, tem sido demonstrado efeito anti-inflamatório para a IL-10 através da inibição da ação de monócitos/macrófagos, e indiretamente, via supressão da IL-1 e TNF- α (Conti *et al.*, 2003). O efeito de inibição das amostras de *X. sagittifolium* sobre a IL-10 sugere que a atividade anti-inflamatória do EFXs e frações apolares esteja mais diretamente relacionada à inibição da secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e não ao aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Por outro lado, o efeito redutor dos níveis de IL-10 pelas amostras de *X. sagittifolium* é interessante desde que esta citocina tem sido superexpressa em várias condições patológicas (Conti *et al.*, 2003).

Embora não tenhamos avaliado o efeito do AP e PE sobre a secreção de IL-10, apenas para o TNF- α , a redução da secreção *in vitro* de IL-10 pelo palmitato de metila, assim como de TNF- α e óxido nítrico (Cai *et al.*, 2005), pode sugerir que o PE também possa vir a inibir a produção de IL-10.

Como tem sido descrito que o AP e o PE (compostos majoritários do EFXs, FDCM e FHEX) inibem a expressão da óxido nítrico sintase indutível, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, responsáveis pela produção de grande quantidade de óxido nítrico, prostanoídes e leucotrienos, respectivamente, assim como de outros mediadores do processo inflamatório, tais como as citocinas IL-1 β , TNF- α (Saeed *et al.*, 2012; Boer *et al.*, 2014), podemos sugerir que o AP e PE possam estar contribuindo para o efeito anti-inflamatório do EFXs e frações

apolares, desde que neste trabalho ambos reduziram os níveis de NO, e o AP também reduziu a secreção de TNF- α .

Como os linfócitos T têm sido o principal foco de esforços para manipular terapeuticamente a imunidade endógena antitumoral, este trabalho avaliou o efeito *in vitro* do EFXs sobre as populações de células TCD4⁺, TCD8⁺ e células B (CD19⁺). As células CD8⁺ são células T citotóxicas efectoras, capazes de matar de forma direta células alvo que expressam antígenos peptídicos capazes de serem apresentados por moléculas do MHC classe I. As células tumorais e células infectadas por vírus são exemplos de células alvo para os linfócitos T CD8 (Pardoll, 2012). A possibilidade do EFXs ser capaz de aumentar *in vitro* o percentual destas células alerta para o potencial deste extrato no tratamento do câncer. Sabendo-se que o CD69 é um marcador de superfície de ativação celular, sendo detectado em 1 h ou 2 h após a ativação da célula, e que existe uma correlação positiva entre a proliferação do linfócito e a expressão de CD69⁺ (Veloza *et al.*, 2013), o resultado aqui observado do EFXs aumentando o número de células CD69⁺ totais sugere ativação de algum tipo de resposta imune. A tendência do EFXs em aumentar o percentual de células CD8⁺ ativas (CD8⁺CD69⁺) torna esse extrato mais interessante ainda quanto ao seu potencial antitumoral, desde que células T efectoras CD8⁺, também chamadas de linfócitos T citotóxicos, são células responsáveis por reconhecer seletivamente peptídeos derivados de proteínas de todos os compartimentos de uma célula e matar células expressando tais antígenos, como as células cancerosas (Pardoll, 2012). Gree e colaboradores (2001) observaram que a palmitoilação de determinados peptídeos sintéticos modula a proliferação *in vitro* de células T CD8⁺. Como o AP é um dos compostos majoritários das frações apolares, este composto pode estar interferindo no processo de palmitoilação e ativação das subpopulações de linfócitos, contribuindo para sua modulação. Por outro lado, a porcentagem de linfócitos B e TCD4⁺ totais ou ativados não foram alterados, indicando uma seletividade de ação do EFXs em linfócitos T citotóxicos. Estudos com polifenóis derivados de flores de *Cassia auriculata* (CA) mostraram aumento significativo tanto de células T CD4⁺, T CD8⁺ como de células B (John *et al.*, 2011). O extrato de *Rhaphidophora korthalsi* (Araceae), que também apresenta efeito antitumoral, também regulou a secreção de citocinas, porém estimulou as células *Natural Killer* (Yeap *et al.*, 2013).

Com relação à composição do EFXs, foi demonstrado no Capítulo 1 que este apresenta grande quantidade de flavonoides da classe das flavonas (Figuras 25, 26 e 27), entre elas a luteolina e a apigenina. Além disso, no Capítulo 2 (Figuras 44 e 47) mostramos que as frações apolares encontram-se enriquecidas de AP, o qual, portanto, também está presente no EFXs. Como foi observado que o EFXs induz aumento do percentual de células TCD8⁺ e de sua ativação *in vitro*, este efeito pode ter relação com a presença de apigenina neste extrato bruto,

desde que tem sido demonstrado que a associação de apigenina a determinadas estratégias terapêuticas experimentais antitumorais é capaz de gerar uma alta frequência de células T CD8⁺ específicas contra o tumor (Chuang *et al.*, 2009). Por outro lado, a propriedade demonstrada do AP em ativar receptores do tipo *Toll-like* (Wu *et al.*, 2014) também pode estar contribuindo para o efeito do EFXs em aumentar as células T CD8⁺, já que a associação de ácido palmítico a agentes imunizadores tem aumentado o número e ativação de células T CD8⁺ em protocolos experimentais de produção de vacinas (Tan *et al.*, 2010).

A presença majoritária de flavonas no EFXs também pode estar contribuindo para os efeitos anti-inflamatórios relacionados à inibição da produção de NO e de citocinas, desde que dados da literatura demonstram que a apigenina inibe a síntese de NO (Shin *et al.*, 2012) e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (Xie *et al.*, 2012) por macrófagos RAW 264.7. Também encontra-se descrito na literatura dados de inibição da flavona luteolina sobre a síntese de NO (Choi *et al.*, 2011) e TNF-alfa (Xagorari *et al.*, 2001) por células RAW 264.7 e IL-1 *in vivo* (Shi *et al.*, 2015). Gallego e colaboradores (2009) verificaram que as flavonas luteolina e apigenina também podem reduzir a inflamação pode estar aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias como as citocinas liberadas pelos linfócitos do tipo Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13. Desta forma, a modulação das populações de linfócitos e da síntese de citocinas e NO pelo EFXs pode resultar tanto da ação do AP quanto das flavonas. É importante destacar também que o consumo acentuado de flavonoides e polifenóis reduz o desenvolvimento de câncer de pulmão, de esôfago, de próstata, carcinoma de células renais e câncer colo-retal (Kim *et al.*, 2013).

O tratamento de linfócitos normais com o EFXs e suas frações apolares FDCM e FHEX não induziu citotoxicidade aos mesmos, o que representa um dado importante uma vez que muitos antineoplásicos são citotóxicos para células não tumorais (Nishanthini e Mohan, 2012). O extrato de *Rhaphidophora korthalsii* Scott, uma planta da família Araceae, também não apresentou efeito citotóxico para linfócitos normais, pelo contrário, estimulou sua função mitocondrial e proliferação (Yeap *et al.*, 2007), enquanto a *Typhonium blumei*, outra planta da família Araceae, afetou a sensibilidade das células normais em menor proporção do que as células tumorais (Hsu *et al.*, 2011). Estes estudos indicam que extratos de algumas plantas desta família apresentam especificidade para inibição da proliferação da célula tumoral.

Existem evidências de que frutas, cereais e vegetais apresentam outras propriedades benéficas além da nutrição, podendo funcionar como alimento funcional (Vo e Kim, 2013). Produtos isolados ou processados a partir desses alimentos também podem representar fontes de substâncias bioativas, denominadas nutracêuticos (Arruda, 2005), também importantes para a manutenção da saúde e/ou prevenção de doenças. Nossas pesquisas alertam para a possibilidade das amostras de *Xanthosoma sagittifolium* apresentarem potencial como

nutracêutico, uma vez que representam materiais processados a partir da taioba com ação inibidora sobre a produção de NO, IL-1 β , TNF- α e ação estimuladora de células T citotóxicas (CD8+), efeitos benéficos no tratamento/prevenção de doenças imunoinflamatórias e câncer.

Resultados positivos de pesquisas com plantas medicinais e alimentos na manutenção ou recuperação da saúde levaram à aceitação generalizada dos termos “alimentos funcionais” e “nutracêuticos”. Os alimentos funcionais apresentam, além do valor nutricional, constituintes bioativos benéficos à saúde e prevenção de doenças e os nutracêuticos são suplementos alimentares resultantes do processamento do alimento, concentrando ou isolando agentes bioativos, também usados para melhorar a saúde. No Brasil, a espécie *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) é utilizada como uma hortaliça não convencional. Seguindo pesquisas bibliográficas e evidências quimiotaxonômicas, supomos que a folha da taioba, além do valor nutricional, apresentasse também propriedades medicinais. Desta forma, demos início às pesquisas com extratos hidroetanólicos (70%) das folhas da planta, e após verificação de que o extrato das folhas (EFXs) apresentava substâncias bioativas, optamos pelo fracionamento do mesmo por partição líquido-líquido, obtendo-se as frações FHEX, FDCM, FAcET e FAq. Foram realizados, então, estudos do potencial antioxidante, antitumoral e imunoregulador *in vitro* com todas as amostras, com o objetivo de buscar amostras mais ativas e os constituintes majoritários das mesmas.

O EFXs foi considerado como a amostra mais ativa quanto ao efeito antioxidante, desde que foi o único a reduzir os níveis intracelulares de ROS, além de neutralizar de forma significativa o radical DPPH, como fez a FacET (Parte. 1). Por outro lado, a redução da peroxidação lipídica também foi demonstrada para a FacET e FAq, além do EFXs. Estudos fitoquímicos do EFXs, FacET e FAq mostraram a presença majoritária de flavonoides do tipo flavonas, em especial os diglicosídeos de apigenina, os quais devem ter relação direta com os efeitos antioxidantes observados, segundo dados da literatura (Parte. 1), porém a não potencialização dos efeitos antioxidantes pelas frações demonstrou que o fracionamento do EFXs não otimizou este efeito (Parte. 1). Sabendo-se que o estresse oxidativo e a inflamação crônica predispõe os indivíduos a vários tipos de câncer, e que o EFXs e as frações polares são enriquecidos em flavonoides, pode-se sugerir que o EFXs e essas frações possuem grande potencial como agentes quimiopreventivos, uma vez que há correlação positiva entre dieta rica em flavonoides e menor risco de desenvolvimento de inflamação crônica e câncer.

A importância do estudo da ação antitumoral *in vitro* de produtos naturais está baseada no fato do câncer ser um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, e de que muitos tipos de câncer podem ser evitados através da alimentação equilibrada e da prática de exercícios. Prevenção é a melhor maneira e a mais econômica para combater a doença. Neste trabalho, apenas o EFXs e suas frações apolares (FHEX e a FDCM) apresentaram ação

antileucêmica *in vitro* em células Jurkat (Parte. 2), e merece destaque o aumento desta ação pela FDCM, em relação ao extrato bruto, mostrando potencialização do efeito com o fracionamento, concentrando ácidos graxos nas frações apolares. Em paralelo ao efeito aumentado com a FDCM, observa-se um enriquecimento do ácido palmítico (AP) nesta fração, em relação à FHEX (Parte 2). Curiosamente, a FDCM também foi a que mostrou mecanismos de ação diferenciados do EFXs e FHEX, em relação à expressão de ciclina A e proteína Bax (Parte. 2), além de apresentar concentrações maiores de compostos fenólicos e flavonoides, em relação às essas mesmas amostras (Parte. 1). Estes resultados podem sugerir que a atividade antileucêmica mais intensa da FCDM resulte do somatório da ação tanto do AP (Parte, 2), como de flavonoides (Parte.1), diferente da FHEX, que mostrou níveis de flavonoides (Parte. 1) mais baixos que a FDCM, semelhantes aos do EFXs (Parte. 1). Já a ação antileucêmica do EFXs deve resultar primariamente da ação dos seus constituintes majoritários, as flavonas derivadas de apigenina.

Nossos resultados sugerem que a taioba possui mecanismos de ação antioxidante diferentes, desde que a neutralização de DPPH, inibição da peroxidação lipídica e/ou quelação de ferro, observada com o EFXs e/ou frações polares, depende em grande parte da ação direta de moléculas de baixo peso molecular (flavonoides) presentes majoritariamente nestas amostras (Parte. 1). Entretanto, a ação inibidora sobre a produção de NO pelas frações apolares (Parte. 3), deve estar relacionada com a ação do ácido palmítico e seu éster sobre a regulação da expressão e/ou atividade da iNOS. O NO representa uma espécie ativa do nitrogênio e pode reagir com o superóxido, resultando na produção de peroxinitrito, um agente oxidante mais poderoso ainda. A sugestão de que as amostras apolares FHEX e FDCM possam atuar em nível de redução do mRNA da iNOS se baseia na capacidade demonstrada destas amostras em regular os níveis de mRNA de ciclina A e/ou Bax (Parte 2). Também não pode ser descartada a possibilidade da redução da atividade da iNOS, desde que esta enzima depende da palmitoilação/despalmitoilação para sua atividade. Dados da literatura mostram que a concentração de ácido palmítico interfere na palmitoilação de proteínas e as amostras FHEX e FDCM são enriquecidas em ácido palmítico (Parte. 2). Independente do mecanismo de ação, a inibição da produção de NO (Parte. 3) e redução da peroxidação lipídica (Parte. 1) pelo EFXs e frações apolares também representam potenciais mecanismos de inibição de tumorigênese.

Embora as frações apolares não tenha mostrado atividade antioxidante importante em várias técnicas utilizadas, todas as frações, polares e apolares, além do EFXs, apresentaram atividade quelante de ferro (Parte. 1). Esta atividade representa uma importante ação inibidora do estresse oxidativo, por inibir a reação de Fenton (Parte. 1), reduzindo os danos celulares e evitando, assim, a inflamação crônica e/ou desenvolvimento do câncer. Por outro lado, a

quelação do ferro também participa da ação antileucêmica, observada com o EFXs e frações apolares (Parte. 2), através da propriedade de não deixar o ferro ferroso disponível para a enzima ribonucleotídeo redutase (RR) sintetizar o DNA (enzima dependente de ferro), impedindo a progressão do ciclo celular e a proliferação das células leucêmicas. É importante destacar que o tratamento com o EFXs e todas as suas frações não mostrou toxicidade para as células não tumorais testadas.

Quanto às citocinas IL-1, TNF- α e IL-10, embora neste trabalho estas tenham sido avaliadas quanto à sua concentração no sobrenadante de cultura (Parte. 3), as reduções observadas após tratamento com o EFXs, FDCM e FHEX também podem resultar de inibição da expressão das mesmas em nível de mRNA, assim como ocorreu com a ciclina A e/ou Bax (Parte. 2). Por outro lado, o aumento no número das células T CD8+CD69+ (ativadas), observado pelo tratamento de esplenócitos com EFXs (Parte. 3), também alerta para um potencial desta planta como agente antineoplásico, representando um possível mecanismo de ação antitumoral *in vivo* para o extrato, somado ao efeito antileucêmico *in vitro* já demonstrado (Parte. 2). Estudos têm relacionado maiores taxas de cura do câncer com o aumento destas células em pacientes tratados.

É importante destacar que o estresse oxidativo desempenha função crucial na fisiopatologia das doenças inflamatórias crônicas e do câncer, que o EFXs apresentou tanto a atividade antioxidante (Parte. 1), como imunoreguladora (Parte. 3) e antileucêmica *in vitro* (Parte. 2), embora em intensidades diferentes, e que tais atividades têm sido descritas para os constituintes majoritários do EFXs, os derivados de apigenina, sugerindo que tais moléculas estejam relacionadas com os efeitos observados. Entretanto, também existe a possibilidade destes efeitos biológicos do EFXs e sua frações resultarem de ação sinérgica entre os constituintes majoritários e minoritários de cada uma delas.

A alimentação saudável tem se tornado cada vez um importante mecanismo na manutenção da saúde e longevidade. A FAO, órgão das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, estimula estudos com hortaliças não convencionais, como a taioba, e este trabalho vêm destacar, pela primeira vez, características medicinais e fitoquímicas desta planta, que é de cultivo muito fácil e muito pouco estudada. A reunião das propriedades nutricionais da taioba juntamente com seus potenciais efeitos farmacológicos aqui demonstrados contribuem para classificar mais esta espécie da família Araceae como um alimento funcional e estimular a continuidade dos estudos com o EFXs e suas frações, alertando para a possibilidade de desenvolvimento de novos nutracêuticos.

5.6 Conclusões

- O EFXs inibiu a produção *in vitro* de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7
- O fracionamento do EFXs potencializou o efeito inibidor sobre a produção deste mediador da resposta inflamatória nas frações apolares (FDCM e FHEX);
- O EFXs e as frações apolares da planta reduziram a produção *in vitro* de IL-10, IL-1 β e TNF- α ;
- A presença majoritária de ácido palmítico e do palmitato de etila nestas frações indica que tais constituintes podem estar contribuindo para a redução dos níveis de NO, IL-10, TNF- α e IL-1 β ;
- O EFXs foi capaz de aumentar o percentual de linfócitos T citotóxicos (CD8+) totais e seu nível de ativação.
- O extrato bruto e as frações da planta apresentaram baixa toxicidade quando avaliados *in vitro* em linfócitos e macrófagos;
- Os efeitos apresentados pelos EFXs e suas frações apolares sugerem potencial ação reguladora da resposta imunoinflamatória.

6. Considerações gerais

Resultados positivos de pesquisas com plantas medicinais e alimentos na manutenção ou recuperação da saúde levaram à aceitação generalizada dos termos “alimentos funcionais” e “nutracêuticos”. Os alimentos funcionais apresentam, além do valor nutricional, constituintes bioativos benéficos à saúde e prevenção de doenças e os nutracêuticos são suplementos alimentares resultantes do processamento do alimento, concentrando ou isolando agentes bioativos, também usados para melhorar a saúde. No Brasil, a espécie *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) é utilizada como uma hortaliça não convencional. Seguindo pesquisas bibliográficas e evidências quimiotaxonômicas, supomos que a folha da taioba, além do valor nutricional, apresentasse também propriedades medicinais. Desta forma, demos início às pesquisas com extratos hidroetanólicos (70%) das folhas da planta, e após verificação de que o extrato das folhas (EFXs) apresentava substâncias bioativas, optamos pelo fracionamento do mesmo por partição líquido-líquido, obtendo-se as frações FHEX, FDCM, FAcET e FAq. Foram realizados, então, estudos do potencial antioxidante, antitumoral e imunoregulador *in vitro* com todas as amostras, com o objetivo de buscar amostras mais ativas e os constituintes majoritários das mesmas.

O EFXs foi considerado como a amostra mais ativa quanto ao efeito antioxidante, desde que foi o único a reduzir os níveis intracelulares de ROS, além de neutralizar de forma significativa o radical DPPH, como fez a FacET (Parte. 1). Por outro lado, a redução da peroxidação lipídica também foi demonstrada para a FacET e FAq, além do EFXs. Estudos fitoquímicos do EFXs, FacET e FAq mostraram a presença majoritária de flavonoides do tipo flavonas, em especial os diglicosídeos de apigenina, os quais devem ter relação direta com os efeitos antioxidantes observados, segundo dados da literatura (Parte. 1), porém a não potencialização dos efeitos antioxidantes pelas frações demonstrou que o fracionamento do EFXs não otimizou este efeito (Parte. 1). Sabendo-se que o estresse oxidativo e a inflamação crônica predispõe os indivíduos a vários tipos de câncer, e que o EFXs e as frações polares são enriquecidos em flavonoides, pode-se sugerir que o EFXs e essas frações possuem grande potencial como agentes quimiopreventivos, uma vez que há correlação positiva entre dieta rica em flavonoides e menor risco de desenvolvimento de inflamação crônica e câncer.

A importância do estudo da ação antitumoral *in vitro* de produtos naturais está baseada no fato do câncer ser um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, e de que muitos tipos de câncer podem ser evitados através da alimentação equilibrada e da prática de exercícios. Prevenção é a melhor maneira e a mais econômica para combater a doença. Neste trabalho, apenas o EFXs e suas frações apolares (FHEX e a FDCM) apresentaram ação

antileucêmica *in vitro* em células Jurkat (Parte. 2), e merece destaque o aumento desta ação pela FDCM, em relação ao extrato bruto, mostrando potencialização do efeito com o fracionamento, concentrando ácidos graxos nas frações apolares. Em paralelo ao efeito aumentado com a FDCM, observa-se um enriquecimento do ácido palmítico (AP) nesta fração, em relação à FHEX (Parte 2). Curiosamente, a FDCM também foi a que mostrou mecanismos de ação diferenciados do EFXs e FHEX, em relação à expressão de ciclina A e proteína Bax (Parte. 2), além de apresentar concentrações maiores de compostos fenólicos e flavonoides, em relação às essas mesmas amostras (Parte. 1). Estes resultados podem sugerir que a atividade antileucêmica mais intensa da FCDM resulte do somatório da ação tanto do AP (Parte, 2), como de flavonoides (Parte.1), diferente da FHEX, que mostrou níveis de flavonoides (Parte. 1) mais baixos que a FDCM, semelhantes aos do EFXs (Parte. 1). Já a ação antileucêmica do EFXs deve resultar primariamente da ação dos seus constituintes majoritários, as flavonas derivadas de apigenina.

Nossos resultados sugerem que a taioba possui mecanismos de ação antioxidante diferentes, desde que a neutralização de DPPH, inibição da peroxidação lipídica e/ou quelação de ferro, observada com o EFXs e/ou frações polares, depende em grande parte da ação direta de moléculas de baixo peso molecular (flavonoides) presentes majoritariamente nestas amostras (Parte. 1). Entretanto, a ação inibidora sobre a produção de NO pelas frações apolares (Parte. 3), deve estar relacionada com a ação do ácido palmítico e seu éster sobre a regulação da expressão e/ou atividade da iNOS. O NO representa uma espécie ativa do nitrogênio e pode reagir com o superóxido, resultando na produção de peroxinitrito, um agente oxidante mais poderoso ainda. A sugestão de que as amostras apolares FHEX e FDCM possam atuar em nível de redução do mRNA da iNOS se baseia na capacidade demonstrada destas amostras em regular os níveis de mRNA de ciclina A e/ou Bax (Parte 2). Também não pode ser descartada a possibilidade da redução da atividade da iNOS, desde que esta enzima depende da palmitoilação/despalmitoilação para sua atividade. Dados da literatura mostram que a concentração de ácido palmítico interfere na palmitoilação de proteínas e as amostras FHEX e FDCM são enriquecidas em ácido palmítico (Parte. 2). Independente do mecanismo de ação, a inibição da produção de NO (Parte. 3) e redução da peroxidação lipídica (Parte. 1) pelo EFXs e frações apolares também representam potenciais mecanismos de inibição de tumorigênese.

Embora as frações apolares não tenha mostrado atividade antioxidante importante em várias técnicas utilizadas, todas as frações, polares e apolares, além do EFXs, apresentaram atividade quelante de ferro (Parte. 1). Esta atividade representa uma importante ação inibidora do estresse oxidativo, por inibir a reação de Fenton (Parte. 1), reduzindo os danos celulares e evitando, assim, a inflamação crônica e/ou desenvolvimento do câncer. Por outro lado, a

quelação do ferro também participa da ação antileucêmica, observada com o EFXs e frações apolares (Parte. 2), através da propriedade de não deixar o ferro ferroso disponível para a enzima ribonucleotídeo redutase (RR) sintetizar o DNA (enzima dependente de ferro), impedindo a progressão do ciclo celular e a proliferação das células leucêmicas. É importante destacar que o tratamento com o EFXs e todas as suas frações não mostrou toxicidade para as células não tumorais testadas.

Quanto às citocinas IL-1, TNF- α e IL-10, embora neste trabalho estas tenham sido avaliadas quanto à sua concentração no sobrenadante de cultura (Parte. 3), as reduções observadas após tratamento com o EFXs, FDCM e FHEX também podem resultar de inibição da expressão das mesmas em nível de mRNA, assim como ocorreu com a ciclina A e/ou Bax (Parte. 2). Por outro lado, o aumento no número das células T CD8+CD69+ (ativadas), observado pelo tratamento de esplenócitos com EFXs (Parte. 3), também alerta para um potencial desta planta como agente antineoplásico, representando um possível mecanismo de ação antitumoral *in vivo* para o extrato, somado ao efeito antileucêmico *in vitro* já demonstrado (Parte. 2). Estudos têm relacionado maiores taxas de cura do câncer com o aumento destas células em pacientes tratados.

É importante destacar que o estresse oxidativo desempenha função crucial na fisiopatologia das doenças inflamatórias crônicas e do câncer, que o EFXs apresentou tanto a atividade antioxidante (Parte. 1), como imunoreguladora (Parte. 3) e antileucêmica *in vitro* (Parte. 2), embora em intensidades diferentes, e que tais atividades têm sido descritas para os constituintes majoritários do EFXs, os derivados de apigenina, sugerindo que tais moléculas estejam relacionadas com os efeitos observados. Entretanto, também existe a possibilidade destes efeitos biológicos do EFXs e sua frações resultarem de ação sinérgica entre os constituintes majoritários e minoritários de cada uma delas.

A alimentação saudável tem se tornado cada vez um importante mecanismo na manutenção da saúde e longevidade. A FAO, órgão das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, estimula estudos com hortaliças não convencionais, como a taioba, e este trabalho vêm destacar, pela primeira vez, características medicinais e fitoquímicas desta planta, que é de cultivo muito fácil e muito pouco estudada. A reunião das propriedades nutricionais da taioba juntamente com seus potenciais efeitos farmacológicos aqui demonstrados contribuem para classificar mais esta espécie da família Araceae como um alimento funcional e estimular a continuidade dos estudos com o EFXs e suas frações, alertando para a possibilidade de desenvolvimento de novos nutracêuticos.

Tabela 8- Atividades antioxidante, antileucêmica e imunomoduladora de extratos e frações de *X. Sagittifolium*.

Atividade biológica	Atividade verificada nos Extrato ou frações.
Capacidade de neutralização do radical DPPH.	Extrato bruto Fração acetato
Capacidade quelante de íons ferrosos.	Todas as frações Curva com o Extrato bruto
Inibição da peroxidação lipídica.	Extrato bruto
Redução da concentração intracelular de espécies ativas do oxigênio.	Extrato bruto Fração aquosa Fração acetato
Quantificação de substâncias fenólicas totais.	Fração aquosa Fração acetato
Comparação do teor de flavonoides com a quercetina.	Fração dicloro
Análise fitoquímica.	Presença majoritária de compostos fenólicos do tipo flavonas no Extrato bruto, fração acetato e aquosa.
Efeito citotóxico dos extratos de rizoma e de folhas de <i>X. sagittifolium</i> em linhagens celulares leucêmicas.	Extrato bruto e curva 100µg/mL Rizoma sem efeito
Efeito de diferentes concentrações do ERXs e do EFXs em linhagens celulares leucêmicas.	Extrato bruto e curva 100µg/mL
Efeito das frações FHEX e FDCM na citotoxicidade sobre linhagens celulares leucêmicas.	Extrato bruto Fração hexano Fração dicloro
Efeito da concentração do EFXs, FHex e FDCM na citotoxicidade sobre linhagens celulares de tumores sólidos.	Sem efeito nas amostras e concentrações testadas
Efeito de <i>X. sagittifolium</i> na proliferação das células leucêmicas Jurkat.	Extrato bruto Fração hexano Fração dicloro
Efeito do EFXs sobre o ciclo celular da linhagem celular Jurkat.	Extrato bruto redução da fase S e redução da fase G2/M
Comparação do efeito do EFXs com o das frações apolares sobre o ciclo celular da linhagem celular Jurkat.	Extrato bruto e frações polares. Aumento da subG1 e redução da fase S e G2/M

Análise da FDCM em GC-MS.	Presença de ácido palmítico e palmitato de etila citotóxicos contra linhagem leucêmica jurkat.
Efeito citotóxico do EFXs, frações, ácido palmítico e palmitato de etila em linhagem celular não tumoral (fibroblastos NIH-373).	Sem efeito em células não tumorais
Efeito na expressão da ciclina A em células Jurkat, por PCR em tempo real.	Fração hexânica e ácido palmítico diminuíram a expressão enquanto a fração dicloro aumentou a expressão.
Efeito na expressão da p21 em células Jurkat, por citometria de fluxo.	Extrato bruto fração hexano e fração dicloro diminuíram a expressão e ácido palmítico aumentaram a expressão.
Efeito na expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células Jurkat, por PCR em tempo real.	Fração dicloro diminuiu a expressão da proteína.
Efeito da concentração do EFXs sobre a Produção de NO e viabilidade de células RAW 264.7	Extrato bruto e frações apolares diminuem a produção de NO.
Efeito do ácido palmítico (AP) e palmitato de etila (PE) na produção de NO e viabilidade de células RAW 264.7.	Ácido palmítico e palmitato diminuíram a produção de NO.
Efeito do EFXs e frações apolares sobre a produção in vitro de IL-10 por macrófagos RAW 264.7.	Redução nos tratamentos com extrato bruto e frações apolares.
Efeito do EFXs e frações apolares sobre a produção in vitro de IL-1β e TNF-α.	Redução nos tratamentos com extrato bruto e frações apolares além do ácido palmítico.
Efeito do EFXs sobre a viabilidade de linfócitos de camundongos saudios.	Sem efeito.
Efeito do EFXs e frações apolares FDCM e FHEX sobre a viabilidade de linfócitos de camundongos saudios.	Sem efeito.
Efeito da concentração do ácido palmítico e palmitato de etila sobre a viabilidade de linfócitos de camundongos saudios.	Ácido palmítico diminuiu a viabilidade
Efeito do EFXs em diferentes populações de linfócitos.	Aumento CD 8+ CD 69+

CONCLUSÕES

- ✓ O EFXs apresentou tanto a ação antioxidante, como antileucêmica e também imunoreguladora, embora em níveis diferenciados;
- ✓ O fracionamento do EFXs não potencializou a atividade antioxidante;
- ✓ O fracionamento do EFXs potencializou o efeito antileucêmico e algumas ações imunoreguladoras na FDCM, como inibição da produção de NO e IL-1;
- ✓ O EFXs e suas frações não mostraram citotoxicidade para células não tumorais;
- ✓ As amostras mais ativas quanto à ação antioxidante apresentaram enriquecimento em flavonoides do tipo flavonas, enquanto as amostras mais ativas quanto à atividade antileucêmica e imunoreguladora mostraram ácidos graxos como compostos majoritários, em especial o ácido palmítico.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; H. & POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 560, 37–45, 2012.
- ABU-REIDAH I.M.; ALI-SHTAYEH M.S.; JAMOUS R.M.; ARRÁEZ-ROMÁN D.; SEGURA-CARRETERO A. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Research International**. 70, 74–86, 2015.
- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. Inflammation and cancer : How hot is the link ? **Biochemical Pharmacology**. 72, 1605–1621, 2006.
- AHN, C.B.; JE, J.Y. Anti-inflammatory activity of the oriental herb medicine, *Arisaema cum bile*, in LPS-induced PMA differentiated THP-1 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. 34, 379–384, 2012.
- AJEWOLE, I.A.; OZO, O.N.; OKOLI, E. Food gels from Pregelatinized Cocoyam (*Xanthosoma species*) flours: a comparative study. **Discovery and Innovation**. 12, 44–46, 2000.
- AKISUE, G.; OLIVEIRA, F. **Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5th edition, Garland Science, 2008.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etno-dirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16, 678–689, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. 114, 325–354, 2007.
- ALIYU, M.; IBRAHIM, S.; INUWA, H. M.; SALLAU, A.B.; ABBAS, O.; AIMOLA, I.A.; UCHE, N.S. Ameliorative effects of *Acacia Honey* against sodium arsenite-induced oxidative stress in some viscera of Male Wistar Albino Rats. **Biochemistry Research International**. 2013:ID 502438, 2013.
- ALLEN, R.G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**. 28, 463–499, 2000.
- ALMEIDA, M.E.F.; JUNQUEIRA, A.M.B.; SIMÃO, A.A.; CORRÊA, A.D. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**. 30 (SUPPL). 1, 431–439, 2014.
- ALVES, L.A. Ação antifúngica da Tintura de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre *Candida albicans*. 80 folhas. **Monografia (graduação odontologia)**. Universidade Federal da Paraíba-UEPB, 2011.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Apoptosis Cell Death: Biochemistry And Molecular Aspects. **Metrocamp Pesquisa**, 1, 37–58, 2007.

ANDRADE, L.N.D.S.; DE LIMA, T.M.; CURI, R.; CASTRUCCI, A.M.D.L. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. **Toxicology in vitro**. 19, 553–560, 2005.

ANEL, J.N.; GONZALEZ, B.; TORRES, J.M.; MISHAL, Z.; URIEL, J.; PINEIRO, A. Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time course changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1044, 323–331, 1990.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**. 66, 01–09, 2007.

ANSIL, P.N.; NITHA, A.; PRABHA, S.P.; WILLS, P.J.; JAZAIRA, V.; LATHA, M.S. Protective effect of *Amorphophallus campanulatus* (Roxb.) Blume. tuber against thioacetamide induced oxidative stress in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4, 870–877, 2011.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 161, 105–121, 2009.

ARANGO, D.; DIOSA-TORO, M.; ROJAS-HERNANDEZ, L. S.; COOPERSTONE, J.L.; SCHWARTZ, S.J.; MO, X.; DOSEFF, A.I. Dietary apigenin reduces LPS-induced expression of miR-155 restoring immune balance during inflammation. **Molecular Nutrition & Food Research**. 59, 763–772, 2015.

ARMUTCU, F.; AKYOL, S.; USTUNSOY, S.; TURAN, F.; Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. 5, 1582–1588, 2015.

ARRUDA, S.F.; SOUZA, E.M.T.; SIQUEIRA, E.M.A. Carotenoids from Malanga (*Xanthosoma Sagittifolium*) Leaves Protect Cells Against Oxidative Stress in Rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**. 75, 161–168, 2005.

ARRUDA, S.F.; SIQUEIRA, E.M.A.; ELIZABETH, M.T.; SOUZA, E.M.T. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and Purslane (*Portulaca oleracea*) Leaves Reduce Oxidative Stress in Vitamin A-Deficient Rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**. 48, 288–295, 2004.

ARYA, R.; WHITE, K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 39, 12–19, 2015.

AYDIN, H. H.; CELIK, H. A.; DEVECI, R.; KARACALI, S.; SAYDAM, G.; BEDII OMA, S.; BATUR, Y. Induction of apoptosis by fatty acid ethyl esters in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**. 43, 139–145, 2005.

BABA, S.A.; MALIK, S.A. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. **Journal of Taibah University for Science**. 9, 1–6, 2014.

BAINS, S.J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; NIJJAR, K.K.; AGREWALA, J.N.; KUMAR, V.; SAXENA, A.K. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1723, 163–174, 2005.

BARBOSA, J.S. Flavonoides de *Barbacenia blanchetii* (Velloziaceae) e Avaliação do efeito inibitório sobre butiril colinesterase. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.** Feira de Santana. Bahia. 70 páginas, 2012.

BARCELLOS-DE-SOUZA, P.; GORI, V.; BAMBI, F.; CHIARUGI, P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.** 1836, 321–335, 2013.

BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P.M. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. **Current Drug Metabolism.** 10, 247–255, 2009.

BARREIRO, L.J.; BOLZANI, A.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova.** 32, 679–688, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID J.M. Estresse oxidativo: Relação entre Geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova.** 29, 113–123, 2006.

BASTOS, K.R.B.; BARBOZA, R.; SARDINHA, L.; RUSSO, M.; ALVAREZ, J.M.; LIMA, M.R.D. Role of endogenous IFN- γ in macrophage programming induced by IL-2 and IL-18. **Journal of Interferon & Cytokine Research.** 27, 399–410, 2007.

BÄUMER, N.; BÄUMER, S.; HAAK, M.; KOSCHMIEDER, S.; SCHÖNIG, K.; BERDEL, W.E.; MÜLLER-TIDOW, C. A limited role for the cell cycle regulator cyclin A1 in murine leukemogenesis. **PLOS ONE.** 10(6), 0129147, 2015.

BECKER, K.; SCHROECKSNADEL, S.; GOSTNER, J.; ZAKNUN, C.; SCHENNACH, H.; ÜBERALL, F.; FUCHS, D. Comparison of *in vitro* tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. **Phytomedicine.** 21, 164–171, 2014.

BEN, P.; LIU, J.; LU, C.; XU, Y.; XIN, Y.; FU, J.; HUANG, H.; ZHANG, Z.; GAO, Y.; LUO, L.; YIN, Z. Curcumin promotes degradation of inducible nitric oxide synthase and suppresses its enzyme activity in RAW 264.7 cells. **International Immunopharmacology.** 11, 179–186, 2011.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; GEOFFREY, S. **Imunologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 4-7 e 113–115, 2002.

BERTO, A.; RIBEIRO, A.B.; SOUZA, N.E.; FERNANDES, E., CHISTÉ, R.C. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. **Food Research International.** 77, 236–243, 2015.

BESBES, S.; MIRSHAHI, M.; POCARD, M.; BILLARD, C. Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia. **Blood Reviews.** 29, 345-350, 2015.

BHATIA, ARUNA.; KAUR, GURPREET.; SEKHON, H. Anticancerous Efficacy of Betulinic acid: An Immunomodulatory Phytochemical. **Journal of PharmaScience and Technology.** 4, 39-46, 2015.

Biblioteca virtual em Saúde. http://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html. Data de acesso: 10-2-2014.

BLASKOVIC, S.; BLANC, M.; VAN DER GOOT, F.G. What does S-palmitoylation do to membrane proteins? **The FEBS journal**. 280, 2766–2774, 2013.

BONILLA, J.; VARGAS, F.C.; OLIVEIRA, T.G.; APARECIDA MAKISHI, G.L.; DO AMARAL SOBRAL, P.J. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. **Current Opinion in Food Science**. 5, 1–7, 2015.

BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; TOMMASI, N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**. 51, 6689–6695, 2003.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology, Chichester**. 214 (2), 149–160, 2008

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, 2007.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Manual de hortaliças não-convencionais / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS, 92 p. 2010.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Hortaliças não-convencionais : (tradicional) / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: MAPA/ ACS, 52 p. 2010b.

BRASILEIRO, F.; BOGLIOLO, G. **Patologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 190–197, 2009.

BRETONES, G.; DELGADO, M.D.; LEÓN, J. Myc and cell cycle control. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1849, 506–516, 2014.

BRITO, F.; PEDREIRA, R.R.; FISCHER, R.G.; FIGUEREDO, C.M.S. Inter-relação entre a doença periodontal e a doença de Crohn. **Revista Ciências Médicas**. 5, 261–267, 2006.

BROWN, A.C.; REITZENSTEIN, J.E.; LIU, J.; JADUS, M.R. The anti-cancer effects of poi (*Colocasia esculenta*) on colonic adenocarcinoma cells *in vitro*. **Phytotherapy Research**. 19, 767–771, 2005.

CAHOON, F.B.; SCHMID, K.M. Metabolic engineering of the content and fatty acid composition of vegetable oils. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. V1, Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.

CAI, P.; KAPHALIA, B.S.; ANSARI, G.A.S. Methyl palmitate: inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells. **Toxicology**. 210, 197–204, 2005.

CAMILI, E.C.; AZEVEDO, C.C.B.V.D.; BOCUTI, E.D.; SILVÉRIO, J.D.M.; BARROS, K.D.C.; SILVA, A.R.B.; SEABRA JÚNIOR, S. Cultivo consorciado de alface sob diferentes arranjos espaciais e manejo do dossel de taioba. **Agrarian**. 6, 110–120, 2013.

CAMPBELL, D.J. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. **The Journal of Immunology**. 195(6), 2507–2513, 2015.

CARLOS, I.Z.; LOPES, F.C.M.; BENZATTI, F.P.; CARLI, C.B.A.; MARQUES, M.F.; JORDÃO, C.M. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15, 44–50, 2005.

CARVALHO, E.F.; CORDEIRO, J.A.D. Um método alternativo e eficiente de propagação vegetativa de inhame (*Colocasia esculenta*) e taioba (*Xanthosoma sagittifolium*). **Acta Amazônica**. 20, 11–18, 1990.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. **Farmacognosia: Da Planta Ao Medicamento**. 5. ed. Rio Grande do Sul: Editora UFRGS/ Editora da UFSC, 519–535, 2004.

CARVALHO, P.G.B.; MACHADO, C.M.M.; MORETTI, C.L.; FONSECA, M.E.D.N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**. 24, 397–404, 2006.

CAVALCANTI, T.F.M.; COSTA, C.A.; BRANDÃO, A.A.; ALVES, C.C.; MARTINS, E.R. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis= Chemical characterization of the non-conventional vegetable known as ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**. 30(3). 2014.

CHALHUB, R.A.; QUARANTINI, L.D.C. Fisiopatologia imunoinflamatória do delirium: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. 10, 326–328, 2011.

CHEN, A.; HUANG, X.; XUE, Z.; CAO, D.; HUANG, K.; CHEN, J.; GAO, Y. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. **Medical Science Monitor Basic Research**. 21, 86–95, 2015.

CHEN, J.; BENNY, R.J. Aroids are Important Medicinal Plants. **Mid-Florida Research and Education Center**. 2007.

CHEW, Y.L.; CHAN, E.W.L.; TAN, P.L.; LIM, Y.Y.; STANSLAS, J.; GOH, J.K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. (11:12), 2011.

CHIRINOS, R.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; HUAMÁN, A.; ARBIZU, C.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. **Food Chemistry**. 113, 1243–1251, 2009.

CHOI, E.Y.; JIN, J.Y.; CHOI, J. I.; CHOI, I. S.; KIM, S.J. Effects of luteolin on the release of nitric oxide and interleukin-6 by macrophages stimulated with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*. **Journal of Periodontology**. 82, 1509–517, 2011.

CHUANG, C.M.; MONIE, A.; WU, A.; HUNG, C.F. Combination of apigenin treatment with therapeutic HPV DNA vaccination generates enhanced therapeutic antitumor effects. **J Biomedical Science**. (16:49), 2009.

CHUNXIA, C.; PENG, Z.; HUIFANG, P.; HANLI, R.; ZEHUA, H.; JIZHOU, W. Extracts of *Arisaema rhizomatum* C.E.C. Fischer attenuate inflammatory response on collagen-induced arthritis in BALB/c mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 133, 573–582, 2011.

CLARK, B.R.; SWZUKI, J.Y.; BLISS, B.J.; BORRIS, R.P. Flavone C-glycosides from *Anthurium andraeanum*. **Natural Products Communication**. 7, 747–748, 2012.

COELHO, M.A.N. A família Araceae na Reserva Natural Vale, Linhares, **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**. 28, 41–87, 2010.

COLLA, L.M.; MORAES F.P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios á saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 3, 109–122, 2006.

CONTI, P.; KEMPURAJ, D.; KANDERE, K.; DI GIOACCHINO, M.; BARBACANE, R.C.; CASTELLANI, M.L. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. **Immunology Letters**. 86, 123–129, 2003.

COSTA, M.T.; FABENI, R.D.C.; APTEKMANN, K.P. & MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**. 33, 967–974, 2003.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; SOCORRO, V.F. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer : Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, **Revista Virtual De Química**. 2, 47–58, 2010.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 8. th. **WB Saunders International**. Chapters 1-2-4-6 e 8, 2012.

CRUVINEL, W.D.M.; JÚNIOR, D.M.; ANTÔNIO, J.; ARAÚJO, P.; TIEKO, T.; CATELAN, T. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 50, 434–461, 2010.

CuboCube - Cancer Genetics Ebook. www.cubocube.com/dashboard.php?c. Acesso 15 de dezembro de 2014

CURY-BOAVENTURA, M.F.; KANUNFRE, C.C.; GORJÃO, R.; LIMA, T.M.; CURI, R. Mechanisms involved in Jurkat cell death induced by oleic and linoleic acids. **Clinical Nutrition** 25, 1004–1014, 2006.

DANDAN, W.; JIAN, W.; XUEHUI, H.; YING, T.; UNYIA, N. Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 44, 63–69, 2007.

DAS, U.; KUMAR, S.; DIMMOCK, J.R.; SHARMA, R.K. Inhibition of protein N-myristoylation: a therapeutic protocol in developing anticancer agents. **Current Cancer Drug Targets**. 12, 667–692, 2012.

DAVIS, A.S.; VIERA, A.J.; MEAD, M.D. Leukemia: An overview for primary care. **American Family Physician**. 89, 731–738, 2014.

DE BOER, A.A.; MONK, J.M.; ROBINSON, L.E. Docosahexaenoic acid decreases pro-inflammatory mediators in an in vitro murine adipocyte macrophage co-culture model. **PLOS ONE**. 9, e85037, 2014.

DE PABLO, M.A.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunology and Cell Biology**. 78, 31–39, 2000.

DEBATIN, K.M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. **Toxicology Letters**. 112, 41–48, 2000.

DEVLIN T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 7. ed. Editora Edgard Blucher, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. Baffins Lane; Chichester; West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, A.C.P.; PINTO, N.A.V.D.; YAMADA, L.T.P.; MENDES, K.L. FERNANDES, A.G. Avaliação Do Consumo De Hortaliças Não Convencionais Pelos Usuários Das Unidades Do Programa Saúde Da Família (Psf) De Diamantina - Mg. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. 16, 279–284, 2009

DIP, E.C.; PEREIRA, N.A.; FERNANDES, P.D. Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by *Dieffenbachia picta* Schott in mice. **Toxicon**. 43, 729–35, 2004.

DONG, X.; XU, W.; SIKES, R A.; WU, C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. **Food chemistry**. 1419, 1923–1933, 2013.

DORES, R.G.R.; GUIMARÃES, S.F.; BRAGA, T.V.; FONSECA, M.C.M.; MARTINS, P.M.; FERREIRA, T.C. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of leaves, flowers and roots of goat weed. **Horticultura Brasileira**. 32, 486–490, 2014.

DOWNWARD, J. Ras signalling and apoptosis. Oncogenes and cell proliferation. **Current Opinion in Genetics & Development**. 8, 49–54, 1998.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 39, 343–350, 2003.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016. In press.

DUTTO, I.; TILLHON, M.; CAZZALINI, O.; STIVALA, L.A.; PROSPERI, E. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. **Archives of Toxicology**. 89,155–178, 2014.

E BOER, A.A.; MONK, J.M.; ROBINSON, L.E. Docosahexaenoic acid decreases pro-inflammatory mediators in an in vitro murine adipocyte macrophage co-culture model. **PLOS ONE**. 9, e85037, 2014.

ESAU, K. **Anatomy of Seed Plants**. New York: John Wiley & Sons, 588p. 1977.

ESSUMANG, D.K.; DODOO, D.K.; OBIRI, S.; YANEY, J.Y. Arsenic, cadmium, and mercury in cocoyam (*Xanthosoma sagittolium*) and water cocoyam (*Colocasia esculenta*) in Tarkwa a mining community. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 79, 377–379, 2007.

FANG, S.; LIN, C.; ZHANG, Q.; WANG, L.; LIN, P.; ZHANG, J.; WANG, X. Anticancer potential of aqueous extract of *Alocasia macrorrhiza* against hepatic cancer in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**. 141, 947–956, 2012.

FANTAPPIE, M. Epigenética e Memória Celular. **Revista Carbono Ciência e Arte**. 3 2013.

- FARID, M. M.; HUSSEIN, S.R.; IBRAHIM, L.F.; EL DESOUKY, M.A.; ELSAYED, A.M.; EL OQLAH, A.A.; SAKER, M.M. Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 5(11), 944–947, 2015.
- FARIDA, Y.; IRPAN, K.; FITHRIANI, L. Antibacterial and Antioxidant Activity of *Keladi tikus* Leaves Extract (*Typhonium flagelliforme*) (Lodd) Blume. **Procedia Chemistry**. 13, 209–213, 2014.
- FELTRAN, J. C. Plantas alimentícias antigas e esquecidas: Taioba, mangarito e taro. Campinas-SP. Informações Tecnológicas. Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio da Horticultura. <http://www.iac.sp.gov.br>. Acesso 23 de janeiro de 2014. 2010.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 43, 61-68, 1997.
- FERREIRA, C.G; ROCHA, J.C.C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Editora Atheneu. 469 p. p. 105-112, 2010.
- FERREIRA, L.S; MARSOLA, F.J; TEIXEIRA, S.P. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Dieffenbachia picta* Schott (Araceae) com ênfase na distribuição de cristais, laticíferos e grãos de amido. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16, 664–670, 2006.
- FERRERES, F.; GONÇALVES, R.F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; SILVA, A. M.; SILVA, J. B.; ANDRADE, P.B. Further knowledge on the phenolic profile of *Colocasia esculenta* (L.) Shott. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60, 7005–7015, 2012.
- FERRO, Degmar. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. 1. ed, São Paulo: Atheneu. p. 223-225, 2008.
- FIANDALO, M.V; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. **Experimental Oncology**. 34, 165–175, 2012.
- FILHO, F.C.S.; PETRÓPOLIS, D.B.; MENEZES, G.C. **Curso cultura de células e fisiologia celular**. Cate. IBCCF. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ, 2005.
- FILHO, R.B. Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. 3, 229–239, 2010.
- FILIPPIN, L.I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N.P.; XAVIER, R.M. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 48, 17–24, 2008.
- FOEY, A.D.; PARRY, S.L.; WILLIAMS, L.M.; FELDMANN, M.; FOXWELL, B.M.; BRENNAN, F.M Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- α : role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. **The Journal of Immunology**. 160, 920–928, 1998.
- FOO, J.B.; YAZAN, L.S.; TOR, Y.S.; WIBOWO, A.; ISMAIL, N.; HOW, C.W.; ABDULLAH, R. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from *Dillenia suffruticosa* root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**. 166, 270–278, 2015.

- FORD, J.H. Saturated fatty acid metabolism is key link between cell division, cancer, and senescence in cellular and whole organism aging. **Age (Dordrecht, Netherlands)**. 32, 231–237, 2010.
- FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 110, 267–279. 2016
- FRENCH, J. Vegetative Anatomy. In: **The genera of Araceae**. MAYO, S. J., BORGNER, J., BOYCE, P. C. **Royal Botanic Gardens**, p. 9–24, 1997.
- FRITSCHKE, K.L. The science of Fatty acids and inflammation. **Advances in Nutrition**. 6, 293S-301S, 2015.
- FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**. 29, 15–21, 2013.
- FULDA, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, 31, 84–88, 2015.
- GAJEWSKI, T.F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature Immunology**. 14, 1012–1022, 2013.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, 19, 107–120, 2012.
- GENESTIER, L.; PAILLOT, R.; QUEMENEUR, L.; IZERADJENE, K.; REVILLARD, J.P. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology**. 47, 247–257, 2000.
- GIACOMINI, G; MENEZES, H. Técnicas e Perspectivas em Imunoterapia do Câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**. 5, 567–578, 2012.
- GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**. 109, 338–347, 2007.
- GOGOS, C.A.; GINOPOULOS, P.; ZOUMBOS, N.C.; APOSTOLIDOU, E.; KALFARENTZOS, F. The effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on T-lymphocyte subsets of patients with solid tumors. **Cancer Detection and Prevention**. 19, 415–417, 1995.
- GONÇALVES, E.G.; PAIVA, E.A.S.; NADRUZ-COELHO, M.A. A preliminary survey of petiolar collenchyma in the Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 91, 474–485, 2014.
- GONÇALVES, E.G. A new pedate-leaved species of *Xanthosoma* Schott (Araceae: tribe Caladieae) with linear leaflets from the Brazilian Pantanal. **Aroideana** 22, 3–6, 1999.
- GONÇALVES, E.G. New Aroid Taxa from Brazil. **Aroideana** 25, 16–35, 2003.
- GONÇALVES, E.G. The commonly cultivated species of *Xanthosoma* Schott (Araceae), including four new species. **Aroideana** 24, 3–23, 2011.

GONÇALVES, E.G. *Xanthosoma riparium* (Araceae), a new species from Goiás, Brazil. **Novon**. 10, 26-28, 2000.

GONÇALVES, E.G.; DIENER, P.S.A.; SOUSA, C.; ALARCAO, G. A preliminary survey of gynoecium morphology in *Xanthosoma* (Araceae). **Aroideana** 27. 182–189, 2004.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 11. ed. Mc Graw-Hill, 2005.

GOSTNER, J.M.; BECKER, K.; FUCHS, D. SUCHER, R. Redox regulation of the immune response. Redox report : **Communications in Free Radical Research**. 18, 88–94, 2013.

GOULART, F.O.M.; VALENTIM, I.B.; OLIVEIRA, A.C.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. 32, 689–702, 2009.

GOVAERTZ, R.; FRODIN, D. World Checklist and Bibliography of Araceae (and (Acoraceae). **Royal Botanical Garden**, Kew. 560p. 2002.

GRAYUM, M.H. Evolution and Phylogeny of the Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 77, 628–697, 1990.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GODOWSKY, J.; SKIPPER, P.L. WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. 126,131–138, 1982.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Immunology**. 145, 4290–4297, 1990.

GREER, J.M.; DENIS, B.; SOBEL, R.A.; TRIFILIEFF, E. Thiopalmitoylation of myelin proteolipid protein epitopes enhances immunogenicity and encephalitogenicity. **Journal of immunology**. 166, 6907–6913, 2001.

GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**. 140, 883–899, 2010.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53, 335–343, 2007.

GUL, M. Z.; AHMAD, F.; KONDAPI, A. K.; QURESHI, I.A.; GHAZI, I.A. Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts-an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13, 53, 2013.

GULATI, O.P.; BERRY OTTAWAY, P. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. **Toxicology**. 221, 75–87, 2006.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, 86, 345–391, 2012.

GÜLÇİN, I.; ELMASTA, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. **Phytotherapy Research**. 21, 354–361, 2007.

GUO, T.; WEI, L.; SUN, J.; HOU, C.; FAN, L. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Massee. **Food Chemistry**. 127, 1634–1640, 2011.

GURSOY, N.; SARIKURKCU, C.; CENGIZ, M.; SOLAK, M.H. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. **Food and Chemical Toxicology**. 47, 2381–2388, 2009.

GUTKIN, D.W.; SHURIN, M.R. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: Time for integration. **Cancer Immunol Immunother**. 63, 45–57. 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition. **Biociences**. p. 81–118, 2010.

HALLIWELL, B.; MURCIA, H. A.; CHIRCO, S.; ARUOMA, O. I. Free radical and antioxidants in food an *in vivo*: What they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 35, 7–20, 1995.

HAN, M.H.; YANG, X.W.; ZHONG, G.Y.; ZHANG, M. Bioactive constituents inhibiting TNF-alpha production in fresh rhizome of *Pinellia ternata*. **China Journal of Chinese Materia Medica**. 32, 1755–1759, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. **Hallmarks of cancer**: Next generation. *Cell*. 144, 646–674, 2011.

HARADA, H.; YAMASHITA, U.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KAMEI, Y.; Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in amarine red alga. **Anticancer Research**. 22, 2587–2590, 2002.

HARIZI, H.; CHAABANE, F.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA L. Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. **Cellular Immunology**. 267, 94–101, 2011.

HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. New generation of natural bioactive compounds as immunostimulators. **Global Journal on Advances Pure and Applied Sciences**. 4, 2014.

HAYASHI, T.; NAKAMURA, T; TAKAOKA, A. Pattern recognition receptors. *Japan. Journal of Clinical Immunology*. 34, 329–345, 2011.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; WOOD, C. D.; CASTRO-OBREGÓN, S., COVARRUBIAS, L. Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free Radical Biology & Medicine**, 49, 130–143, 2010.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em Hematologia**. Artmed. 6. ed. Porto Alegre-Rs, 2013.

HSEU, Y.C.; LEE, C.C.; CHEN, YC.; KUMAR, K.J.S.; CHEN, C.S.; HUANG, Y.C. The anti-tumor activity of *Antrodia salmonea* in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells is mediated via the induction of G₁ cell-cycle arrest and apoptosis in vitro or in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**. 153, 499–510, 2014.

HSU, H.F.; HUANG, K.H.; LU, K.J.; CHIOU, S.J.; YEN, J.H.; CHANG, C.C.; HOUNG, J.Y. *Typhonium blumei* extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Ethnopharmacology**. 135, 492–500, 2011.

HSU, Y.M.; LAI, C.H.; CHANG, C.Y.; FAN, C.T.; CHEN, C.T.; WU, C.H. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 72, 677–685, 2008.

<http://agriculturahumana13.blogspot.com.br/2013/11/taioba.html>. Acesso 20 de dezembro de 2014

http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/images/xan_sp_mid.jpg Acesso 20 de dezembro de 2014

http://www.incaper.es.gov.br/?a=noticias/2008/agosto/noticias_28_08_2008_2. Acesso 20 de dezembro de 2014

IBARGUREN, M.; LÓPEZ, D.J.; ESCRIBÁ, P.V. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. 1838, 1518–1528, 2014.

INCA-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). ABC do Câncer abordagens básicas para o controle do câncer. 2ª edição revista e atualizada Rio de Janeiro, RJ. 2014.

IRWIN, S.V.; KAUFUSI, P.; BANKS, K.; DE LA PENA, R.; CHO, J.J. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. **Euphytica**. 99, 183–189, 1998..

JACKIX, E.; MONTEIRO, E.B.; RAPOSO, H.F.; VANZELA, E.C.; AMAYA-FARFÁN, J. Taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves: nutrient composition and physiological effects on healthy rats. **Journal of Food Science**. 78, H1929–H1934, 2013.

JADIDI-NIARAGH, F.; GHALAMFARSA, G.; YOUSEFI, M.; TABRIZI, M.H., SHOKRI, F. Regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: implication for immunotherapeutic interventions. **Tumor Biology**. 34, 2031–2039, 2013.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**. 9, 515–540, 1990.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://www.jbrj.gov.br/saibamais/araceas/frutosesementes.htm>. Acesso 20 de fevereiro de 2014.

JAZIRI, K. S.; NEFFATI, A.; LIMEM, I.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; SGHAIR, M. B.; FRANCA, M.G.D. Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of *Cyperus rotundus* products towards K562 erythroleukemia cells. **Chemico-biological Interactions**. 181, 85–94, 2009.

JI, X.; HUANG, B.; WANG, G.; ZHANG, C. The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological profile of the genus *Pinellia*. **Fitoterapia**, 93C, 1–17, 2014.

JOHANSEN, D.A. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill, Book Co. Inc; 523 p., 1940.

JOHN, C.M.; SANDRASAIGARAN, P.; TONG, C.K.; ADAM, A.; RAMASAMY, R. Immunomodulatory activity of polyphenols derived from *Cassia auriculata* flowers in aged rats. **Cellular Immunology**. 271, 474–479, 2011.

JOHNSTON, GRAHAM, A.R. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Neurochemistry International**. 89, 120–125, 2015.

JR, R.C.; GOLDSTEIN, S.; GIRALT, S.; LEVINE, J.; PORTER, D.; DROBYSKI, W.; PARKER, P. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. **Bone marrow transplantation**. 26, 511–516, 2000.

JUDY, O.; JENNI, P.; SHARON, S.; Kuby Immunology. Seventh Edition. W. H. Freeman & Company, 574 páginas. 2012.

JUNG, E.B.; LEE, C.S. Baicalein attenuates proteasome inhibition-induced apoptosis by suppressing the activation of the mitochondrial pathway and the caspase-8- and Bid-dependent pathways. **European Journal of Pharmacology**. 730, 116–24, 2014.

JUNIOR, J.F. Fluidez de Membrana: possivelmente o ponto mais fraco das células malignas. <http://www.medicinacomplementar.com.br/temaMai04.asp>. Acesso 28 de fevereiro de 2014, 2004.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan. p. 293–301, 2000.

KAEWSEEJAN, N.; SIRIAMORNUN, S.; NGO, D.N.; KIM, M.M.; KIM, S.K. Protective effects of aminoethyl-chitoooligosaccharides against oxidative stress in mouse macrophage RAW 264.7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. 50, 624–631, 2012.

KAEWSEEJAN, N.; SIRIAMORNUN, S. Bioactive components and properties of ethanolic extract and its fractions from *Gynura procumbens* leaves. **Industrial Crops & Products**. 74, 271–278, 2015.

KANT, S.; KUMAR, A.; SINGH, S.M. Fatty acid synthase inhibitor orlistat induces apoptosis In: T cell lymphoma: role of cell survival regulatory molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1820, 1764–1773, 2012.

KARIMI, E.; OSKOUEIAN, E.; HENDRA, R.; OSKOUEIAN, A.; JAAFAR, H.Z. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. **Molecules**. 17, 1203–1218, 2012.

KAUR, A.; KAUR, D.; ARORA, S. Evaluation of antioxidant and antimutagenic potential of *Justicia adhatoda* leaves extract. **African Journal of Biotechnology**. 14, 1807–1819, 2015.

KAUR, S.; SINGH, G.; KAUR, K. Cancer stem cells: An insight and future perspective. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. 10, 846–852, 2014.

KEATING, R.C. **Anatomy of the monocotyledons IX**. Acoraceae and Araceae. Clarendon Press, Oxford, 2002.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews**. Drug discovery, 10, 221–237, 2011.

KERNER, J.; MINKLER, P.; LESNEFSKY, E.; HOPPEL, C. Fatty acid chain elongation in palmitate-perfused working rat heart: mitochondrial acetyl-CoA is the source of two-carbon units for chain elongation (758.2). **The Journal of Biological Chemistry**, 286, 10223–10234, 2014.

KEW, S.; BANERJEE, T.; MINIHADE, A.M.; FINNEGAN, Y.E.; WILLIAMS, C.M.; CALDER, P.C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear

cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 77(5), 1278–1286, 2003.

KILANI-JAZIRI, S.; NEFFATI, A.; LIMEM, I.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; SGHAIR, M.; CHEKIR-GHEDIRA, B.L. Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of *Cyperus rotundus* products towards K562 erythroleukemia cells. **Chemico-biological Interactions**. 181, 85–94, 2009.

KIM, H.; MOON J.Y.; MOSADDIK, A.; CHO, S.K Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 2435–2442, 2010.

KIM, J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Polyphenols Suppress and Modulate Inflammation: Possible Roles in Health and Disease. Polyphenols in Human Health and Disease. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p. 393–408, 2014.

KIM, K.H.; MOON, E.; CHOI, S.U.; KIM, S.Y.; LEE, K.R. Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**. 92, 113–121, 2013.

KIM, O.K.; MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; OHIGASHI, H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. **Cancer Letters**. 125, 199–207, 1998.

KIM, Y.S.; SAYERS, T.J.; COLBURN, N.H.; MILNER, J.A.; YOUNG, H.A. Impact of dietary components on NK and Treg cell function for cancer prevention. **Molecular Carcinogenesis**, 54, 669–678, 2015.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 704 p. 2008.

KORYCKA, J.; ŁACH, A.; HEGER, E.; BOGUSŁAWSKA, D.M.; WOLNY, M.; TOPORKIEWICZ, M.; SIKORSKI, A. F. Human DHHC proteins: a spotlight on the hidden player of palmitoylation. **European Journal of Cell Biology**. 91, 107–117, 2012.

KOU, X.; KIRBERGER, M.; YANG, Y.; CHEN, N. Natural products for cancer prevention associated with Nrf2–ARE pathway. **Food Science and Human Wellness**. 2, 22–28, 2013.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Morfologia Vegetal**. Seropédica, Rio de Janeiro: EDUR, 198 p. 1997.

KROEMER, G; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**. 12, 1463–1467, 2005.

KUHAJDA, F. P.; JENNER, K.; WOOD, F.D.; HENNIGAR, R.A.; JACOBS, L.B.; DICK, J.D., PASTERNAK, G.R. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 91, 6379–6383, 1994.

KUMAR, A.; BACHHAWAT, A.K. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. **Current Science**. 102, 288–297, 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, 162750: 2013.

KUNDU, J.; CHUN, K.S.; ARUOMA, O.I.; KUNDU, J.K. Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 768, 22–34, 2014.

KWAN, H.Y.; CHAO, X.; SU, T.; FU, X. Q.; LIU, B.; TSE, A.K.W.; YU, Z.L. Dietary lipids and adipocytes: potential therapeutic targets in cancers. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 26, 303–311, 2015.

LADYGINA, N.; MARTIN, B.R.; ALTMAN, A. Dynamic Palmitoylation and the Role of DHHC Proteins in T Cell. **Advances in Immunology**. 109, 1–44, 2011.

LAI, C.S., MAS, R.H., NAIR, N.K., MANSOR, S.M., NAVARATNAM, V. Chemical constituents and in vitro anticancer activity of *Typhonium flagelliforme* (Araceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 127, 486–494, 2010.

LAI, C.S.; MAS, R.H.; NAIR, N.K.; MAJID, M.I.A.; MANSOR, S.M.; NAVARATNAM, V. *Typhonium flagelliforme* inhibits cancer cell growth in vitro and induces apoptosis: an evaluation by the bioactivity guided approach. **Journal of Ethnopharmacology**. 118, 14–20, 2008.

LATIF, R . Flavonoids as novel neuroprotective nutraceuticals. **Saudi Journal for Health Sciences**. 4, 1–4, 2015.

LEE, J.A.; JUNG, B.G.; KIM, T.H.; LEE, S.G.; PARK, Y.S.; LEE, B.J. Dietary feeding of *Opuntia humifusa* inhibits UVB radiation-induced carcinogenesis by reducing inflammation and proliferation in hairless mouse model. **Photochemistry and Photobiology**. 89, 1208–1215, 2013.

LEU, W.J.; CHANG, H.S.; CHAN, S.H.; HSU, J.L.; YU, C.C.; HSU, L.C.; GUH, J.H. Reevesioside A, a cardenolide glycoside, induces anticancer activity against human hormone-refractory prostate cancers through suppression of c-myc expression and induction of G1 arrest of the cell cycle. **PLOS ONE**. 9(1), e87323, 2014.

LI, L.F; CHAN, B.C.L.; YUE, G.G-L.; LAU, C.B.S.; HAN, Q.B.; LEUNG, P.C. Two immunosuppressive compounds from the mushroom *Rubinoboletus ballouii* using human peripheral blood mononuclear cells by bioactivity-guided fractionation. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**. 20, 1196–1202, 2013.

LI. Q.; JIANG, C.; ZU Y.; SONG, Z.; ZHANG, B.; MENG, X. SFE-CO₂ extract from *Typhonium giganteum* Engl. tubers, induces apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells involvement of a ROS-mediated mitochondrial pathway. **Molecules (Basel, Switzerland)**. 16, 8228–8242, 2011.

LIANG, W.; GUAN, H.; HE, X.; KE, W.; XU, L.; LIU, L.; LI, Y. Down-regulation of SOSTDC1 promotes thyroid cancer cell proliferation via regulating cyclin A2 and cyclin E2. **Oncotarget**. 6, 31780–31791, 2015.

LIMA, T.A. Caracterização de Compostos Nutricionais e Antinutricionais em Taiobas (*Xanthosoma Schott*) Dissertação submetida à Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Botânica. 64 p. 2009.

LINDER, M.E.; DESCHENES, R.J. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. 8, 74–84, 2007.

- LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 78(3 Suppl), 517–520, 2003.
- LOH, J.P.; KIEW, R.H.A.; KEE, A.; GAN, L.H.; GANYIK, Y. Intergeneric and interspecific relationships in Araceae tribe Caladiales and development of molecular markers using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Annals of Botany**. 85, 371–378, 2000.
- LOPES, F.C.M.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; Carlos, I.Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. 28,1726–1730, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS F.J.A. **Plantas Medicinas do Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. Instituto Plantarum de estudos da flora. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 11, 246–247, 2008.
- LORENZI, H.; SOUZA, V.C. **Botânica sistemática**. 2. ed. Instituto Plantarum de estudos da flora. p. 358–359, 2008.
- LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Molecular Cancer Research**. 4, 221–233, 2006.
- LUQUE, R.; SOUZA, H.C.; KRAUSS, J.E. Métodos de coloração de Roeser (1972) modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião ou 8GX. **Acta Botânica Brasilica**. 10, 199–211, 1996.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews. Cancer**. 9, 153–166, 2009.
- MANDAL, S.M.; DIPJYOTI, C.; SATYAHARIM, D. “Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling & Behavior**. 5, 359–368, 2010.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**. 454(7203), 436–444, 2008.
- MANTOVANI, A.; ARINAWA, A.L.D.P.; COELHO, M.A.N. Anatomia comparada da folha e espata de espécies de Anthurium (Araceae) ocorrentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**. 33,185–200, 2010.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. BRASIL. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Brasília 2010.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; DANTAS A.P. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. 74, 105–112, 2001.
- MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. Faculdade de Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo. 2003. <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>.
- MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press; London, UK; 113 pp. 1982.

- MARQUES, C.A.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; PEIXOTO, A.L.; VIEIRA, R.C. Anatomia e análise de óleo essencial das folhas de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19, 95–105, 2009.
- MARTINS, E.R.; DE CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas Medicinas. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2002.
- MATÉS, J.M.; SEGURA, J.A.; ALONSO, F.J.; MÁRQUEZ, J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. **Archives of Toxicology**. 86, 1649–1665, 2012.
- MAYO, S.J. A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). **Kew Bulletin**. 46, 601–681, 1991.
- MAYO, S.J., BORGNER, J.; BOYCE, P.C. The genera of Araceae. **Royal Botanic Gardens**. Kew, p. 370, 1997.
- MEDINI, F.; BOURGOU, S.; LALANCETTE, K.; SNOUSSI, M.; MKADMINI, K.; COTÉ, I.; ABDELLY C.; LEGAULT, J.; KSOURI, R. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. **South African Journal of Botany**. 99, 158–164, 2015.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454 (7203), 428–435, 2008.
- MELO, C.M.L.; CASTRO, M.C.A.B.; OLIVEIRA, A.P.; GOMES, F.O.S.; PEREIRA, V.R.A.; CORREIA, M. T.S.; PAIVA, P.M.G. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**. 24, 1631–1636, 2010.
- MELO, E.D.A.; INÊS, M.; MACIEL, S.; LÚCIA, V.; GALVÃO, A.; JOSEFA, R. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 44, 193–201, 2008.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A. S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. 15, 127–130, 2001.
- MILOVANOVIC, M.; PESIC, G.; NIKOLIC, V.; JEVTOVIC-STOIMENOV, T.; VASIC, K.; JOVIC, Z.; DELJANIN-ILIC. M.; PESIC, S. Vitamin D Deficiency is Associated with Increased IL-17 and Tnf α Levels in Patients with Chronic Heart Failure. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 98, 259–265, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **ABC do Câncer abordagens básicas para o controle do câncer**. 2ª edição revista e atualizada, Rio de Janeiro, 2012.
- MO, H.; RICE, K.G.; EVERS, D.L.; WINTER, H.C.; PEUMANS, W.J.; VAN, D.E.J.M.; GOLDESTEIN, I.L. *Xanthosoma sagittifolium* tubers contain a lectin with two different types of carbohydrate – binding sites. **Journal of Biological Chemistry**. 274, 3300–3305, 1999.
- MO, K.; CHOI, J.N.; KIM, J.; KIM, J.K.; YOO, L.G.; LEE, S.J.; LEE, C.H. Metabolomics analysis reveals the compositional differences of shade grown tea (*Camellia sinensis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 418–426, 2010.

- MOCELLIN, S.; PANELLI, M.C; WANG, E.; NAGORSEN D.; MARINCOLA F.M . The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**. 24, 36–43, 2003.
- MOHAN, S.; BUSTAMAM, A.; IBRAHIM, S.; AL-ZUBAIRI, A.S. *Typhonium flagelliforme* induces apoptosis in CEMss cells via activation of caspase-9, PARP cleavage and cytochrome c release: Its activation coupled with G0/G1 phase cell cycle arrest. **Journal of Ethnopharmacology**. 131, 592–600, 2010.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quimica Nova**. 24, 105–111, 2001.
- MONTEIRO, D.A.; PERESSIN, V.A. The effect of cormel seed size, planting time and site on tannia corms production. **Bragantia**. 56, 155–161, 1998.
- MONTEIRO, M.J.; ALBUQUERQUE, P.U., ARAÚJO, L.E., AMORIM, C.L.E. Taninos: Uma abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova**. 28, 892–896, 2005
- MOON, JOON-KWAN.; SHIBAMOTO, TAKAYUKI. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of agricultural and food chemistry**. 57,1655–1666, 2009.
- MORAIS, V.S; MARTINS, J.A.; WEBER, M.B; SENA, D.R Efeito do tipo de cultivo no conteúdo de vitamina c em folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* school) effect of cultivation types in the vitamin c content of taioba leaves. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**. 1, 64–68, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65, 55–63, 1983.
- MU, Y.M. Saturated FFAs, Palmitic Acid and Stearic Acid, Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. **Endocrinology**. 142, 3590–3597, 2001.
- MU, Y.M.; YANASE, T.; NISHI, Y.; TANAKA, A. ; SAITO, M.; CHENG-HAO JIN, MUKASA, C.; OKABE, T.; NOMURA, M; GOTO, K; HAJIME NAWATA, H. Saturated FFAs Palmitic Acid and Stearic Acid, Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. **Endocrinology**, 142, 3590–3597, 2001.
- MUELLER, C. Danger-Associated Molecular Patterns and Inflammatory Bowel Disease : Is There a Connection ? **Digestive Diseases**. 30 (suppl 3), 40–46, 2012.
- MÜHLETHALER-MOTTET, A.; FLAHAUT, M.; BOURLOUD, K.B.; NARDOU, K.; COULON, A.; LIBERMAN, J.; GROSS, N. Individual caspase-10 isoforms play distinct and opposing roles in the initiation of death receptor-mediated tumour cell apoptosis. **Cell Death & Disease**. 2, e125, 2011.
- MUKHERJEE, S.; GHOSH, S.; CHOUDHURY, S.; ADHIKARY, A.; MANNA, K.; DEY, S. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF-κB pathways. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 24, 2040–2050, 2013.
- MÜLLER, D. Antibody fusions with immunomodulatory proteins for cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**. 154, 57–66, 2015.
- MÜLLER, M., KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 4, p. 315–322, 2003.

MURRAY M.; HRAIKI A., BEBAWY M.; PAZDERKA C.; RAWLING T. Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. **Pharmacology & Therapeutics**. 150, 109–128, 2015.

NACHTIGALL, A.M.; STRINGHETA, P.C.; FIDELIS, P.C.; NACHTIGALL, F.M. Determinação do teor de luteína em hortaliças. **Boletim CEPPA**. 25, 181–192, 2007.

NAGATA, Y.; ISHIZAKI, I.; WAKI, M.; IDE, Y.; HOSSEN, M.A.; OHNISHI, K.; SETOU, M. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion mass spectrometry, demonstrates anti-multiple myeloma activity. **Leukemia research**. 39, 638–645, 2015.

NANO, J.L.; NOBILI, C.; GIRARD-PIPAU, F.; RAMPAL, P. Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 69, 207–215, 2003.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; DE SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Cerrado. **Brazilian Journal of Ethnopharmacology**. 99, 37–41, 2005.

NASCIMENTO, C.A.D.D.; MONTEIRO, E.M.L.M.; VINHAES, A.B.; CAVALCANTI, L.L.; RAMOS, M.B. O câncer infantil (leucemia): significações de algumas vivências maternas. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste-Rev Rene**. 10, 149–157, 2009.

NAVES, L.P.; CORRÊA, A.D.; ABREU, C.M.P.; SANTOS, C.D. Nutrientes e propriedades funcionais em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 30(Supl.1), 185–190, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th edition. Worth Publishers, 2004.

NGO, D.N.; KIM, M.M.; KIM, S.K. Protective effects of aminoethyl-chitooligosaccharides against oxidative stress in mouse macrophage RAW 264.7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. 50, 624–631, 2012.

NIHAL, M.; WU, J.; WOOD, G. S. Methotrexate inhibits the viability of human melanoma cell lines and enhances Fas/Fas-ligand expression, apoptosis and response to interferon-alpha: Rationale for its use in combination therapy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 563, 101–107, 2014.

NILE, S.H.; PARK, S.W. HPTLC analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Arisaema tortuosum* tuber extract. **Pharmaceutical Biology**. 52, 221–227, 2014.

NISBET, I.J.; MOORE, M.W. Natural products remain important sources of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**. 8, 708–712, 1997.

NISHANTHINI, A.; MOHAN, V.R. Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* Schott using various *in vitro* assay models. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 2, 1701–1706, 2012.

NOGUEIRA, R.C.; CERQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: The Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. 20, 1–13, 2010.

NYOCHEMBENG, L.M.; GARTON, S. Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 53, 127–134, 1998.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWOREB, N.O.; EKUNDAYOC, O.; WALKERD, T.M.; SCHMIDTD, J.M.; SETZERD, W.N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**. 15, 147–152, 2005.

OLIVEIRA, D.C.S.; WOBETO, C.; ZANUZO, M.R.; SEVERGNINI, C. Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. **Horticultura Brasileira**. 31, 472–475, 2013.

ONWEME, I.C. **The tropical tuber crops**. New York: Jonh Wiley & Sons, 234p. 1978.

ONWUENE, I.C.; JOHNSTON, M. Influence of shade on stomatal density, leaf size and other leaf characteristics in the major tropical root crops, tannia, sweet potato, yam, cassava and taro. **Experimental Agriculture**. 36, 509–516, 2000.

OTHMAN, A.R.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S.; ISMAIL, I. S.; ZAKARIA, M.P. Elucidation of in-vitro anti-inflammatory bioactive compounds isolated from *Jatropha curcas* L. plant root. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 15, 11, 2015.

PADILHA, P.D.C.; PINHEIRO, R.D.L. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 50, 251–260, 2004.

PAIVA, W.O. Caracterização e avaliação de aráceas comestíveis no Estado do Amazonas. **Acta Amazônica**. 23, 115–123, 1993.

PAN, M.H.; LAI, C.S.; HO, C.T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, 1, 15–31, 2010.

PARDOLL, D.M. The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews. Cancer**. 12, 252–264, 2012.

PARHAM, P. **O sistema imune**. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 50–67, 2011.

PARK, E.J.; LEE, A.Y.; PARK, S.; KIM, J.H.; CHO, M.H. Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. **Food and Chemical Toxicology**. 67, 26–34, 2014.

PARK, H.R.; LEE, H.S.; CHO, S.Y.; KIM, Y.S.; SHIN, K.S. Anti-metastatic effect of polysaccharide isolated from *Colocasia esculenta* is exerted through immunostimulation. **International Journal of Molecular Medicine**. 31, 361–368, 2013.

PAVELIĆ, S. K.; MARJANOVIĆ, M.; POZNIĆ, M.; KRALJ, M. Adenovirally mediated p53 overexpression diversely influence the cell cycle of HEp-2 and CAL 27 cell lines upon cisplatin and methotrexate treatment. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 135, 1747–1761, 2009.

PEGRAM, H.J.; HAYNES, N.M.; SMYTH, M.J.; KERSHAW, M.H.; DARCY, P.K. Characterizing the anti-tumor function of adoptively transferred NK cells *in vivo*. **Cancer Immunology and Immunotherapy**. 59, 1245–1246, 2010.

PENG, Q.; CAI H.; SUN, X.; LI, X.; MO, Z.; SHI J. Alocasia cucullata exhibits strong antitumor effect *in vivo* by activating antitumor immunity. **PLOS ONE**. 8(9), e75328, 2013.

PEREIRA, D.M.; CORREIA DA SILVA, G., VALENTÃO, P., TEIXEIRA, N., & ANDRADE, P.B. Palmitic acid and ergosta-7,22-dien-3-ol contribute to the apoptotic effect and cell cycle arrest of an extract from *Marthasterias glacialis* L. In neuroblastoma cells. **Marine Drugs**, 12, 54–68, 2014.

PEREIRA, R.; CARDOSO, G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. 3, 146–152, 2012.

PÉREZ, E.; SCHULTZ, F.S.; DELAHAYE, E.P. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro). **Carbohydrate Polymers**. 60, 139–145, 2005.

PEREZ, E.E.; BREENE, W.M.; BAHNASSEY, Y.A. Gelatinization profiles of peruvian carrot, cocoyam and potato starches as measured with the brabender visco amylograph, rapid visco-analyzer, and differential scanning calorimeter. **Starch**. 50, 14-16, 1998.

PEZZINI, T.J.; CASTRO, F.S. Alterações hematológicas na leucemia linfóide aguda (LLA). **Estudos**. 41, 2014.

PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; LAURO, M.R.; BARBATO, F.; AQUINO, R. Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 6423–6428, 2003.

PINTO, A.C.; REGO, G.C.G.; SIQUEIRA, A.M.; CARDOSO, C.C.; REIS, P.A.; MARQUES, E.A.; COELHO, M.G.P., SABINO, K.C.C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 111, 435–439, 2007.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 25, 45–61, 2002.

PINTO, N.A.V.D.; BOAS, B.M.V.; CARVALHO, V.D. Caracterização mineral das folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Ciência e Agrotecnologia**. 23, 57–61, 1999.

PINTO, N.A.V.D.; CARVALHO, V.D.; CONCEIÇÃO, A.; ABREU, C.M.P. Evolution of the contents of vitamin C and losses with the drying of the leaves of taro (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Alimentaria**. 37, 83–85, 2000b.

PINTO, N.A.V.D.; CARVALHO, V.D.; CORRÊA, A.D.; RIOS, A.O. Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras. 25, 601-604, 2001.

PINTO, N.A.V.D.; FERNANDES, S. M.; THÉ, P.M.P.; CARVALHO, V.D. Variabilidade da Composição Centesimal, Vitamina C, Ferro e Cálcio de Partes da Folha de Taioba. **Revista Brasileira de Agrociência**. 7, 205–208, 2001.

PIZER, E.S.; WOOD, F.D.; PASTERNAK, G.R.; CELLS, P.L.; PIZER, E.S.; WOOD, F.D.; KUHAJDA, F.P. Fatty Acid Synthase (FAS): A Target for Cytotoxic Antimetabolites in HL60 Promyelocytic Leukemia Cells. **Cancer Research**. 56, 745–751, 1996.

POMPÉIA, C.; LOPES, L.R. (2000). Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33, 1255–1268.

PRATHIBHA, S.; BALA, N.; LEELAMMA, S. Enzyme inhibitors in tuber crops and their thermal stability. **Plant Foods for Human Nutrition**. 48, 247–257, 1995.

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**. 95, 183–189, 2004.

RADFORD, A.E.; DICKISON, W.C.; MASSEY, J.R.; BELL, C.R. **Vascular Plant Systematics**. New York: Harper & Row Publishers, 891p. 1979.

RAJ, S.; GOTHANDAM, K.M. Hepatoprotective effect of polyphenols rich methanolic extract of *Amorphophallus commutatus* var. wayanadensis against CCl₄ induced hepatic injury in swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**. 67, 105–112, 2014.

RAKOFF-NAHOUM, S. Why Cancer and Inflammation? **Yale Journal of Biology and Medicine**. 79, 123–130, 2006.

RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**. 29, 1114–1120, 2006.

RAO, Y.K.; FANG, S.; TZENG, Y. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorate*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. 114, 78–85, 2007.

RATTMANN, Y.D.; MENDÉZ-SÁNCHEZ, S. C.; FURIAN, A.F.; PALUDO, K.S.; SOUZA, L.M.; DARTORA, N.; IACOMINI, M. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 133, 999–1007, 2011.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signaling**. 24, 981–990, 2012.

RDC, Resolução da Diretoria Colegiada. Resolução-RDC nº. nº 14, de 31 de março de 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa>.

REDDY, A.S.; ABD-MALEK, S.N.; IBRAHIM, H.; SIM, K.S. Cytotoxic effect of *Alpinia scabra* (Blume) Náves extracts on human breast and ovarian cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13, 314, 2013.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LOPES, C.A. Horticultura brasileira sustentável: Sonho eterno ou possibilidade futura?. **Revista de Política Agrícola**. 24, 90–101, 2015.

Resoluções: nº 16, 17, 18, de 1999. Resolução RDC nº 2, de 2002. RDC 14 de 2010 e portaria 398 de 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/> Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; & AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. 49, 1603–1616, 2010.

RHEE, S.G.; CHANG, T.S.; JEONG, W.; KANG, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. **Molecules and Cells**. 29, 539–549, 2010.

RIEGSECKER, S.; WICZYNSKI, D.; KAPLAN, M.J.; AHMED, S. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. **Life Sciences**. 93, 307–312, 2013.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos** 61, 31–36, 1962.

ROITT, I.M. **Fundamentos de Imunologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 552 p. 20–35, 2013.

ROSSATO, F.A.; ZECCHIN, K.G, LA GUARDIA, P.G.; ORTEGA, R.M.; ALBERICI, L.C.; COSTA, R.A.P. Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic Melan-A cells associated with inhibition of mitochondrial respiration. **PLOS ONE**. 9, 1–12, 2014.

RUEDAS, M.; GUERRA, M.; HERNANDEZ, B. Chemical peeling and enzymatic hydrolysis requirements for the obtention of maltodextrin from tannia (*Xanthosoma sagittifolium*). **Acta Científica Venezuelana**. 48, 9–12, 1997.

RUELA, H.S. Potencial Biotecnológico de Bumelia sartorum Mart.: Avaliação Fitoquímica e Farmacológica / **Tese de Doutorado em Biotecnologia Vegetal**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Vegetal Rio de Janeiro. 170 p. 2011.

RUIZ-MONTAÑEZ, G.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; LÓPEZ-SAIZ, C.M.; VELÁZQUEZ-CONTRERAS, CA.; NAVARRO-OCAÑA, A.; Screening antimutagenic and antiproliferative properties of extracts isolated from *Jackfruit pulp* (*Artocarpus heterophyllus* Lam). **Food Chemistry**. 175, 409–416, 2015.

RUSSO, A.; Cardile, V.; Lombardo, L.; Vanella, L.; Vanella, A.; Garbarino, J.A. Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of Geum quellyon Sweet roots in human tumor cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**. 100, 323–332, 2005.

SAAD, G.A.; LÉDA, P.H.O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A.C.C. **Fitoterapia Contemporânea**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 32–33, 2009.

sSAEDI, T. A.; MD NOOR, S.; ISMAIL, P.; OTHMAN, F. The effects of herbs and fruits on leukaemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2014, ID 494136, 2014.

SAEED, N.M.; EL-DEMERDASH, E.; ABDEL-RAHMAN, H.M.; ALGANDABY, M.M.; AL-ABBASI F A.; ABDEL-NAIM, A.B. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 264, 84–93, 2012.

SAGALIK, S.; ALPINAR, K.; IMRE, S. Fatty acid composition of *Dracunculus vulgaris* Schott (Araceae) seed oil from Turkey. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**. 5, 231–233, 2002a.

SAGALIK, S.; ALPINAR, K. & IMRE, S. Fatty acid composition of the seed oil of *Arum italicum* Miller. **Journal of Food Lipids**. 9, 95–103, 2002b.

SAITO S.R.M.; LIMA, V.F.G.A.P. Estudo anatômico e variação na concentração de idioblasto com ráfides em folhas de Araceae, mantidas sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Saúde**. 3, 25–32, 2009.

SAK, K.; EVERAUS, H. Multi-Target Cytotoxic Actions of Flavonoids in Blood Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 16, 4843–4847, 2015.

SAKAI, W.S.; HANSON, M.; JONES C.R. Raphides with barbs and grooves in *Xanthosoma sagittifolium* (Araceae). **Science**. 178, 314–315, 1972.

SAKANO, Y.; MUTSUGA, M.; TANAKA, R.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; TOYODA, M.; GODA, Y.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y. Inhibition of human lanosterol synthase by the constituents of *Colocasia esculenta* (taro). **Biological Pharmaceutical Bulletin**. 28, 299–304, 2005.

SAKURAGUI, C.M. Taxonomia e Filogenia das espécies de *Philodendron* seção *Calostigma* (Schott) Pfeiffer no Brasil. **Tese de Doutorado em Botânica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998.

SALAKO, O.A.; AKINDELE, A.J.; SHITTA, O.M.; ELEGUNDE, O.O.; ADEYEMI, O. Antidiarrhoeal activity of aqueous leaf extract of *Caladium bicolor* (Araceae) and its possible mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, 176, 225–231, 2015.

SALAUN, C.; GREAVES, J.; CHAMBERLAIN, L.H. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. **The Journal of Cell Biology**. 191, 1229–1238, 2010

SAMIR, D.; SHALINI, J.; HARIOM, Y. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**. 44, 1856–1865, 2011.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; GELBERT L.M.; LALLENA M.J.; DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 25, 3420–3435, 2015.

SANDHU, A.K.; GU, L. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 4681–4692, 2010.

SANT'ANA, P.J.P.; ASSAD, A.L.D. **Bioprospeção no Brasil**: Contribuições para uma gestão ética. 1. ed. Brasília: Editora Paralelo, 353 p. p. 9–17, 2002.

SANTOS, W.M.; JUNIOR, S.S.; NOLASCO, F.; SILVA CAMPOS, R.A.; SILVA, M.B.; RODRIGUES, L.F.O.S. Produção de mudas de taioba em função do tipo e seccionamento de rizomas. **Científica**. 42, 74–79, 2014.

SARRÍAS-GONZÁLEZ, A.; LARROSA, M.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J. C. Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. **Maturitas**. 75, 313–34, 2013.

SCHAFER, J.L. Improved cropping practices with tannia, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott in the Bamileke region of western Cameroon. **Cahiers Agricultures**. 8, 9–20, 1999.

SCHENELL, R.J.; GOENAGA, R.; OLANO, C.T. Genetic similarities among cocoyam cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Scientia Horticultural**. 80, 267–276, 1999.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 96, 563–568, 2005.

SEBESTIK, V.; BRABEC, V. Experimental elimination of the splenic function by ethyl and methyl palmitate and significance of these substances from an immunological point of view. **Folia Haematologica Int Mag Klin Morphol Blutforsch**. 110, 917–923, 1983.

SEGANFREDO, R.; FINGER, F.L.; BARROS, R.S.; MOSQUIM, P.R. Influência do momento de colheita sobre a deterioração pós-colheita em folhas de taioba. **Horticultura Brasileira**. 19, 184–187, 2001.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; Milner, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 18, 567–579, 2007.

SFALCIN, S.L.S. Estudo da ação de extratos de pariparoba (*piper regnelli*) sobre o estresse oxidativo em células saudáveis e linhagens tumorais. 15^o **Congresso de Iniciação Científica. 5^a. Mostra Acadêmica UNIMEP**- 23 a 25 de outubro de 2007

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **Journal of Clinical Investigation**. 125, 3347, 2015.

SHAN, Li.; JIAN Li.; GUAN, X.L.; LI, J., DENG, S.P.; LI, L.Q.; YANG, R.Y. Hypoglycemic effects and constituents of the barks of *Cyclocarya paliurus* and their inhibiting activities to glucosidase and glycogen phosphorylase. **Fitoterapia**. 82, 1081–1085, 2011.

SHI, F.; ZHOU, D.; JI, Z.; XU, Z.; YANG, H. Anti-arthritic activity of luteolin in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats by suppressing P2X4 pathway. **Chemico-biological Interactions**. 226, 82–87, 2015.

SHIN, H. J.; LEE, S. Y.; KIM, J. S.; LEE, S.; CHOI, R. J.; CHUNG, H. S.; .KANG, S.S. Sesquiterpenes and Other Constituents from *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 60, 306–314, 2012.

SILVA, C.T.J.; Galvonas, M. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciencia e Cultura**. 66, 38–42. 2014.

SILVA, K.M.; BORTOLUZZI, R.L.C.; GOMES, J. P.; MANTOVANI, A. Espécies bioativas em áreas úmidas do Planalto Catarinense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 15, 483–493, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5a. ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 525–527, 2005.

SINGH, R.; KUMARI, N. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorossi* Gaertn . – A valuable medicinal tree. **Industrial Crops and Products**. 73, 1–8, 2015.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16, 144–158, 1965.

SIRISINHA, S. Review article Insight into the mechanisms regulating homeostasis in health and disease. **Asian Pacific Journal Allergy Immunology**. 29, 1–14, 2011.

SOUSA, C.D.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.D.; ARAÚJO, D.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**. 30, 351–355, 2007.

SOUZA, A.W.S.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; CRUVINEL, W.M.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. Sistema Imunitário – Parte III. O delicado

equilíbrio do sistema imunológico entre os polos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 50, 665–694, 2010.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; PENHA, M.; AMARAL, H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo. 43, 181–194, 2007.

SUDAN, R.; BHAGAT, M.; GUPTA, S.; SINGH, J.; KOUL, A. Iron (FeII) chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of *Arisaema jacquemontii* (*Himalayan cobra Lily*). **BioMed Research International**. 2014, 179865, 2014

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed.. Massachusetts. p. 311–315, 2010.

TAKEARA, R.; JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; ODORICO, M.M.; PESSOA, C.; PEPORINE LOPES, N.; COSTA LOTUFO, L.V. Antileukemic effects of *Didemnum psammotodes* (Tunicata: Ascidiacea) constituents. Comparative biochemistry and physiology. Part A, **Molecular & Integrative Physiology**. 151, 363–369, 2008.

TAMBONG, J.T.; POPPE, J.; HOFTE, M. Pathogenecity, electrophoretic characterisation and in plant detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. **European Journal of Plant Pathology**. 105, 597–607, 1999.

TAN, T.G.; MUI, E.; CONG, H.; WITOLA, W.H.; MONTPETIT, A.; MUENCH, S.P.; MAEWAL, A. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. **Vaccine**. 28, 3977–3989, 2010.

TARLOVSKY FUCHS, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**. 29, 15–21, 2013.

THANAN, R.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; OHNISHI, S.; MA, N.; PINLAOR, S.; MURATA, M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**. 16, 193–217, 2014.

TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 2913–2919, 2010.

TSURUSAWA, M.; NIWA, M.; KATANO, N.; FUJIMOTO, T. Flow cytometric analysis by bromodeoxyuridine/DNA assay of cell cycle perturbation of methotrexate-treated mouse L1210 leukemia cells. **Cancer Research**. 48, 4288–4293, 1988.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; BONESI, M.; COLICA, C.; MENICHINI, F. *In vitro* cytotoxic activity of extracts and isolated constituents of *Salvia leriifolia* benth. Against a panel of human cancer cell lines. **Chemistry and Biodiversity**. 8, 1152–1162, 2011.

TUNÓN, M.J.; GARCIA MEDIAVILLA, M.V.; SÁNCHEZ CAMPOS, S., GONZÁLEZ GALLEGU, J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory expression and signal transduction pathways. **Current Drug Metabolism**. 10, 256–271, 2009.

- TURPIN, P.J.E. Observations sur les biforines, organs nouveaux situés entre les vésicules du tissu cellulaire des feuilles dans un certain nombre d'espèces végétales appartenant à la famille des Aroidées. **Annales Des Sciences Naturelles**. 2, 5–27, 1836
- UPADHYAY, S. & DIXIT, M. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, Article ID 504253, 2015.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39, 44–84, 2007.
- VAN HATTUM, H.; WALDMANN, H. Chemical Biology Tools for Regulating RAS Signaling Complexity in Space and Time. **Chemistry & biology**. 21, 1185–1195, 2014.
- VASCONCELOS, S.; SILVA, M.; GOULART, M. Low molecular weight pro-antioxidants and antioxidants from diet: structure and function. **Nutrire**. 31, 95–118, 2006.
- VAZQUEZ, M.I.; CATALAN-DIBENE, J.; ZLOTNIK, A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. **Cytokine**. 74, 318–326, 2015
- VECHIA, L.D.; GNOATTO, S.C.B. Derivados Oleananos e Ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**. 32, 1245–1252, 2009.
- VELOZO, L.S.M.; MARTINO, T.; VIGLIANO, M.V.; PINTO, F.A.; SILVA, G.P.; JUSTO, M.D.G. COELHO, M.G.P. *Pterodon polygalaeflorus* essential oil modulates acute inflammation and B and T lymphocyte activation. **The American Journal of Chinese Medicine**. 41, 545–563, 2013.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. 2, 105–113, 2015.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**. 36, 131–149, 2003.
- VIDAL, A.M.; DIAS, D.O.; MARTINS, E.S.M.; OLIVEIRA, R.S.; NASCIMENTO, R.M.S.; CORREIA, M.G.S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**. 1, 43–52, 2012.
- VIEGAS, JR.; BOLZANI, C.; SILVA V.; BARREIRO ELIEZER J.B. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. 29, 326–337, 2006.
- VO, T.S.; KIM, S.K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**. 5, 16–27, 2013.
- VOET. D.; VOET J.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica. A vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.
- WALLACE, P.A.; MARFO, E.K.; PLAHAR, W.A. Nutritional quality and antinutritional composition of four nonconventional leafy vegetables. **Food Chemistry**. 61, 287–291, 1998.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from *Icelandic seaweeds*. **Food Chemistry**, 116, 240–248, 2009.

WANIDWORANUN, C; STROBER, W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. **The Journal of Immunology**. 151, 6853–6861, 1993.

WEI, P.; ZHIYU, C.; XU, T.; XIANGWEI, Z. Antitumor effect and apoptosis induction of *Alocasia cucullata* (Lour.) G. Don in human gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 15, 33, 2015. .

WEN, L.; GUO, X.; LIU, R.H.; YOU, L.; ABBASI, A.M.; FU, X. Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn “*Crataegus pinnatifida*”. **Food Chemistry**. 186, 54–62, 2015.

WHITESIDE, T.L. Immune responses to malignancies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 125 (Suppl. 2), 272–283, 2010.

WHO - World Health Organization. Global strategy on diet, physical activity and health: fifty seventh World Health Assembly. Disponível em: www.who.int. Acesso em: 10 de janeiro. 2014.

WICHERS, H. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 395, 37–45, 2009.

WILLIAMS, C.A.; HARBONE, J.B.; MAYO, S.I. Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family Araceae. **Phytochemistry**. 20, 217–234, 1981.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 7, 2–15, 1996.

WOISKY, R.G Métodos de controle químico de amostras de própolis. **Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**, para a obtenção do grau de Mestre em Fármacos de Medicamentos, 74 p. 1996.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. 37, 99–105, 1998.

WOOD, G.S.; WU, J. Methotrexate and Pralatrexate. **Dermatologic Clinics**. 33(4), 747–755, 2015.

WU D, LIU. J.; PANG, X.; WANG, S.; ZHAO, J.; ZHANG, X. Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α . **International Journal of Molecular Medicine**. 34, 1706–1712, 2014.

XAGORARI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T. ROUSSOS, C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 296, 181–187, 2001.

XIE, C.; KANG, J.; LI, Z.; SCHAUSS, A.G.; BADGER, T.M.; NAGARAJAN, S.; WU, X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 23, 1184–1191, 2012.

YANG, C.J.; HUANG, Y.J.; WANG, C.Y.; WANG, P.H.; HSU, H.K.; TSAI, M.J.; WENG, C.F. Antiproliferative effect of *Toona sinensis* leaf extract on non-small-cell lung cancer. Translational research. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 155, 305–314, 2010.

YANG, Y.Z.; TANG, Y.Z.; LIU, Y.H.; Wogonoside displays anti-inflammatory effects through modulating inflammatory mediator expression using RAW264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. 148, 271–276, 2013.

YASMEEN, A.; BERDEL, W.E.; SERVE, H.; MULLER-TIDOW, C. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. **Expert Review of Molecular Diagnosis**. 3, 617–633, 2003

YE, S.; SHEN, J.; CHOY, E.; YANG, C.; MANKIN, H.; HORNICEK, F.; DUAN, Z. p53 overexpression increases chemosensitivity in multidrug - resistant osteosarcoma cell lines. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 1–8. 2015.

YEAP, S.K.; ALITHEEN, N.B.; ALI, A.M.; OMAR, A.R.; RAHA, A.R.; SURAINI, A.A.; MUHAJIR, A.H. Effect of *Rhaphidophora korthalsii* methanol extract on human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation and cytolytic activity toward HepG2. **Journal of Ethnopharmacology**. 114, 406–411, 2007.

YEAP, S.K.; OMAR, A.R.; HO, W.Y.; BEH, B.K.; ALI, A.M.; ALITHEEN, N.B. *Rhaphidophora korthalsii* modulates peripheral blood natural killer cell proliferation, cytokine secretion and cytotoxicity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13, 145–155, 2013.

YELLEN, P.; FOSTER, D.A. Inhibition of fatty acid synthase induces pro-survival Akt and ERK signaling in K-Ras-driven cancer cells. **Cancer letters**. 353, 258–263, 2014.

YING, L.; & HOFSETH, L.J. An Emerging Role for Endothelial Nitric Oxide Synthase in Chronic Inflammation and Cancer. **Cancer Research**. 67, 1407–1410, 2007.

YOSHINARI, O.; IGARASHI, K. Anti-diabetic effect of pyroglutamic acid in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats and KK-a y mice. **British Journal of Nutrition**. 106, 995–1004, 2011.

YOUNT, J.S.; ZHANG, M.M.; HANG, H.C. Emerging roles for protein S-palmitoylation in immunity from chemical proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**. 17, 27–33, 2013.

ZAINI, N.A.M.; ANWAR, F.; HAMID, A.A.; SAARI, N.; KUNDUR. *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.: A potential source for valuable nutrients and functional foods. **Food Research International**. 44, 2368–2376, 2011.

ZAMBONIN, L.; CALICETI, C.; VIECELI, D.S.F.; FIORENTINI, D.; HRELIA, S.; LANDI, L.; PRATA, C. Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2012: Article ID 839298, 2012.

ZENG, L.; WU, G.Z.; GOH, K. J.; LEE, Y.M.; NIG, C.C.; YOU, A. B.; Li, B. Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis. **PLOS ONE**. 3, 1–9, 2008.

ZHANG, H.J.; DOCTROW, S.R.; XU, L.; OBERLEY, L.W.; BEECHER, B.; MORRISON, J.; KREGEL, K.C. Redox modulation of the liver with chronic antioxidant enzyme mimetic

treatment prevents age-related oxidative damage associated with environmental stress. **The FASEB journal**.18, 1547–1549, 2004.

ZHANG, L.N.; HAO, L.; WANG, H.Y.; SU, H.N.; SUN, Y.J.; YANG, X.Y.; GAO, Z. B Neuroprotective effect of Resveratrol Against Glutamate-Induced Excitotoxicity. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**. 24, 161–165, 2015.

ZHAO, E.H.; ERGUL, B.; ZHAO, W. Caffeine's Antioxidant Potency Optically Sensed with Double-Stranded DNA-Encased Single-Walled Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry**. 119, 4068–4075, 2015.

ZHAO, G.R.; XIANG, Z.J.; YE, T.X.; YUAN, Y.J.; GUO, Z.X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chemistry**. 99, 767–774, 2006.

ZHEN, X.; CEN, J.; LI Y.M.; YAN, F.; GUAN, T.; TANG, XZ. Cytotoxic effect and apoptotic mechanism of tanshinone A, a novel tanshinone derivative, on human erythroleukemic K562 cells. **European Journal of Pharmacology**. 667, 129–135, 2011.

ZHOU, W.; SIMPSON, P.J.; MCFADDEN, J.M.; CELLS, C.; ZHOU, W.; SIMPSON, P.J.; KUHAJDA, F.P. Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human. **Cancer Research**. 63, 7330–7337, 2003.

ZINKERNAGEL, R.M. Immunological memory protective immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 69, 1635–1640, 2012.

ZLOGORSKI, A.; DAYAN, A.; DAYAN, D.; CHAUSHU, G.; SALO, T.; VERED, M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol. **Oral Oncology**. 49, 502–506, 2013.

ZOK, S.; SAMA, A.E.; NYOCHEMBENG, L.; TAMBONG, J.T.; NDZANA, X.; WUTOH, J.G. Rapid multiplication of root and tuber crops through tissue culture in Cameroon. **Cahiers Agricultures**. 7, 63–66, 1998.

APÊNDICE - Artigo publicado

Research Article

In Vitro Antileukemic Activity of *Xanthosoma sagittifolium* (Taioba) Leaf Extract

Marina L. C. Caxito,^{1,2} Rachell R. Correia,¹ Anne Caroline C. Gomes,² Graça Justo,¹ Marsen G. P. Coelho,¹ Cássia M. Sakuragui,³ Ricardo M. Kuster,² and Katia C. C. Sabino¹

¹Departamento de Bioquímica, IBRAG, Centro Biomédico, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Avenida Professor Manoel de Abreu 44, PAPP, 4º Andar, 20550-170 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Marina L. C. Caxito; marinaleticia@gmail.com

Received 15 April 2015; Accepted 24 May 2015

Academic Editor: Chun T. Che

Copyright © 2015 Marina L. C. Caxito et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Xanthosoma sagittifolium Schott is a herb of the Araceae family, popularly known as taioba, which is consumed as food in some regions of Brazil, Africa, and Asia. This species has already been evaluated for the antifungal activities. However, based on its potential antitumor activity, the present study further aimed to examine the antitumor, as well as chelation, activity of *X. sagittifolium* leaf extract. Results showed that hydroethanolic extract of *X. sagittifolium* leaves (HEXs-L) exhibits cytotoxic effects against the immortalized line of human T-lymphocytic (Jurkat) and myelogenous (K562) leukemia cells, but not nontumor RAW 264.7 macrophages or NIH/3T3 fibroblasts. HEXs-L inhibited 50.3% of Jurkat cell proliferation, reducing by 20% cells in G2/M phase, but increasing cells in sub-G1 phase, thereby inducing apoptosis by 54%. In addition, HEXs-L inhibited NO production by 59%, as determined by Griess reaction, and chelated 93.8% of free Fe(II), as demonstrated by ferrozine assay. Phytochemical studies were carried out by ESI-MS, identifying apigenin di-C-glycosides as major compounds. Overall, this work revealed that leaf extract of *Xanthosoma sagittifolium* presented chelating activity and *in vitro* antitumor activity, arresting cell cycle and inducing apoptosis of leukemia cells, thus providing evidence that taioba leaves may have practical application in cancer therapy.

1. Introduction

Cancer is characterized by uncontrolled growth, invasion, and, sometimes, metastasis [1]. Its incidence grows annually worldwide, and, in Brazil, it is the second leading cause of death. According to the Brazilian National Cancer Institute (NCI), leukemia is a hematologic cancer characterized by abnormal and uncontrolled proliferation of white blood cells, grouped as lymphoid or myeloid cells, occurring in both children and adults. According to the National Cancer Institute [2], 9,370 new cases of leukemia would occur in Brazil, including 5,050 men and 4,320 women, with the potential to cause such pathophysiological changes as anemia, neutropenia, thrombocytopenia, fever, bleeding, osteoarticular pain, fatigue, and dyspnea [2–4].

Epidemiological evidence has pointed to a connection between chronic inflammation and predisposition for cancer

development [5], suggesting that the inflammatory microenvironment can increase mutation rates and accompanying cell proliferation [6]. Such activated inflammatory cells serve as a source of high levels of reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion, hydroxyl radicals, and hydroperoxide, as well as nitrogen reactive intermediates (NRS), such as nitric oxide (NO) or peroxy nitrite. Together, ROS and NRS are capable of inducing genomic instability, cell damage, and/or death [7]. In addition, nitric oxide is an important mediator of chronic inflammation and regulates cell proliferation, survival, migration, angiogenesis, DNA repair, and tumorigenesis [8]. Accordingly, minimizing ROS and NRS production could protect normal cells from oxidative damage and tumorigenesis [9].

On the other hand, iron is essential for cell growth and proliferation, and perturbation in cellular iron uptake can arrest cell viability, both *in vitro* and *in vivo* [10–12]. Many

studies have reported on the potential utility of iron deprivation for the treatment of multiple neoplasias [12–14]. Furthermore, bivalent transition metal ions play an important role as catalysts of oxidative processes, leading to the formation of hydroxyl radicals via Fenton reaction [15].

The identification of new compounds with potential anticancer activity derived from herbaceous foods or medicinal plant extracts has been widely explored in recent years [16], especially those that can serve as immunomodulators or antitumor and antioxidant agents. *X. sagittifolium* Schott, commonly known as taioaba, tannia, or cocoyam, is an herbaceous plant of the Araceae family widely grown in many parts of Africa, America, and Asia [17]. The leaves of this species are an excellent source of calcium, phosphorus, iron, and some vitamins [18], and they are consumed as food in South America, especially in Brazil [19]. The rhizome is an important source of starch used as part of the diet in the Amazon region [18]. Despite its nutritional value, *X. sagittifolium* Schott is a poorly studied medicinal plant, being primarily used for treatment of bone diseases based on the results of free calcium (Ca^{2+}) analyses [20]. In addition, antifungal activity has been demonstrated for the aqueous extract of *X. sagittifolium* [21].

Based on the antifungal activity of *X. sagittifolium* that antifungal extracts can also present antineoplastic activity [22–24] and considering that antitumor action has never been reported in this species this study aimed to determine the antileukemic potential of *X. sagittifolium* leaf extract, as well as its iron-chelating activity and inhibition of nitric oxide production.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Extract Preparation. Material of *X. sagittifolium* was collected at Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil, and identified by Dr. Cassia Sakuragui, Botanic Department of Rio de Janeiro Federal University. An exsiccate is deposited in the Herbarium of the Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ, Brazil (RB 432051). Air-dried and powdered plant material was macerated in ethanol 70%. The rhizomes (HEXs-R) and leaves (HEXs-L) hydroethanolic extracts were obtained after filtration and solvent evaporation at 60°C (rotary evaporator, Pemen, with vacuum pump Cole Parmer, Instrument Company, Model 7049-50, and a bath, Fisatom, Brazil) and lyophilization (Labconco, Brazil). The extracts were stored at –20°C until use. For cell culture assays, the extracts were dissolved (50 mg/mL) in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at –20°C. Each extract was diluted in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (RPMI supplemented medium) before experiments.

2.2. Cell Culture. Jurkat cells (T-lymphocytic leukemia cell line) were kindly donated by the Basic Research Center of Cancer National Institute of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, while K562 cells (myelogenous leukemia cell line), NIH-3T3 (nontumor fibroblast cell line), and RAW-264.7 (macrophage cell line) cells were purchased from Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil. The leukemia and NIH-3T3 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10%

fetal calf serum (FCS). RAW 264.7 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS and 15 mM HEPES. The cells were expanded two-three times a week. Cultures were incubated at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO_2 . Maximal DMSO concentration used in the experimental conditions was 0.05%. Cultures containing medium with DMSO did not present cytotoxic effects.

2.3. MTT Cytotoxicity Assay. Leukemia cells (1×10^5 /mL) were cultured for 46 h (96-well plate) with different extract concentrations and the cytotoxicity was determined by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] method [25]. RAW 264.7 (5×10^5 cells/mL) and NIH-3T3 cells (1×10^5 cells/mL) were seeded at 96-well plate and previously incubated 24 h for adhesion. Subsequently, NIH-3T3 cells were incubated for more 46 h with HEXs-L (10–30–50–70–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and RAW 264.7 cells were incubated for more 22 h with HEXs-L (10–30–50–70–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), both in the presence of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After cell incubation with plant samples, each well received 10 μL of MTT (5 mg/mL stock solution) and was incubated for 2 h at 37°C and 5% CO_2 . The formazan crystal was dissolved adding 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of 10% sodium dodecyl sulfate solution with HCl 0.01 N. The absorbance was measured at 570 nm after 24 h incubation at 37°C (microplate reader μQuant , Bio-Tek Instruments, Inc.) and viability to each cell line was determined.

2.4. Cell Cycle Analysis. Jurkat cells (1×10^5 /mL) were cultured in the absence or presence of HEXs-L 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or MTX 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h. After incubation, the viable cell number was determined (by Trypan blue dye exclusion) and the cell cycle evaluated [26]. After centrifugation, cells (1×10^6) of each experimental condition were suspended in 43 mM citrate buffer (500 μL), containing propidium iodide (PI) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and Triton X-100 0.3%, homogenized, and remained at room temperature for 15 min in the dark. RNase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 43 mM citrate buffer) was added (500 $\mu\text{L}/\text{experimental condition}$) and incubation proceeded for 15 min at room temperature. PI fluorescence (FL-3 channel) was analyzed by flow cytometry on a Gallios Cytometer (Beckman Coulter). Results were analyzed using Summit 4.3v software.

2.5. Annexin V Apoptosis Assay. Jurkat cells (1×10^5 /mL) were cultured in supplemented RPMI 1640 in the absence or presence of HEXs-L 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or MTX 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h at 37°C and 5% CO_2 and humidified atmosphere. Apoptotic cells were labelled using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioLegend). Cells (1×10^6) were washed with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS), and suspended in 500 μL of “binding buffer.” Subsequently, 100 μL of this solution (1×10^5 cells) was transferred into another tube and Annexin V-FITC and PI (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock solution) were added. The reaction was maintained for 15 min in ice. After this time, “binding buffer” was added (400 $\mu\text{L}/\text{tube}$), and the cells were analyzed by flow cytometry. The fluorescence was detected (5×10^4 events) on a Gallios Cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using the Summit 4.3v software.

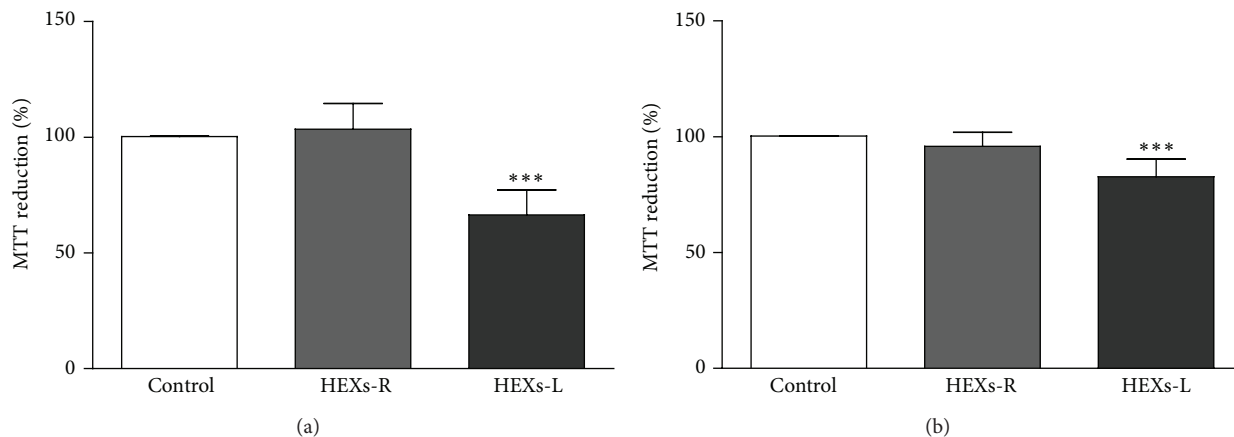


FIGURE 1: Cytotoxic effects of HEXs on leukemic cells. (a) Jurkat cells. (b) K562 cells. Cells (1×10^5 /mL) were incubated in the absence (control) or presence of rhizome (HEXs-R) or leaf extracts (HEXs-L) at $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h. Cytotoxicity was determined by the MTT assay. The results express mean percentage of control \pm S.D. of three experiments with triplicates. *** $P < 0.001$, related to control, by one-way ANOVA followed by Tukey's posttest.

2.6. Iron (II)-Chelating Activity. This assay was measured by the decrease of iron(II)-ferrozine complex [27]. The EEXs-L ($100 \mu\text{L}$) was added to an aqueous solution ($140 \mu\text{L}$) of $2.0 \text{ mM FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. After 10 min, the reaction was initiated by addition of $10 \mu\text{L}$ of 5.0 mM ferrozine solution. The absorbance at 562 nm was recorded after 10 min of reaction. Quercetin was used as a positive control of chelating activity. The negative control tube contained all the reagents, except the HEXs-L or quercetin, and presented the highest absorbance at 562 nm . The blank tube contained reagents and HEXs-L or quercetin (except ferrozine). Chelating activity (%) was determined based on the formula

$$\text{Chelating activity (\%)} = \frac{[\text{Abs control} - (\text{Abs sample} - \text{Abs blank})]}{\text{Abs control}} \times 100. \quad (1)$$

2.7. Nitric Oxide Production. Nitric oxide was indirectly determined by measuring nitrite content in the RAW 264.7 macrophage culture supernatant using Griess reagent [28]. Cells (5×10^5 /mL) were previously cultured in a 96-well plate for 24 h for adhesion. They were then treated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) and different HEXs-L concentrations (25 – 50 – $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) for more 24 h. The supernatant cell culture ($50 \mu\text{L}$) was taken from each well and incubated with $25 \mu\text{L}$ of sulfanilic acid for 10 min in the dark at room temperature. Then, $25 \mu\text{L}$ of N-(1-naphthyl)-ethylenediamine was added and the plate was incubated again for 10 min at room temperature in the dark. Finally, the absorbance was read at 550 nm (microplate reader μQuant , Bio-Tek Instruments, Inc.).

2.8. Phytochemical Analysis. The chemical characterization of the HEXs-L was achieved by electrospray ionization mass

spectrometry (ESI-MS). LCQ equipment Fleet (Thermo Scientific) was used, equipped with electron-spray source operating in negative mode with the analyzer ion trap type. The samples were diluted in $200 \mu\text{L}$ methanol for $10 \text{ mg}/\text{mL}$ concentration and injected by direct insertion. The source temperature was set at 180°C , the drying gas (nitrogen) flow rate was $4.0 \text{ L}/\text{min}$, and the nebulizer gas (nitrogen) pressure was 0.4 bar . In negative mode, the capillary voltage was 3.8 kV , the capillary exit voltage was -150 V , and the skimmers 1 and 2 voltages were 50 V and 15 V , respectively. Mass calibration was achieved by infusing ammonium formate in an isopropanol-water mixture ($1:1, \text{ v/v}$) as an external standard. The Xcalibur software was used to obtain spectra in the range of m/z 100 – 1500 . The detector was a mass spectrometer ion trap type equipped with an interface ESI and analyses were performed using a micrOTOF II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Inc., Boston, MA, USA).

2.9. Statistical Analysis. The variance analysis was assessed by one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$, using Tukey's posttest for differences between three or more experimental groups and Student's t -test between two groups. The statistical comparisons were performed using the GraphPad Prism software, version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

3. Results

3.1. The In Vitro Cytotoxicity of *X. sagittifolium* Extracts. To investigate the effect of *X. sagittifolium* extracts on leukemia cells, the cytotoxicity of both leaf (HEXs-L) and rhizome (HEXs-R) extracts ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) was evaluated on lymphocytic (Jurkat) and myelocytic (K562) leukemia cells. The results, as shown in Figure 1, indicated that treatment for 48 h with HEXs-L partially inhibited mitochondrial reduction activity (MRA) of both leukemia cell lines, with Jurkat cells

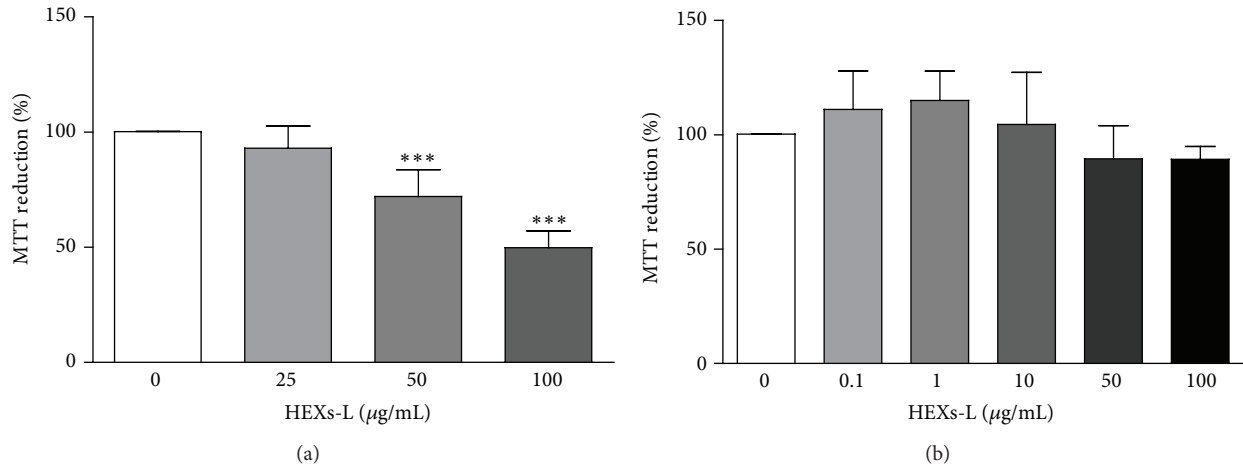


FIGURE 2: Cytotoxic effects of HEXs-L on leukemia and normal cells. (a) Jurkat cells. (b) Nontumor NIH fibroblasts. Cells were incubated in the absence (control) or presence of HEXs-L for 48 h. Cytotoxicity was determined by the MTT assay. The results express mean percentage of control \pm S.D. of three experiments with triplicates. *** $p < 0.001$, related to control, by one-way ANOVA followed by Tukey's posttest.

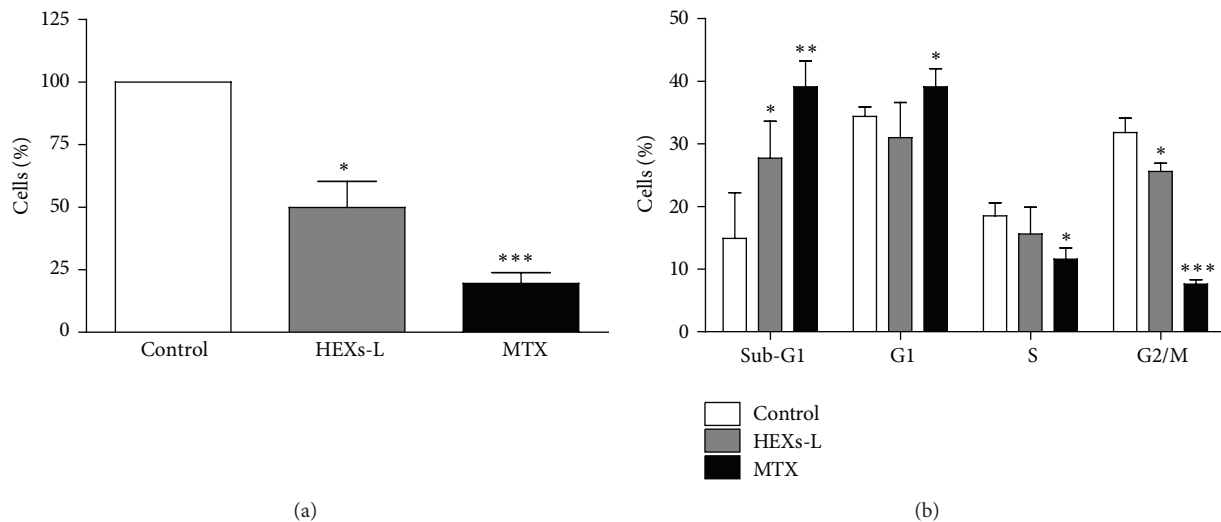


FIGURE 3: Effects of HEXs on Jurkat cell proliferation. (a) Viable cell number. (b) Cell cycle analysis. Cells (1×10^5 /mL) were treated with HEXs-L (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or MTX (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or culture medium (control) for 48 h and then counted by contrast phase microscopy and processed for cell cycle analysis by flow cytometry, as described in Materials and Methods section. The results express mean \pm S.D. of five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, related to control, by one-way ANOVA followed by Tukey's posttest.

(Figure 1(a)) presenting higher inhibition index ($33.6 \pm 10.8\%$) than K562 cells ($17.3 \pm 7.5\%$) (Figure 1(b)). HEXs-R was not cytotoxic against leukemia cells. The effects of other HEXs-L concentrations (25–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were evaluated as well, presenting IC_{50} of 95.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2(a)). HEXs-L showed no cytotoxicity against NIH/3T3 fibroblasts (Figure 2(b)).

3.2. Effects of HEXs-L on Jurkat Cell Proliferation and Apoptosis. Treatment with HEXs-L for 48 h inhibited Jurkat cell proliferation, reducing significantly (50.7%) the viable cell number, compared to control (Figure 3(a)), as observed with

methotrexate- (MTX) (80.5%) treated cultures. This HEXs-L effect was accompanied by an increase (85.9%) of cells in the sub-G1 phase and a reduction (20.0%) of cells in the G2/M phase (Figure 3(b)). These effects in the cell cycle were also observed with the MTX treatment, although at higher level than the plant extract (Figure 4(b)). In addition, MTX increased cells in the G1 phase (13%) and reduced them in the S phase (38%), compared to HEXs-L, 85.9% and 20%, respectively, as noted above.

Investigating the effects of HEXs-L (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on cell death, the percentage of early apoptotic cells was increased (54.2%), compared to control culture, while MTX induced

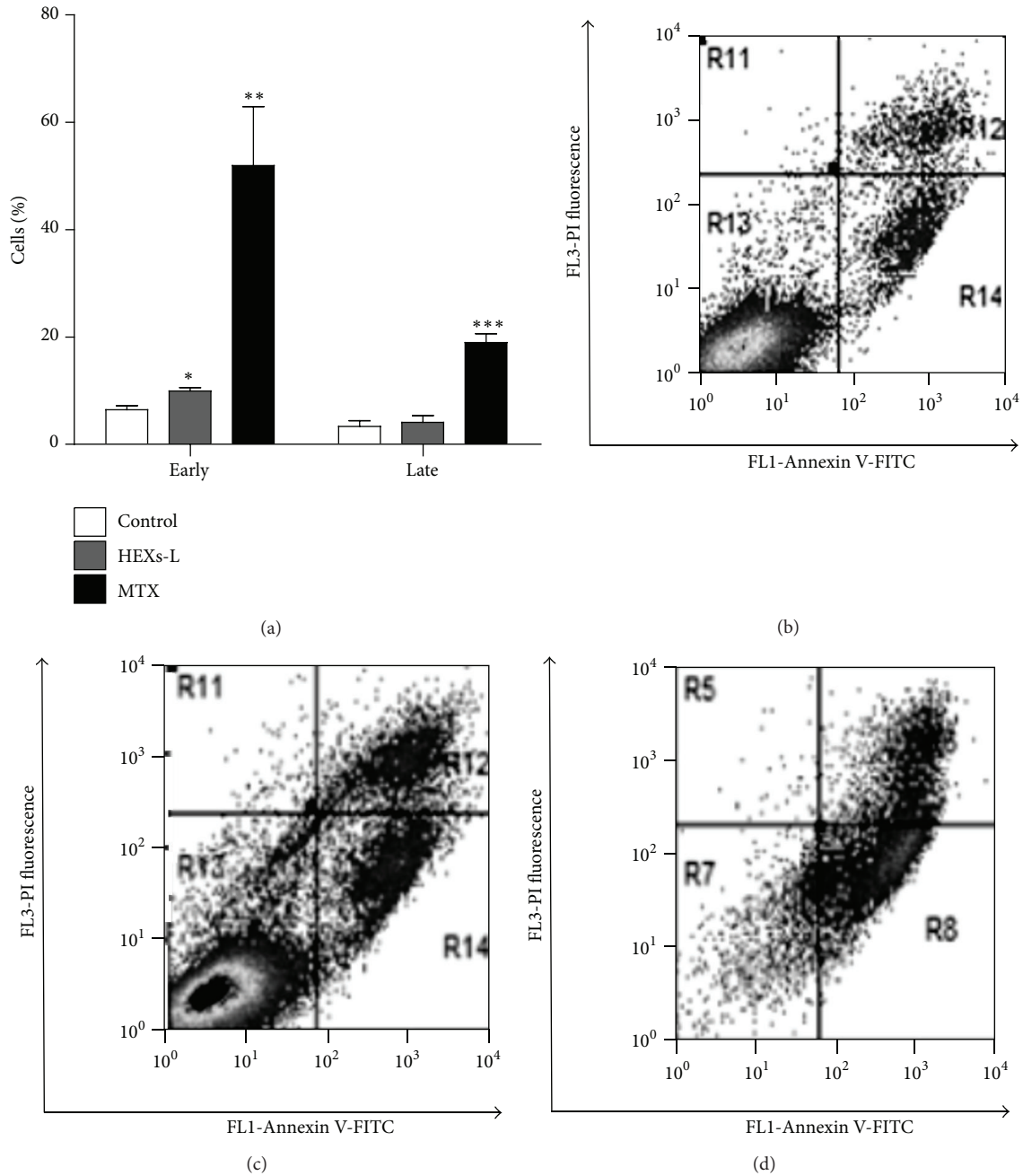


FIGURE 4: Effects of HEXs-L on Jurkat cell apoptosis by annexin-V-FITC labeling assay. (a) Early and late apoptotic cells (mean of three independent experiments). Cytograms of a representative experiment are shown in (b) control, (c) HEXs-L, and (d) MTX treated cultures. Cells (1×10^5 /mL) were treated with HEXs-L (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or MTX (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or culture medium (control) for 48 h and then processed for flow cytometric analysis of apoptosis as described in Materials and Methods section. The results in (d) express mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, related to control, by one-way ANOVA followed by Tukey's posttest.

a higher level of early (7-fold) and late (4.6-fold) apoptosis, compared to control or HEXs-L treatment (Figure 4(a)). Cytograms of a representative apoptosis experiment are also shown in Figures 4(b)–4(d).

3.3. Iron Chelation Activity and NO Production. The inflammation microenvironment, rich in reactive oxygen (ROS) and NO/peroxynitrite, and cancer promotion have been

linked. The antioxidant property of HEXs-L was then investigated by ferrous iron-chelating ability, since Fe^{2+} can lead to hydroxyl radical (OH^{\bullet}) production via Fenton reaction. The results (Figure 5) indicated a high ferrous iron-chelating ability for HEXs-L that did not differ significantly from that of quercetin, the positive control of ferrous iron-chelating activity used in this assay. HEXs-L also reduced NO production by RAW 264.7 macrophages in a concentration-dependent

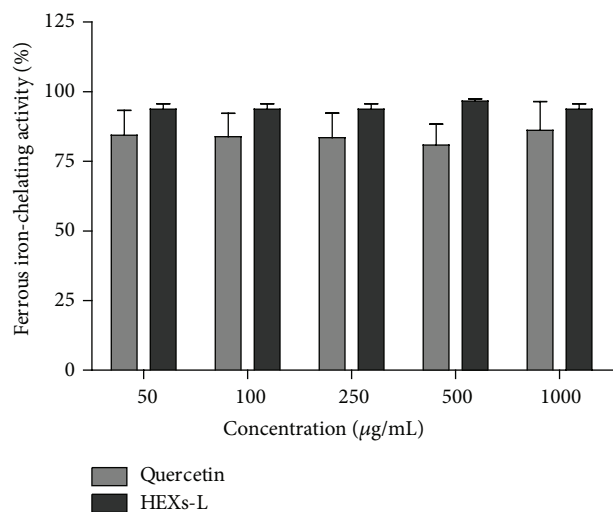


FIGURE 5: Effects of HEXs-L on iron(II)-chelating activity by the ferrozine assay. Quercetin was used as a chelating activity positive control. The results express mean \pm S.D. of three experiments with triplicates. There were no significant differences between HEXs-L and quercetin, by Student's *t*-test.

manner (Figure 6(a)), showing IC_{50} of $86.3 \mu\text{g/mL}$, without cytotoxic effects (Figure 6(b)).

3.4. Phytochemical Analysis of the HEXs-L. The chemical analysis of HEXs-L showed two substances with molecular weight of 563.1422 and 593.1530 and molecular formulae of $C_{26}H_{27}O_{14}$ and $C_{27}H_{29}O_{15}$, respectively, as major compounds, proposed as apigenin di-C-glycosides, as well as sucrose, pyroglutamic acid (5-oxoproline), and some fatty acids (palmitic, stearic, and linolenic acids) by ESI-MS (Figure 7).

4. Discussion

The present study investigated the potential effects of *X. sagittifolium* Schott extract on the *in vitro* growth of leukemia cells, NO production, and iron-chelating activity. Mitochondria play a crucial role in cell survival and function by generating most of the cell's supply of adenosine triphosphate (ATP) [29]. The inhibition of mitochondrial reduction activity by the effect of HEXs-L on leukemia cells, as observed in this work, may be related to cytotoxic substances in the leaf, but not the rhizome (HEXs-R), since even higher concentrations of HEXs-R were not toxic. Leaves of plants of the *Xanthosoma* genus have previously been recognized as containing cytotoxic compounds, showing bactericidal activity, for example, *X. robustum* extract [30], and antifungal property, for example, *X. sagittifolium* extract [21]. In addition, aerial parts of plants have been used as popular medicines to treat a broad range of diseases, including cancer [31]. The toxicity of HEXs-L to leukemia cells does not result from dimethyl sulfoxide (DMSO), since control cultures with this solvent did not alter the responses (data not shown).

The lower sensitivity of myeloid K562 leukemia cells, compared to lymphocytic Jurkat cells, to the cytotoxic effects of HEXs-L, can be attributed to the lower expression of ABCG2 receptor in Jurkat cells, an ABC membrane transporter that induces drug resistance [32]. It is important to note that the treatment of nontumor NIH/3T3 fibroblasts with HEXs-L did not reduce their viability, which is an important finding since many antineoplastic drugs are extremely cytotoxic to nontumor cells [33]. The extract of other Araceae plants, such as *Rhaphidophora korthalsii* Scott [34] and *Typhonium blumei* Nicolson & Sivad [35], did not present cytotoxic effects to normal cells or affect the sensitivity of normal cells to a lesser extent than tumor cells, respectively. Or cytotoxicity to normal cells is less significant.

Since HEXs-L was demonstrated to reduce mitochondrial function in tumor cells, we evaluated if the extract could also inhibit Jurkat cell proliferation or only its activation. It was found that HEXs-L significantly reduced the number of Jurkat cells in the culture. This inhibitory effect on leukemia cell proliferation was corroborated by a decrease in the percentage of cells in the G2/M phase.

Iron is essential for neoplastic cell proliferation; it participates in DNA synthesis and macromolecule biosynthesis; accordingly neoplastic cells have a high iron requirement [36]. In the absence of iron, cells are unable to progress in the cell cycle. Recently, the role of iron chelation as antitumor agents has been investigated by targeting ribonucleotide reductase, the enzyme responsible for deoxyribonucleotide synthesis, which is the iron dependent enzyme involved in the rate limiting phase of DNA synthesis [37–39]. Therefore, we also studied the iron-chelating property of HEXs-L, which showed a high level of this activity. Meanwhile, other studies have shown that treatment with HEXs-L may result in a lower concentration of cellular deoxyribonucleotides in tumor cells, impairing their ability to complete the S phase of cell cycle. Consequently, cell growth and preparation for cell division would be curtailed in G2, leading to unsuccessful mitosis and cytokinesis in M phase, as described for the desferrioxamine, an iron-chelating agent that binds free iron in a stable complex, which is currently used to treat iron-overload disease and tumor cell growth [40–42]. Since several reports have also revealed the antiproliferative activity of desferrioxamine [43, 44], this hypothesis needs further investigation, which, however, is beyond the scope of the present report.

The increased number of leukemia cells in the sub-G1 phase after treatment with HEXs-L is an indication of DNA fragmentation in these cells. Since apoptosis is frequently associated with cell cycle arrest [45] and since apoptotic cells also show DNA fragmentation, we decided to investigate the effects of HEXs-L on the induction of apoptosis. Apoptosis is also characterized by other biochemical events, such as surface exposure of phosphatidylserine phospholipid (Ptd-L-Ser), mitochondrial membrane permeabilization, and activation of caspases [46]. Therefore, Jurkat cell apoptosis was evaluated by the surface exposure of Ptd-L-Ser. To accomplish this by performing flow cytometry and based on the increased number of Annexin V-positive cells, HEXs-L treatment was confirmed to induce apoptosis in Jurkat cells. This result is important because hyperproliferative conditions,

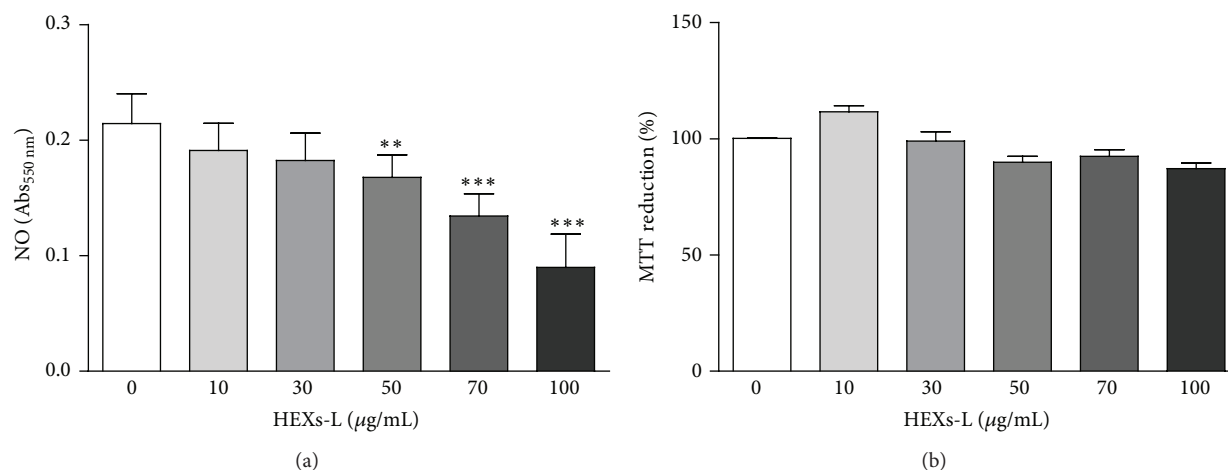


FIGURE 6: Effects of HEXs-L on RAW 264.7 macrophages. (a) NO production. (b) Cytotoxicity. Cells (5×10^5 /mL) were treated or not with HEXs-L for 24 h and NO was then indirectly estimated in culture supernatant by nitrite determination (Griess reaction) and cell cytotoxicity was evaluated by MTT assay. The results express mean \pm S.D. of three experiments with triplicates. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, related to control, by one-way ANOVA followed by Tukey's posttest.

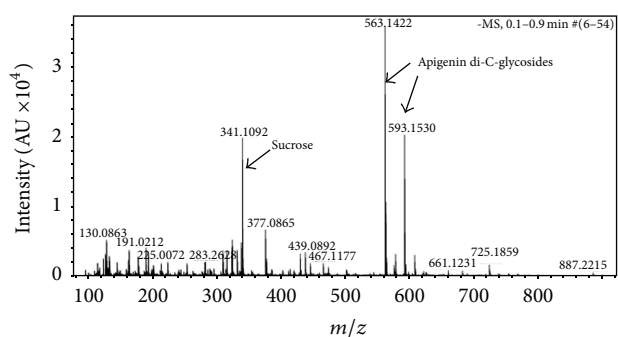


FIGURE 7: The electron-spray ionization (ESI) mass spectrum of 70% hydroalcoholic extract of *Xanthosoma sagittifolium* leaves. MS data were acquired in the negative ionization mode. The mass detector was an ion trap spectrometer equipped with an ESI interface. All data were analyzed using Bruker Daltonics ESI Compass Data Analysis version 4.0 SP1 (Bruker Daltonics Inc., MA, USA).

such as autoimmune disease and cancer, are frequently associated with apoptosis impairment [46] while the induction of apoptosis is found as a mechanism of action for many traditional antineoplastic drugs [47].

Although low concentration of NO mediates important physiological processes [48] high levels play crucial role in antimicrobial and antiviral responses [49] and can trigger oxidative stress, chronic inflammation [50], and nitrosylation, in particular S-nitrosylation of mitochondrial caspase-8, caspase-9, and Bcl-2 results in the inhibition of apoptosis of tumor cells [51]. The reduction of the NO level in the culture supernatant of LPS-stimulated macrophages by treatment with HEXs-L, as described for other plants of the Araceae family [52], may represent an important finding since reduction of nitrosylation of caspases would, in turn, lead to the activation of caspases to cleave cellular organisms in the cell and cause apoptosis, thus contributing to the surveillance of

tumor cell promotion/progression. Additionally, NO mediates inflammation and epidemiological studies have shown that chronic inflammation predisposes individuals to different types of cancer [53]. Many studies reporting on cancer development have focused on inflammation as a potential mechanism underlying the disease in its early stages [53]. Inhibition of NO production by HEXs-L can also represent a potential mechanism of inhibiting tumorigenesis.

Redox homeostasis is important for cell survival because it regulates the functions of transcription factors, signal transduction pathways, and mediators of cell proliferation and death [54]. High levels of ROS and NRS lead to oxidative stress and deleterious modifications to DNA, lipids, and proteins [55], inducing chronic inflammation and, potentially, cancer. Thus, the presence of free Fe^{2+} , for example, can, through Fenton's reaction, lead to hydroxyl radical (OH^\bullet) production, contributing to oxidative stress [56]. Furthermore, NO can react with superoxide, which results in the production of peroxynitrite, a more powerful oxidant. In this context, HEXs-L presents the property of chelating free Fe^{2+} which can promote antitumor activity by reducing ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis, as well as reducing cell damage by oxidative stress, thus avoiding chronic inflammation and/or cancer development [56].

The use of plants as a source of phytochemical compounds in therapeutic medicine is increasingly being recognized [57]. In addition, flavonoids can affect the cell cycle regulation of cancer cells and apigenin glycoside has been found to be one of them [58]. The phytochemical analysis of HEXs-L by ESI-MS identified apigenin diglycosides as major compounds, corroborating reports [59, 60] that plants of this family are rich in apigenin and other flavonoids. Interestingly, apigenin and apigenin derivatives have previously been reported to inhibit the proliferation of leukemia cells [47, 61] chelating free Fe^{2+} , induce leukemia apoptosis [62], and inhibit NO production [63]. Flavonoids are a group of natural

compounds found in plants with variable phenolic structures. Their mechanisms of action can include scavenging superoxide, H₂O₂, nitric oxide, and hydroxyl radicals [64, 65]. Furthermore, flavonoid antioxidant capacity involves combined effect of radical scavenging activity, interaction with enzyme functions, or chelating elements involved in free radical generation [65]. In summary, *Xanthosoma sagittifolium* contains apigenin glycosides as major compounds and shows important biological activities, including Fe²⁺ chelation, inhibition of NO production, and inhibition of leukemia cell proliferation, mechanisms reported for traditional antitumor agents [66]. However, while antitumor activity may result from the presence of apigenin glycosides in the HEXS-L, it is also likely that other phytochemical compounds in the extract could be associated with this activity, as well as other biological effects noted above.

5. Conclusions

For the first time, the present work describes the antitumor activities of hydroethanolic extract of *Xanthosoma sagittifolium* Schott (taioba) leaves, including Fe²⁺ chelation, inhibition of NO production, and inhibition of leukemia cell proliferation. These properties may principally result from the presence of apigenin glycosides in HEXS-L. Therefore, by revealing the chelating activity of *Xanthosoma sagittifolium* leaf extract, as well as its antitumor activity, including cell cycle arrest and the induction of apoptosis, this work has provided evidence that taioba leaves may have practical application in cancer therapy.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

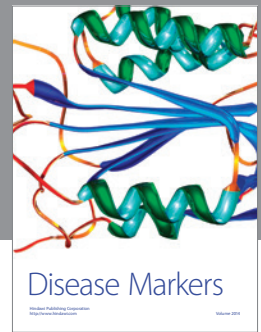
The authors thank Fernanda Cristina Jordão Magalhães and the staff of LIA-BPPN for technical assistance. This work was supported by grants from FAPERJ (E26/101.478/2010, TCT-E26/102.211/2010), Rio de Janeiro, Brazil.

References

- [1] H. Kim, J. Y. Moon, A. Mosaddik, and S. K. Cho, "Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 8-9, pp. 2435-2442, 2010.
- [2] INCA, Instituto Nacional do Câncer, (Brazilian National Cancer Institute), 2014, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
- [3] Goodman & Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 11th edition, 2006.
- [4] S. Cipolat, B. B. Pereira, and F. Vargas, "Fisioterapia em Pacientes com Leucemia: Revisão Sistemática," *Revista Brasileira de Cancerologia*, vol. 2, no. 57, pp. 229-236, 2011.
- [5] A. J. M. Ferreri, I. Ernberg, and C. Copie-Bergman, "Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects," *Journal of Internal Medicine*, vol. 265, no. 4, pp. 421-438, 2009.
- [6] T. Chiba and H. Marusawa, "A novel mechanism for inflammation-associated carcinogenesis; an important role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in mutation induction," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 87, no. 10, pp. 1023-1027, 2009.
- [7] S. Shukla, A. Mehta, J. John, S. Singh, P. Mehta, and S. P. Vyas, "Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 8, pp. 1848-1851, 2009.
- [8] F. Farinati, M. Piciocchi, E. Lavezzo, M. Bortolami, and R. Cardin, "Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase induction in carcinogenesis," *Digestive Diseases*, vol. 28, no. 4-5, pp. 579-584, 2010.
- [9] M. A. Ebrahimzadeh, S. F. Nabavi, S. M. Nabavi, and F. Pourmorad, "Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants," *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 32, pp. 5212-5217, 2010.
- [10] Y. Yu, J. Wong, D. B. Lovejoy, D. S. Kalinowski, and D. R. Richardson, "Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to triapine and beyond," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 23, pp. 6876-6883, 2006.
- [11] T. F. Tam, R. Leung-Toung, W. Li, Y. Wang, K. Karimian, and M. Spino, "Iron chelator research: past, present, and future," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 12, pp. 983-995, 2003.
- [12] M. Gharagozloo, Z. Khoshdel, and Z. Amirghofran, "The effect of an iron (III) chelator, silybin, on the proliferation and cell cycle of Jurkat cells: a comparison with desferrioxamine," *European Journal of Pharmacology*, vol. 589, no. 1-3, pp. 1-7, 2008.
- [13] D. R. Richardson, "Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 42, no. 3, pp. 267-281, 2002.
- [14] D. Hileti, P. Panayiotidis, and A. V. Hoffbrand, "Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells," *British Journal of Haematology*, vol. 89, no. 1, pp. 181-187, 1995.
- [15] B. Halliwell, "Antioxidants and human disease: a general introduction," *Nutrition Reviews*, vol. 55, no. 1, pp. S44-S49, 1997.
- [16] P. S. Rao, M. Ramanadham, and M. N. V. Prasad, "Anti-proliferative and cytotoxic effects of *Strychnos nux-vomica* root extract on human multiple myeloma cell line—RPMI 8226," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 2, pp. 283-288, 2009.
- [17] E. D. A. Jackix, E. B. Monteiro, H. F. Raposo, E. C. Vanzela, and J. Amaya-Farfán, "*Taioba* (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves: nutrient composition and physiological effects on healthy rats," *Journal of Food Science*, vol. 78, no. 12, pp. H1929-H1934, 2013.
- [18] E. F. Carvalho and J. A. D. Cordeiro, "Um método alternativo e eficiente de propagação vegetativa de inhame (*Colocasia esculenta* (L.) Schott e de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)," *Acta Amazonica*, vol. 20, pp. 11-18, 1990.
- [19] N. A. V. D. Pinto, V. D. de Carvalho, A. D. Corrêa, and A. de Oliveira Rios, "Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott)," *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 25, pp. 601-604, 2001.
- [20] G. L. de Oliveira, L. H. C. Andrade, and A. F. M. de Oliveira, "*Xanthosoma sagittifolium* and *Laportea aestuans*: species used to prevent osteoporosis in Brazilian traditional medicine," *Pharmaceutical Biology*, vol. 50, no. 7, pp. 930-932, 2012.

- [21] G. Schmourlo, R. R. Mendonça-Filho, C. S. Alviano, and S. S. Costa, "Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 96, no. 3, pp. 563–568, 2005.
- [22] L. Guo, J. Z. Wu, T. Han, T. Cao, K. Rahman, and L.-P. Qin, "Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*," *Molecules*, vol. 13, no. 9, pp. 2114–2125, 2008.
- [23] L.-L. Xu, T. Han, J.-Z. Wu et al., "Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of Panax ginseng and its endophytic fungus," *Phytomedicine*, vol. 16, no. 6-7, pp. 609–616, 2009.
- [24] J. Ramírez, L. Svetaz, J. Quiroga et al., "Synthesis of novel thiazole-based 8,9-dihydro-7H-pyrimido[4,5-b][1,4]diazepines as potential antitumor and antifungal agents," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 92, pp. 866–875, 2015.
- [25] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.
- [26] M. F. Pereira, T. Martino, S. R. Dalmau et al., "Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression," *Oncology Reports*, vol. 25, no. 1, pp. 215–221, 2011.
- [27] T. Wang, R. Jónsdóttir, and G. Ólafsdóttir, "Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds," *Food Chemistry*, vol. 116, no. 1, pp. 240–248, 2009.
- [28] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [29] B. A. Fowler, K. M. Kleinow, K. S. Squibb, G. W. Lucier, and W. Hayes, "Organelles as tools in toxicology," in *Principles and Methods in Toxicology*, A. W. Hayes, Ed., pp. 1201–1230, Raven Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 1994.
- [30] T. Kato, B. Frei, M. Heinrich, and O. Sticher, "Antibacterial hydroperoxysterols from *Xanthosoma robustum*," *Phytochemistry*, vol. 41, no. 4, pp. 1191–1195, 1996.
- [31] R. A. Kumar, K. Sridevi, N. V. Kumar, S. Nanduri, and S. Rajagopal, "Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 92, no. 2-3, pp. 291–295, 2004.
- [32] B. E. Bernstein, A. Meissner, and E. S. Lander, "The mammalian epigenome," *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 669–681, 2007.
- [33] A. Nishanthini and V. R. Mohan, "Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* Schott using various *in vitro* assay models," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, no. 3, supplement, pp. S1701–S1706, 2012.
- [34] S. K. Yeap, N. B. Alitheen, A. M. Ali et al., "Effect of *Rhaphidophora korthalsii* methanol extract on human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation and cytolytic activity toward HepG2," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114, no. 3, pp. 406–411, 2007.
- [35] H. F. Hsu, K. H. Huang, K. J. Lu et al., "Typhonium blumei extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 2, pp. 492–500, 2011.
- [36] J. L. Heath, J. M. Weiss, C. P. Lavau, and D. S. Wechsler, "Effects of iron depletion on CALM-AF10 leukemias," *Experimental Hematology*, vol. 42, no. 12, pp. 1022–1030, 2014.
- [37] N. Chenoufi, B. Drénou, O. Loréal, C. Pigeon, P. Brissot, and G. Lescoat, "Antiproliferative effect of deferiprone on the Hep G2 cell line," *Biochemical Pharmacology*, vol. 56, no. 4, pp. 431–437, 1998.
- [38] D.-H. Lee, P. S. Jang, N. G. Chung, B. Cho, D. C. Jeong, and H. K. Kim, "Deferasirox shows *in vitro* and *in vivo* antileukemic effects on murine leukemic cell lines regardless of iron status," *Experimental Hematology*, vol. 41, no. 6, pp. 539–546, 2013.
- [39] S. Sen, D. C. Hassane, C. Corbett, M. W. Becker, C. T. Jordan, and M. L. Guzman, "Novel mTOR inhibitory activity of ciclopirox enhances parthenolide antileukemia activity," *Experimental Hematology*, vol. 41, no. 9, pp. 799–807, 2013.
- [40] T. B. Chaston, D. B. Lovejoy, R. N. Watts, and D. R. Richardson, "Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 1, pp. 402–414, 2003.
- [41] J. J. Lucas, A. Szepesi, J. Domenico et al., "Effects of iron-depletion on cell cycle progression in normal human T lymphocytes: selective inhibition of the appearance of the cyclin A-associated component of the p33cdk2 kinase," *Blood*, vol. 86, no. 6, pp. 2268–2280, 1995.
- [42] E. Porreca, S. Ucchino, C. Di Febbo et al., "Antiproliferative effect of desferrioxamine on vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*," *Arteriosclerosis and Thrombosis*, vol. 14, no. 2, pp. 299–304, 1994.
- [43] E. E. Voest, G. Vreugdenhil, and J. J. M. Marx, "Iron-chelating agents in non-iron overload conditions," *Annals of Internal Medicine*, vol. 120, no. 6, pp. 490–499, 1994.
- [44] S. T. Wang, K. L. Jin, and T. H. Li, "The inhibitory effect of desferrioxamine on DNA synthesis in human lymphocytes," *Chinese Medical Journal*, vol. 102, no. 12, pp. 902–905, 1989.
- [45] W. Piao, J. Yoo, D. K. Lee, H. J. Hwang, and J. H. Kim, "Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new synthetic anti-cancer agent, DW2282, in promyelocytic leukemia (HL-60) cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 62, no. 11, pp. 1439–1447, 2001.
- [46] O. Kepp, L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, and G. Kroemer, "Cell death assays for drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 3, pp. 221–237, 2011.
- [47] J. Chen, Z. Li, C. Liu, and L. Yin, "The apoptotic effect of apigenin on human gastric carcinoma cells through mitochondrial signal pathway," *Tumor Biology*, vol. 35, pp. 7719–7726, 2014.
- [48] C. de Palma and E. Clementi, "Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair," *Molecular Neurobiology*, vol. 46, no. 3, pp. 682–692, 2012.
- [49] K. Punturee, C. P. Wild, and U. Vinitketkumneun, "Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 95, no. 2-3, pp. 183–189, 2004.
- [50] D. R. Napolitano, J. R. Mineo, M. A. de Souza, J. E. de Paula, L. S. Espindola, and F. S. Espindola, "Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 99, no. 1, pp. 37–41, 2005.
- [51] E. A. Grimm, A. G. Sikora, and S. Ekmekcioglu, "Molecular pathways: inflammation-associated nitric-oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 20, pp. 5557–5563, 2013.

- [52] O. K. Kim, A. Murakami, Y. Nakamura, and H. Ohigashi, "Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells," *Cancer Letters*, vol. 125, no. 1-2, pp. 199–207, 1998.
- [53] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 436–444, 2008.
- [54] F. Dajas, "Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 143, no. 2, pp. 383–396, 2012.
- [55] V. Fuchs-Tarlovsky, "Role of antioxidants in cancer therapy," *Nutrition*, vol. 29, no. 1, pp. 15–21, 2013.
- [56] S. Liu, J. Sun, L. Yu et al., "Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts," *Food Chemistry*, vol. 134, no. 4, pp. 1885–1891, 2012.
- [57] J. A. Badmus, O. E. Ekpo, A. A. Hussein, M. Meyer, and D. C. Hiss, "Antiproliferative and apoptosis induction potential of the methanolic leaf extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 756482, 11 pages, 2015.
- [58] S. M. Meeran and S. K. Katiyar, "Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents," *Frontiers in Bioscience*, vol. 13, no. 6, pp. 2191–2202, 2008.
- [59] C. A. Williams, J. B. Harborne, and S. J. Mayo, "Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family araceae," *Phytochemistry*, vol. 20, no. 2, pp. 217–234, 1981.
- [60] P. Picerno, T. Mencherini, M. R. Lauro, F. Barbato, and R. Aquino, "Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 22, pp. 6423–6428, 2003.
- [61] A. A. Mahbub, C. L. L. Maitre, S. L. Haywood-Small, G. J. McDougall, N. A. Cross, and N. Jordan-Mahy, "Differential effects of polyphenols on proliferation and apoptosis in human myeloid and lymphoid leukemia cell lines," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 1601–1613, 2013.
- [62] S. Solmaz, A. A. Gokbulut, B. Cincin et al., "Therapeutic potential of apigenin, a plant flavonoid, for imatinib-sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells," *Nutrition and Cancer*, vol. 66, no. 4, pp. 599–612, 2014.
- [63] Z.-G. Yang, L.-N. Jia, Y. Shen, A. Ohmura, and S. Kitanaka, "Inhibitory effects of constituents from *Euphorbia lunulata* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells," *Molecules*, vol. 16, no. 10, pp. 8305–8318, 2011.
- [64] S. C. Thomasset, D. P. Berry, G. Garcea, T. Marczylo, W. P. Steward, and A. J. Gescher, "Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties," *International Journal of Cancer*, vol. 120, no. 3, pp. 451–458, 2007.
- [65] S. Kumar and A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages, 2013.
- [66] K. T. Papazisis, D. Zambouli, O. T. Kimoundri et al., "Protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with γ -irradiation," *Cancer Letters*, vol. 160, no. 1, pp. 107–113, 2000.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>

