



Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Thiago Silva de Almeida

**Identificação, Atividade Antioxidante e Análise Toxicogenômica de Compostos
Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd.**

Fortaleza – CE

2016

Thiago Silva de Almeida

**Identificação, Atividade Antioxidante e Análise Toxicogenômica de Compostos
Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd.**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ana Fontenele Urano
Carvalho

Co-Orientador: Prof. PhD. Adrianus Antonius Cornelis
Maria Peijnenburg

Fortaleza – CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A451i Almeida, Thiago Silva de.
Identificação, Atividade Antioxidante e Análise Toxicogenômica de Compostos Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd. / Thiago Silva de Almeida. – 2016.
214 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
Coorientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.
1. Pajeú. 2. CLAE. 3. antioxidante intracelular. 4. bioinformática. 5. expressão gênica diferenciada. I.
Título.

CDD 572

Thiago Silva e Almeida

**Identificação, Atividade Antioxidante e Análise Toxicogenômica de Compostos
Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd.**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

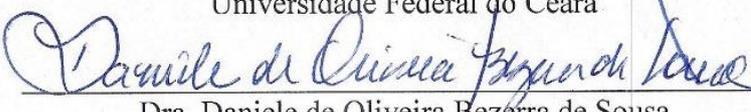
Área de concentração: Bioquímica Vegetal

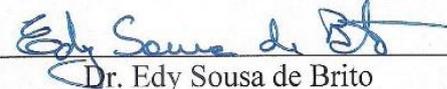
Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

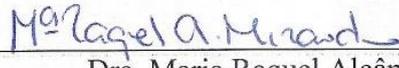
Aprovada em: 02 / 09 / 2016

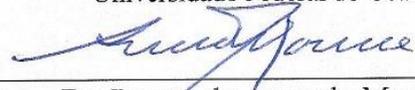
BANCA EXAMINADORA


Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará


Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará


Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical


Dra. Maria Raquel Alcântara Miranda
Universidade Federal do Ceará


Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza

Fortaleza – CE

2016

Dedico à ciência

AGRADECIMENTOS

Aos animais e plantas utilizados nesse estudo, pelo sacrifício de suas vidas em prol da ciência e do desenvolvimento tecnológico.

Aos meus pais **José Tarcísio Rodrigues de Almeida** e **Maria Edleusa Silva de Almeida** que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente na carreira acadêmica.

Aos meus irmãos **Denise Silva de Almeida Hissa** e **Talysson Silva de Almeida**, meus grandes companheiros com quem compartilho muitos dos momentos mais felizes de que tenho memória, sei que posso contar com eles sempre que eu precisar.

Aos meus avós, **Maria Irenilce Silva Costa** e **Antônio Nunes da Costa**, por todo apoio, incentivo, confiança e amor. A minhas tias e tios, que sempre me tratam como um irmão e sempre estão dispostos a me ajudar sendo grandes apoios em minha caminhada.

A minha orientadora **Profa. Dra Ana Fontenelle Urano Carvalho**, primeiramente por ter confiado em meu trabalho e por todos os ensinamentos, amizade, paciência, dedicação e incentivo na busca de informações.

Ao Co-orientador; **Prof. Dr Davi Felipe Farias**, sempre ajudando e me guiando durante todo o doutorado, como um grande amigo.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Bioquímica** na pessoa do Coordenador **Bruno Anderson Matias da Rocha** e aos professores e secretários que compõem o corpo docente e de trabalho do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec): Emanuel Francelino, Jackeline Medeiros, João Carlos, Joaquim Lopes, Lady Clarissa Rocha Bezerra, Leonardo Rogério Vieira, Luiz Carlos Almeida Filho, Nathanna Matheus, Thaís Borges, que foram a minha segunda família durante todo o período do meu doutorado, pessoas com as quais dividi grandes momentos. Um agradecimento especial a Igor Parra Pessoa, temos

pontos de vista divergentes em praticamente qualquer assunto discutível, mas sua ajuda, competência e companheirismo foram vitais para o desenvolvimento deste trabalho.

Dois grandes amigos de vida profissional e pessoal, Pedro Matheus Souza Tabosa e Lucas Dias. Vivemos grandes momentos juntos e espero que ainda tenhamos uma amizade duradoura.

Agradeço a todo o grupo do RIKILT, meus supervisores Geert Stoopen, Astrid Hamers e Peter Hendriksen. Os colegas Liza Portier, Corina Smits, Meika, Maria, Wenjie Yang e Chantal Giesen. Todos me ajudaram muito durante o meu estágio na Holanda, sem eles eu não conseguiria ter realizado o trabalho, suas ajudas e apoio foram fundamentais. Em particular, eu gostaria de agradecer ao professor Ad Peijnenburg que aceitou o desafio de me guiar durante o estágio, me orientou e ajudou, não só profissionalmente, mas também pessoalmente, obrigado novamente.

As minhas grandes amigas que conheci durante minha estadia na Holanda **Anna Patricia Florentino e Loiane Alves**, ambas grandes companheiras de jornada com quem compartilhei grandes momentos e com quem desejo manter amizade enquanto possível.

Outra grande companheira a quem eu tenho muito a agradecer é a **Marina Kim**, ela me ajudou muito com o inglês, sempre tirando minhas dúvidas e fazendo correções, além disso foi uma ótima vizinha e uma companheira de passeios perfeita. Poucas vezes encontrei pessoa mais simpática e gentil, apesar da distância gostaria muito de manter a sua amizade.

Agradeço a **Terezinha Maria de Souza**, que me ajudou enquanto eu estava na Holanda e mesmo depois me ajudou com os processamentos dos dados, muito obrigado.

Mariana Reis, não tenho palavras para agradecer toda a ajuda que você me deu, sem você eu com certeza não conseguiria realizar todas as análises que foram feitas. Sempre

paciente e solícita, uma pessoa com quem qualquer um gostaria de trabalhar e quer manter perto, obrigado por tudo.

Ao meu namorado **Jeffrey van Beveren**, por seu companherismo, carinho, incentivo e principalmente pela sua paciência que me ajudaram a seguir em frente. Você é muito especial para mim.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha história e tiveram sua parcela de contribuição, mas que por ventura eu tenha esquecido de citar.

Obrigado a todos!!!

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O AUXÍLIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES

Este trabalho foi financiado com recursos do Projeto A0006_2013-Pesquisador Visitante Especial, vingente de agosto de 2013 a agosto de 2016, intitulado “Aplicação da Toxicogenômica para Avaliação de Risco de Moléculas Bioativas com Potencial Biotecnológico” e foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de doutorado concedida ao candidato e por auxílios de pesquisa concedidos ao grupo de pesquisa.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e tecnológico (FUNCAP), pelos convênios estabelecidos ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Ministério da Ciência e Tecnologia, através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiamento de projetos.

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) da Universidade Federal do Ceará, onde foi desenvolvido parte dos experimentos de determinação de atividade antioxidante e de fitoquímicos.

Laboratório de Pesquisa Fitoquímica do Departamento de Indústria Farmacêutica localizado na Universidade Federal de Santa Maria, onde foram realizadas análises cromatográficas.

RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre, onde foram feitos ensaios de toxicidade, genômica e atividade antioxidante.

“The nitrogen in our DNA,
The calcium in our teeth,
The iron in our blood,
The carbon in our apple pies were made in the interiors of collapsing stars.
We are all made of starstuff.”

Carl Sagan

RESUMO

Antioxidantes podem atuar no tratamento de diversas doenças relacionadas com estresse oxidativo. A Caatinga, bioma da região Nordeste, possui uma vegetação adaptada a condições adversas que influenciam no aumento da concentração de antioxidantes. *Triplaris gardneriana* Wedd. (Poligonaceae), conhecida como Pajeú, é utilizada no tratamento de doenças venéreas e inflamações intestinais. Este trabalho objetiva obter o extrato etanólico e frações das sementes de pajeú e identificar os compostos fenólicos, e avaliar suas atividades antioxidante e toxicidade. A composição química foi avaliada por quantificação de flavonoides, fenóis e taninos totais e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O potencial antioxidante foi avaliado através do ensaio de sequestro de radicais livres DPPH (difetil-picril-hidrazil), inibição da peroxidação lipídica, capacidade quelante de ferro e avaliação da capacidade de prevenir o estresse e restaurar o balanço oxidativo em células. A toxicidade foi avaliada através de atividade hemolítica, citotoxicidade frente a nauplios de *Artêmia sp.*, citotoxicidade frente a células carcinogênicas de mama (MCF7) e intestino (Caco 2), avaliação da alteração da expressão gênica em células MCF 7 expostas às amostras por 6 h. Foram identificados 4 ácidos fenólicos e 8 flavonoides através da CLAE, muitos descritos pela primeira vez para a espécie. A fração metanólica apresentou os melhores resultados para o DPPH (CN₅₀ 11,45 µg/mL). A fração acetato apresentou o melhor resultado na inibição da peroxidação lipídica (CI₅₀ 6,14 µg/mL). A fração acetato teve o melhor desempenho na capacidade quelante (48% de complexação à 1,000 µg/mL). O extrato etanólico protegeu células MCF 7 contra o estresse oxidativo restaurou o equilíbrio oxidativo após o estresse já ter sido estabelecido. A Atividade hemolítica do extrato foi fraca, com valores máximos de 40%. Frente aos nauplios de *Artêmia sp* o extrato apresentou CL₅₀ de 67,85 µg/mL. O Extrato mostrou valores baixos de toxicidade frente ambas linhagens celulares e alterou na toxicogenômica uma quantidade pequena de genes (14 genes, 0,22% do total), os principais atuam na interação com vários tipos de vírus (IFIT1, MX1, OAS1), os mesmos genes foram alterados pela quercetina, um flavonoide presente no extrato. Drogas com assinatura gênica semelhante ao apresentado pelo extrato, tem função antimicrobiana, que é uma característica de compostos fenólicos como os identificados no extrato. Assim, o presente estudo contribuiu para a identificação de novas moléculas bioativas com potencial antioxidante, com baixo risco de uso e que podem ser úteis como potenciais fitoterápicos. **Palavras chave:** Pajeú, CLAE, antioxidante intracelular, bioinformática, expressão gênica diferenciada

ABSTRACT

Antioxidants can act in the treatment of various diseases related to oxidative stress. The Caatinga biome from Northeast, has a vegetation adapted to adverse conditions that can increase the concentration of antioxidants. *Triplaris gardneriana* Wedd. (Poligonaceae), known as Pajeú is used in the treatment of venereal disease and intestinal inflammation. This work aims to obtain the ethanol extract and fractions of Pajeú seeds and identify the phenolic compounds, and evaluate its antioxidant and toxicity activities. The chemical composition was assessed by quantification of flavonoids, phenolics and tannins and by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant potential was assessed by testing scavenging free radical DPPH (diphenyl-picryl-hydrazyl), inhibition of lipid peroxidation, iron chelator capacity and assessment of the ability to prevent stress and restore the oxidative balance in cells. Toxicity was assessed by hemolytic activity, cytotoxicity using *Artemia* sp., Cytotoxicity against breast (MCF7) and intestinal (Caco 2) carcinogenic cells, evaluation of the alteration of gene expression in exposed MCF7 cells to samples for 6 h. Were identified 4 phenolic acids and 8 flavonoids by HPLC, many of these are being described for the first time for this specie. The methanol fraction showed the best results for DPPH (NC50 11.45 $\mu\text{g/mL}$). The acetate fraction showed the best result in the inhibition of lipid peroxidation (IC50 6.14 $\mu\text{g/mL}$). The ethyl acetate fraction had the best performance in the chelating ability (48% complexation to 1.000 $\mu\text{g/mL}$). The ethanol extract protected MCF 7 cells against oxidative stress and was able to restore the oxidative balance after stress have already been established. Haemolytic activity was weaker by the extract with maximum values of 40%. Front of *Artemia* sp the extract showed LC50 67.85 mg / mL. The extract showed low toxicity values against both cell lines and changed in toxicogenomics a small number of genes (14 genes, 0.22% of total), the main act in the interaction with various types of viruses (IFIT1, MX1, OAS1), the same genes were altered in the same way by quercetin, a flavonoid present in the extract. Drugs with similar gene signature submitted by the extract has the antimicrobial function, which is a characteristic of phenolic compounds such as those identified in the extract. Thus, this study contributed to the identification of novel bioactive molecules with antioxidant activity, with low risk of use and which may be useful as potential phytotherapeutic. **Keywords:** Pajeú, HPLC, intracellular antioxidant, Bioinformatic, Differentiated gene expression.

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Capítulo I

Figura 1.1 -	Reação de Fenton - Descreve a formação de radicais livres a partir da interação entre o ferro e o peróxido de hidrogênio.....	27
Figura 1.2 -	Reação de Haber-Weiss - Descreve a formação de radicais livres a partir da interação entre o ferro e espécies reativas de oxigênio.....	27
Figura 1.3 -	A) Mecanismo de reação antioxidante por doação de hidrogênio através de ruptura homolítica; B) Mecanismo de ação antioxidante por doação de elétrons.....	32
Figura 1.4 -	Representação dos possíveis sítios de interação entre metais e flavonoides.....	33
Figura 1.5 -	Representação da estrutura das folhas, flores e frutos de <i>Triplaris gardneriana</i> Wedd.....	39
Figura 1.6 -	Fotografia dos frutos e da árvore de <i>Triplaris gardneriana</i> Wedd..	40

Capítulo II

Fluxograma 2.1 -	Fluxograma 2.1: Atividades previstas para o desenvolvimento do projeto de pesquisa subdividido em três linhas principais: análises químicas, atividade antioxidante e toxicidade in vitro.....	59
Figura 2.1 -	Mapa ilustrativo da cidade local de coleta.....	60
Figura 2.2 -	Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico de sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>	73
Figura 2.3 -	Estrutura dos ácidos fenólicos identificados em sementes de <i>T. gardneriana</i>	74
Figura 2.4 -	Estrutura dos flavonoides identificados nas sementes de <i>T. gardneriana</i>	75
Figura 2.5 -	Uma das possíveis vias de biossíntese de ácidos fenólicos.....	86
Figura 2.6 -	Via de biossíntese de catequinas a partir dos carboidratos.	87
Figura 2.7 -	Via de biossíntese de alguns flavonoides.....	88

Capítulo III

Fluxograma 3.1 -	Atividades previstas para o desenvolvimento das análises de toxicidade de <i>Triplaris gardneriana</i>	105
Figura 3.1 -	Representação gráfica da quantidade de genes alteradas por cada amostra.....	127
Figura 3.2 -	Mapa de expressão gênica que mostra a expressão diferenciada de células MCF 7 quando exposta por 6 h às amostras menos a quercetina.....	129
Figura 3.3 -	Mapa de expressão gênica que mostra a expressão diferenciada de células MCF 7 quando expostas por 6 h a todas as amostras.....	130
Figura 3.4 -	Mapa de expressão gênica que mostra genes de células MCF 7 subexpressos quando exposto por 6 h às amostras; gênica.....	131
Figura 3.5 -	Mapa de expressão gênica que mostra genes de células MCF 7 superexpressos quando exposto por 6 h às amostras.....	132
Figura 3.6 -	Rede de interações gerada pelo <i>Consensus</i> , entre as vias bioquímicas reguladas por genes que foram subexpressos pelo extrato etanólico de <i>Triplaris gardneriana</i> em células de adenocarcinoma de mama - MCF 7, após 6 h de exposição.....	134
Figura 3.7 -	Rede de interações gerada pelo <i>Consensus</i> , das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram superexpressos pelo ácido gálico em células de adenocarcinoma de mama - MCF 7, após 6 h de exposição.....	135
Figura 3.8 -	Rede de interações gerada pelo <i>Consensus</i> , das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram superexpressos pelo ácido cafeico em células de adenocarcinoma de mama - MCF 7, após 6 h de exposição.....	136
Figura 3.8 -	Rede de interações gerada pelo <i>Consensus</i> , das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram subexpressos pela quercetina em células de adenocarcinoma de mama - MCF 7, após 6 h de exposição.....	137

Figura 3.10 - Rede de interações gerada pelo Consensus, das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram superexpressos pela quercetina em células de adenocarcinoma de mama - MCF 7, após 6 h de exposição.....

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo I

- Gráfico 1.1 - Quantidade de trabalhos publicados relacionados com toxicogenômica por ano desde 1980 até os dias atuais..... 48

Capítulo II

- Gráfico 2.1 - Perfil de capacidade de neutralização do radical livre DPPH pelas amostras..... 77
- Gráfico 2.2 - Ensaio de inibição da peroxidação lipídica..... 78
- Gráfico 2.3 - Capacidade, em porcentagem, das amostras formarem complexos com o sulfato ferroso..... 80
- Gráfico 2.4 - Intensidade de fluorescência do ensaio para avaliar a habilidade das amostras em prevenir a formação de estresse oxidativo por TBHP (A) e Menadiona (B)..... 81
- Gráfico 2.5 - Intensidade de fluorescência do ensaio para avaliar a habilidade das amostras em restaurar o balanço oxidativo induzido por TBHP (A) e Menadiona (B)..... 82

Capítulo III

- Gráfico 3.1 - Capacidade hemolítica das amostras frente a diferentes tipos sanguíneos; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*..... 118
- Gráfico 3.2 - Toxicidade das amostras frente a náuplios de *Artêmia* sp; 119
- Gráfico 3.3 - Viabilidade de células MCF 7 expostas às amostras; 123
- Gráfico 3.4 - Viabilidade de células Caco 2 expostas às amostras..... 124
- Gráfico 3.5 - Viabilidade de células Caco 2 diferenciadas (Caco2-D), expostas às amostras..... 125
- Gráfico 3.6 - Rendimento do RNA isolado de células MCF 7 expostas durante 6 h às amostras..... 127
- Gráfico 3.7 - Ganho de peso médio em gramas para cada grupo durante o período de análise;..... 143

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.1 -	Atividades biológicas encontradas para <i>Triplaris gardneriana</i> wedd.....	41
Tabela 1.2 -	Nome e estrutura dos compostos químicos já identificados em diferentes partes de <i>Triplaris gardneriana</i> por diferentes autores.....	42

Capítulo II

Tabela 2.1	Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de <i>T. gardneriana</i>	71
Tabela 2.2 -	Taninos, fenóis e flavonoides totais de <i>T. gardneriana</i>	72
Tabela 2.3 -	Composição de fenóis e flavonoides de <i>T. gardneriana</i> . identificados por CLAE.....	76
Tabela 2.4 -	Atividade antioxidante do extrato e frações de sementes de <i>T. gardneriana</i> .	79
Tabela 2.5 -	Imagem representativa de células MCF 7 tratadas com compostos antioxidantes antes de ser induzido estresse oxidativo TBHP e Menadiona	83
Tabela 2.6 -	Imagem representativa de células MCF 7 tratadas com compostos antioxidantes depois de ser induzido estresse oxidativo TBHP e Menadiona	84
Tabela 2.7 -	Valores de ΔBDE e de ΔIP (em kcal/mol). Retirado de Leopoldini, M et al (2004).....	90

Capítulo III

Tabela 3.1	Concentração letal das amostras, em $\mu\text{g/mL}$, que é capaz de matar 50% dos náuplios de <i>Artemia</i> sp. (CL_{50}).....	120
Tabela 3.2 -	Concentração letal das amostras, em $\mu\text{g/mL}$, que é capaz de matar 50% das células carcinogênicas. (CL_{50}).....	121
Tabela 3.3 -	Concentração e grau de pureza do RNA isolado das células MCF 7 expostas às amostras, EETg - Extrato etanólico de <i>T. gardneriana</i> ; DP - Desvio padrão; DMSO – dimetil sulfóxido.....	126
Tabela 3.4 -	Informações sobre doenças que podem estar relacionadas aos genes alterados pelas amostras. Dados gerados através do <i>Ingenuity</i> (Qiagen®), a partir da análise dos dados de NGS de células de adenocarcinoma de mama (MCF 7) quando expostas por 6 h às amostras.....	139
Tabela 3.5 -	Informações sobre o potencial toxicológico que pode estar relacionado aos genes alterados pelas amostras. Dados gerados através do <i>Ingenuity</i>	140

(Qiagen®), a partir da análise dos dados de NGS de células de adenocarcinoma de mama (MCF 7) quando expostas por 6 h às amostras.....

Tabela 3.6 - Mapa conectivo do perfil de expressão gênica do extrato etanólico de <i>Triplaris gardneriana</i> Wedd.....	141
Tabela 3.7 - Mapa conectivo do perfil de expressão gênica da quercetina.....	142
Tabela 3.8 - Média do peso dos camundongos para cada grupo e em cada dia de avaliação.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%N	Poncentagem de neutralização
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BDE	Entalpia de dissociação de ligação
CA	Ácido cafeico
Caco 2	colorectal adenocarcinoma
CAT	Catalase
CEPA	Comissão de Etica em Pesquisa Animal
CI ₅₀	Concentração capaz de inibir 50%
CK	Creatina quinase
CL50	Concentração letal para 50% dos indivíduos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMAP	<i>Connectivity Map</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPDB	<i>Consensus Path Data Base</i>
Cu-Zn-SOD	Cobre-zinco-superóxido dismutase
CY5	Cyanine-5
D.P.	Desvio padrão
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	Difenil picril hidrazila
edgeR	<i>Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EETg	Extrato Etanólico de <i>Triplaris gardneriana</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAqTg	Fração Aquosa de <i>Triplaris gardneriana</i>
FATg	Fração Acetato de etila de <i>Triplaris gardneriana</i>
FCTg	Fração Clorofórmica de <i>Triplaris gardneriana</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Fe2SO4	Sulfato ferroso
FHTg	Fração Hexânica de <i>Triplaris gardneriana</i>
FMTg	Fração Metanólica de <i>Triplaris gardneriana</i>
GA	Ácido gálico
GPx	Glutaciona peroxidase
GR _x	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSH	Glutaciona oxidada

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HNO ₂	Ácido nitroso
HOCl	Ácido hipocloroso
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia estatística
IP	Potencial de ionização
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potássio
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
km ²	Quilômetros quadrados
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LED	light-emitting diode
LOO•	Lipid peroxy
LQ	Limite de quantificação
MCF 7	Michigan Cancer Foundation-7
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Míímetro
Mn-SOD	Manganês superóxido dismutase
N ₂ O ₃	Trióxido dinitrogênio
NAC	N-acetil-cisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology information</i>
nm	nanometros
NO•	Óxido nítrico
NO ₂ •	Dióxido de nitrogênio
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₃	Ozônio
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OH•	Hidroxila
ONOO ⁻	peróxinitrito
P.A.	Pureza analítica
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PC-R	Proteína C-reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
QU	Quercetina
RNA	Ribonucleic acid
ROO•	Peroxy

SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TBHP	Hidroperóxido de terc-butilo
Tris-HCl	tris(hidroximetil)aminometano - ácido clorídrico

SUMÁRIO

Capítulo I - REVISÃO DE LITERATURA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1	Revisão de literatura e fundamentação teórica	27
1.1	Radicais Livres	27
1.2	Funções biológicas dos radicais livres	29
1.3	Estresse Oxidativo e doenças relacionadas	30
1.4	Definição de Antioxidante	32
1.5	Antioxidantes Mais Comuns no Organismo	34
1.6	Metabólitos secundários de plantas	36
1.7	Bioma da Caatinga	38
1.8	<i>Triplaris gardneriana</i> Wedd (pajeú)	38
1.9	Toxicogenômica	48
1.10	Referências	51

Capítulo II - ANÁLISES QUÍMICAS E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.1.	Caracterização do problema/justificativa científica.....	58
2.2.	OBJETIVOS	60
2.2.1.	Objetivo Geral	60
2.2.2.	Objetivos Específicos	60
2.3.	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	61
2.4	MATERIAIS E MÉTODOS	62
2.4.1	Material vegetal.....	62
2.4.2	Preparação do Extrato.....	63
2.4.3	Obtenção das Frações do Extrato Etanólico das Sementes	63
2.4.4	Análises Químicas	64
2.4.4.1	Prospecção Fitoquímica	64
2.4.4.2	Determinação de Fenóis Totais	64
2.4.4.3	Determinação de Flavonoides Totais	65
2.4.4.4	Determinação de Taninos	65

2.4.4.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	66
2.4.4.5.1 Química, Aparelhos e Procedimentos Gerais.....	66
2.4.4.5.2 Quantificação de Compostos por CLAE	66
2.4.5 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	67
2.4.5.1 Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	67
2.4.5.2 Inibição da Peroxidação Lipídica -TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).....	68
2.4.5.3 Atividade Quelante	69
2.4.5.4 Cultivo de células MCF 7	69
2.4.5.5 Espécies reativas de oxigênio intracelular	70
2.4.5.5.1 Avaliação da capacidade das amostras em prevenir a geração de ERO intracelular.....	70
2.4.5.5.2 Avaliação da capacidade das amostras em restaurar o balanço oxidativo intracelular de ERO.	71
2.5 Resultados	72
2.5.1 Caracterização química	72
2.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE	74
2.5.3 Capacidade Antioxidante	79
Discussão	87
2.7 Conclusão	95
2.8 Referências	96

Capítulo III - ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

3.1 Caracterização do problema/justificativa científica.....	104
3.2 OBJETIVOS	106
3.2.1 Objetivo Geral	106
3.2.2 Objetivos Específicos	106
3.3 EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	107
3.4 Materiais Biológicos e métodos	108
3.4.1 Sangue	108
3.4.3 Cultivo de células MCF 7	108
3.4.4 Cultivo de células Caco 2.....	108
3.4.5 Cultivo de células Caco- 2 diferenciadas.....	109

3.4.6 Animais para o teste de toxicidade oral aguda.....	110
3.4.7 Material Vegetal.....	110
3.4.8 Atividade hemolítica	110
3.4.9 Toxicidade em <i>Artemia</i> sp.....	111
3.4.10 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de mama MCF 7	111
3.4.11 Citotoxicidade em células Caco 2 (HTB-37).....	112
3.4.12 Ensaio de exposição de células MCF 7 às amostras para análise da alteração do perfil de expressão gênica	113
3.4.13 Isolamento, purificação, quantificação e pureza das amostras de RNA total	114
3.4.14 Método de hibridização dos genes.....	115
3.4.15 Análises de bioinformática	115
3.4.15.1 Normalização dos dados dos microarranjos	115
3.4.15.2 A Construção de mapas de expressão gênica.....	116
3.4.15.3 Análises das vias metabólicas diferencialmente expressas	116
3.4.15.4 Identificação de funções biológicas e riscos apresentados pelos tratamentos	117
3.4.15.5 Análises comparativa entre a assinatura de expressão gênica das amostras e o de drogas conhecidas.....	117
3.4.16 Avaliação de toxicidade aguda.....	118
3.5 Resultados	119
3.5.1 Atividade hemolítica	119
3.5.2 Toxicidade frente a náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	121
3.5.3 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de mama MCF 7	Erro! Indicador não definido.
3.5.4 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de colón retal Caco 2 ...	122
3.5.5 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de colón retal Caco 2 diferenciadas.....	124
3.5.6 Purificação do RNA das células MCF 7.....	128
3.5.7 Alterações na expressão gênica	129
3.5.8 Mapas de expressão gênica.....	130
3.5.10 Vias metabólicas diferencialmente expressas.....	135
3.5.9 Funções biológicas alteradas e riscos apresentados pelos tratamentos.....	141
3.5.11 Análises comparativa entre a assinatura de expressão gênica das amostras e aquelas de drogas conhecidas.....	142

3.5.12 Toxicidade aguda	145
3.6 Discussão	147
3.7. Conclusões	151
Considerações finais	153
3.7 Referências	155

Capítulo I

REVISÃO DE LITERATURA E FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA

1 Revisão de literatura e fundamentação teórica

1.1 Radicais Livres

O termo radical livre refere-se a átomo, molécula ou espécie química altamente reativa. Em geral, os autores consideram que ERO (Espécie Reativa de Oxigênio) contém número ímpar de elétrons não emparelhados em sua última camada eletrônica e este não-emparelhamento confere alta reatividade a essas substâncias (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Para organismos aeróbicos o oxigênio molecular (O_2) é uma substância vital que está relacionado com diversos radicais livres, conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), alguns exemplos são: hidroxila ($OH\cdot$), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($NO\cdot$), dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$), peroxil ($ROO\cdot$), e peróxido lipídico ($LOO\cdot$) (OZSUREKCI e AYKAC, 2016). Algumas moléculas não são propriamente radicais livres, segundo o conceito de elétrons desemparelhados, mas são chamados de espécies reativas por que conseguem facilmente ser convertidos em radicais livres ou participam das reações de produção de radicais livres, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido nitroso (HNO_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), trióxido dinitrogênio (N_2O_3) e peróxido lipídico. Além das ERO também ocorrem no organismo espécies reativas de nitrogênio, de ferro, cobre e enxofre (GANESTRA, 2007).

Os radicais livres possuem diferentes níveis de reatividade com estruturas biológicas e apresentam características distintas. O radical hidroxila ($OH\cdot$) é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, reagindo rapidamente até mesmo com outros radicais e/ou metais dispersos. Quando produzida próximo ao DNA, poderão ocorrer inativações ou mutações. A hidroxila pode inativar proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrilas e pontes dissulfeto. Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986).

Existem evidências de que o radical hidroperoxila $HO_2\cdot$, que é a forma protonada do superóxido ($O_2^{\cdot-}$), é mais reativo que o superóxido e possui maior facilidade em desencadear processos de destruição de membranas biológicas (HALLIWELL, 2014). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de participar de diversas reações que originam como produto final diversas outras ERO, possui o que pode ser considerado uma “vida longa” e alta permeabilidade

à membranas lipídicas. Por sua capacidade de reagir é considerado altamente tóxico para as células (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2013).

O oxigênio singlete ($1O_2$) é a forma excitada do oxigênio molecular e assim como o peróxido de hidrogênio, não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Ainda abordando sobre a presença origem de formação de radicais livres é interessante citar como metais podem atuar, em especial dois metais de transição muito importantes para o corpo humano, o ferro e o cobre. Esses elementos desempenham um papel chave na produção *in vivo* de radicais hidroxila (YOUNG E WOODSIDE, 2001), o peróxido de hidrogênio pode reagir com ferro II (ou cobre I) para gerar o radical hidroxila, uma reação primeiramente descrita por Fenton em 1894 (FIGURA 1.1):

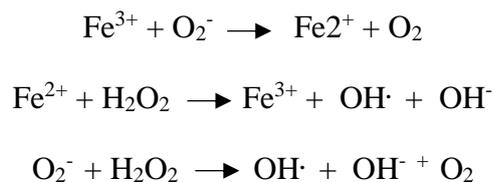
Figura 1.1: Reação de Fenton - Descreve a formação de radicais livres a partir da interação entre o ferro e o peróxido de hidrogênio



Fonte: adaptado de YOUNG E WOODSIDE, 2001.

Em organismos vivos pode acontecer uma reação direta entre o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido, gerando radicais hidroxila, a constante dessa reação em meio aquoso é virtualmente zero, na presença de íons de metais de transição ocorre uma sequência de reações em etapas, mas as taxas de processamento ainda se mantem muito alta:

Figura 1.2: Reação de Haber-Weiss - Descreve a formação de radicais livres a partir da interação entre o ferro, e espécies reativas de oxigênio.



Fonte: adaptado de YOUNG, WOODSIDE, 2001.

A sequência descrita acima é conhecida como reação Haber-Weiss, e embora a maior parte do ferro e do cobre no organismo esteja ligado a proteínas carreadoras essa constitui uma importante fonte de radicais livres (YOUNG E WOODSIDE, 2001).

1.2 Funções biológicas dos radicais livres

Embora as ERO estejam relacionadas a diversas doenças em humanos, sua formação nem sempre é deletéria. Estas espécies podem desempenhar um papel duplo como agentes potencialmente tóxicos e benéficos ao mesmo tempo, o que torna delicado o equilíbrio entre essas duas situações (PHAM-HUY, PHAM HUY 2008). Diversos radicais livres são produzidos naturalmente, mesmo que de forma não intencional, durante o metabolismo e processos fisiológicos corriqueiros, um exemplo pode ser observado através do O_2 utilizado na cadeia transportadora de elétrons para a formação de Adenosina trifosfato (ATP), que durante o fluxo de elétrons, através dos complexos mitocondriais, desencadeia a produção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, devido ao escape dos elétrons do sistema. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O_2^- (seja enzimático, fagocitário ou químico) (HALLIWELL, 2014).

Existem mecanismos celulares específicos para a produção de radicais livres, com o intuito de utilizar a capacidade altamente reativa destes. A primeira linha de defesa do organismo, a chamada defesa inata, usa como mecanismo principal a explosão oxidativa que ocorre quando um microrganismo ou outro tipo de corpo estranho é identificado, e fagocitado. Então uma grande carga de radicais livres é liberada dentro do fagossomo com o intuito de eliminar esse agente (FLOYD, 1990; HALLIWELL, 2013). A importância de produção de ROS pelo sistema imunológico é claramente mostrada pelos pacientes com doença granulomatosa que possuem um defeito no complexo da NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), oxidase que impede a formação do radical, como resultado esses pacientes são acometidos por infecções múltiplas e persistentes (DRÖGE, 2002).

Os radicais livres também participam no processo inflamatório tecidual, estimulando as células do sistema imune a secretar citocinas pró-inflamatórias ou mesmo agindo como estimuladores para a migração de macrófagos e outras células brancas com o intuito de conter focos de infecção por patógenos (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009).

O óxido nítrico é um radical livre que possui funções e origens biológicas bem definidas. É produzido via oxidação da L-arginina que é catalisada pela óxido nítrico sintetase com auxílio de um NADPH como doador de elétron. O óxido nítrico funciona como neurotransmissor, vasodilatador, relaxante de musculatura lisa além de agente citotóxico em casos de infecções (QUEIROZ; BATISTA, 1999).

1.3 Estresse Oxidativo e doenças relacionadas

O desequilíbrio entre a geração e a neutralização dos radicais livres proveniente da diminuição da ação dos antioxidantes ou do aumento da geração de espécies radicalares gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de danos em diversas moléculas e estruturas celulares, podendo resultar até mesmo na morte celular (ROVER-JUNIOR *et al.*, 2001). Este estado de desequilíbrio pode ser definido como estresse oxidativo e é considerado um fator que contribui para a patogênese e fisiopatologia de muitos problemas de saúde, seja como fonte ou como resultado (PHAM-HUY; PHAM-HUY, 2008).

Diversos estímulos exógenos podem também atuar como agentes que induzem um aumento na produção de pró-oxidantes tais como radiação ultravioleta, álcool e poluentes como ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e fumaça do cigarro onde se estima que haja aproximadamente cinco mil compostos tóxicos, incluindo oxidantes potentes como acroleína, peróxido de nitrogênio, ânion superóxido, além de radicais orgânicos (CAVALCANTE; BRUIN, 2009).

Grandes avanços têm sido feitos para entender o papel dos radicais livres e do estresse oxidativo na saúde humana. Sabe-se que suas ações podem variar de acordo com fatores não mutáveis como o tipo de patologia, idade, raça e genótipo do organismo em questão, bem como fatores mutáveis como dieta, status socioeconômico, meio ambiente e comportamento (FILLIPIN *et al.* 2008).

As interações resultam em modificações oxidativas de macromoléculas celulares de DNA, RNA, lipídeos e proteínas. Alterações desse tipo estão associadas a uma série de subprodutos ou produtos finais que estão ligados a macromoléculas modificadas. Essas modificações podem, isoladamente ou em associação com outros fatores biológicos, levar a mudanças epigenéticas, alterações na expressão gênica e/ou na capacidade de reparo do DNA

mitocondrial e disfunções nas membranas. Em última análise, esses fatores ao longo do tempo e em associação com uma vida inteira de exposição podem resultar em envelhecimento precoce e doenças relacionadas com a idade e a patologias, como doenças inflamatórias crônico-degenerativas (VOSS; SIEMS, 2006; JACOB *et al.*, 2013).

Existem mecanismos diferentes pelos quais os radicais participam de doenças e processos fisiológicos, por exemplo a inflamação é uma reação comum do corpo a estímulos nocivos endógenos e exógenos mas na inflamação crônica ocorrem efeitos colaterais celulares, incluindo a produção de radicais livres que podem resultar em dano oxidativo, depleção de antioxidantes e perpetuação do estímulo pró-inflamatório (AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

A lesão muscular induzida pelo exercício é atribuída a um aumento da intensidade desse exercício dependente do estresse oxidativo, produzida pelo metabolismo mitocondrial intenso. Neste caso, os danos oxidativos à membrana plasmática conduzem a um aumento da creatina-quinase (CK) no sangue. Esses danos geram proteínas inflamatórias C-reativas (PCR) que facilitam o influxo de células inflamatórias para reparar os danos (ROENGRIT *et al.*, 2014).

Acredita-se que a aterosclerose tem início através de uma lesão no endotélio por mecanismo hemodinâmico. Nesta lesão há afluxo de macrófagos; quando ativados, liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas. Essas moléculas causam danos ao redor das células e estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial. A lesão pode ser exacerbada pela fumaça do cigarro que, por ser rica em ferro, catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Tal oxidação estimula a internalização de colesterol nos macrófagos que se convertem em células espumosas, contribuindo para a formação da placa de ateroma (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo e dependente de diferentes estímulos, mas sabe-se que os radicais livres participam de forma a mediar a iniciação e promoção de alguns tipos de câncer através de danos e modificações estruturais ao DNA, como danos ao açúcar e ruptura dos filamentos que provocam ligações cruzadas e alterações nas sequências de bases (PHAN-HUY; PHAN-HUY, 2008)

Dependendo do tecido, onde o estresse oxidativo ocorre, diferentes patologias podem ser associadas. Quando ocorre no tecido nervoso os radicais livres causam danos e podem estimular a produção de beta amiloide, um péptido tóxico encontrado frequentemente presente no cérebro dos doentes de *Alzheimer* (EVERETT *et al.*, 2014). No pulmão os radicais podem causar danos

alveolares e inflamações crônicas como a asma (HOSHINO; MISHIMA, 2008). O estresse oxidativo desempenha um papel numa variedade de doenças renais, tais como glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial, insuficiência renal crônica e proteinúria (GALLE, 2001). A produção excessiva de radicais livres implica na degeneração macular e está relacionada com a catarata, alterando vários tipos de células no olho, quer fotoquimicamente ou não e interagindo com proteínas do cristalino (SANTOSA; JONES, 2005)

Esses são alguns dos exemplos que mostram a forte correlação entre diversas doenças e o estresse oxidativo, evidenciando a necessidade dos organismos em manter a homeostase do sistema de oxi-redução a fim de postergar o aparecimento das doenças e síndromes ditas como resultantes do envelhecimento.

1.4 Definição de Antioxidante

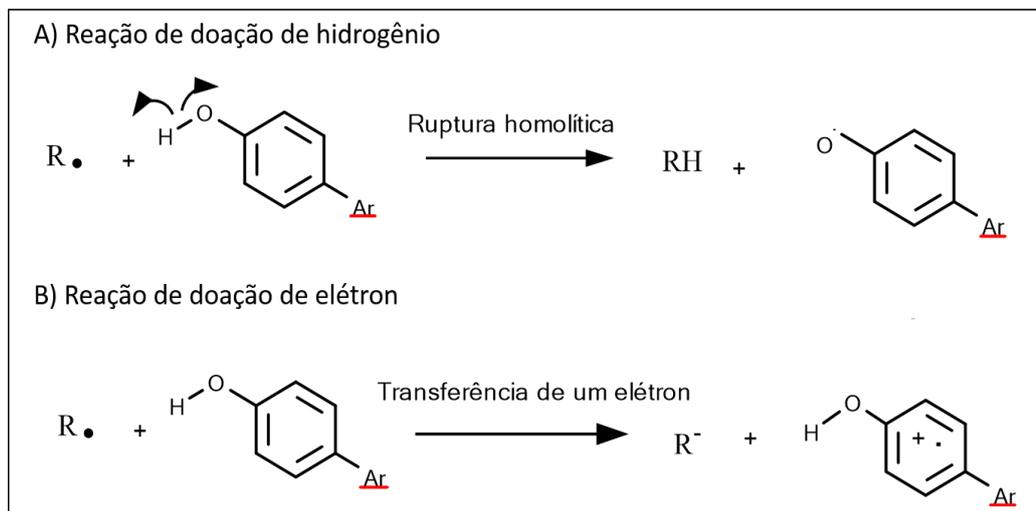
Os antioxidantes podem ser definidos como um grupo de substâncias que possuem a capacidade de impedir a oxidação de outras substâncias químicas. Esse grupo abrange vitaminas, minerais, pigmentos e outros metabólitos, enzimas e moduladores de resposta genética (FOOD INGREDIENTES BRASIL 2009). Levando para o âmbito biológico, uma substância pode ser classificada como antioxidante quando em baixas concentrações apresenta a capacidade de impedir ou retardar a oxidação de um substrato, o que implica em uma redução do estresse oxidativo e dos danos gerais causados pelos radicais livres (PISOSCHI; POP, 2015)

Segundo o mecanismo de ação os antioxidantes podem ser classificados em seis categorias. Antioxidantes primários são os que promovem a remoção ou inativação direta dos radicais livres, secundários, os que possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidante direta, mas são capazes de aumentar a capacidade de antioxidantes primários. Já os removedores de oxigênio atuam capturando o oxigênio do meio reacional, tornando-os indisponíveis para a formação de ERO. Os antioxidantes biológicos incluem as enzimas com finalidade de neutralizar radicais livres. Os agentes quelantes sequestram e complexam com íons metálicos impedindo que estes venham participar de reações que formem radicais livres e os antioxidantes mistos que possuem um ou mais dos mecanismos de ação anteriormente citados (FOOD INGREDIENTES BRASIL 2009). Uma outra classificação inclui ainda os compostos que são

capazes de modular a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos de defesa contra processos oxidativos (BASTOS; ROGERO, 2009).

Em relação aos compostos antioxidantes com mecanismos de ação primários, mais especificamente compostos fenólicos derivados de vegetais, pode-se fazer uma subdivisão quanto ao mecanismo de ação em dois tipos diferentes: os doadores de elétrons e os doadores de hidrogênio que agem segundo o esquema abaixo e geram como produtos de reação substâncias estáveis, principalmente devido a presença dos anéis aromáticos presentes nos fenóis (FIGURA 1.3) (LEOPOLDINI et al 2011)

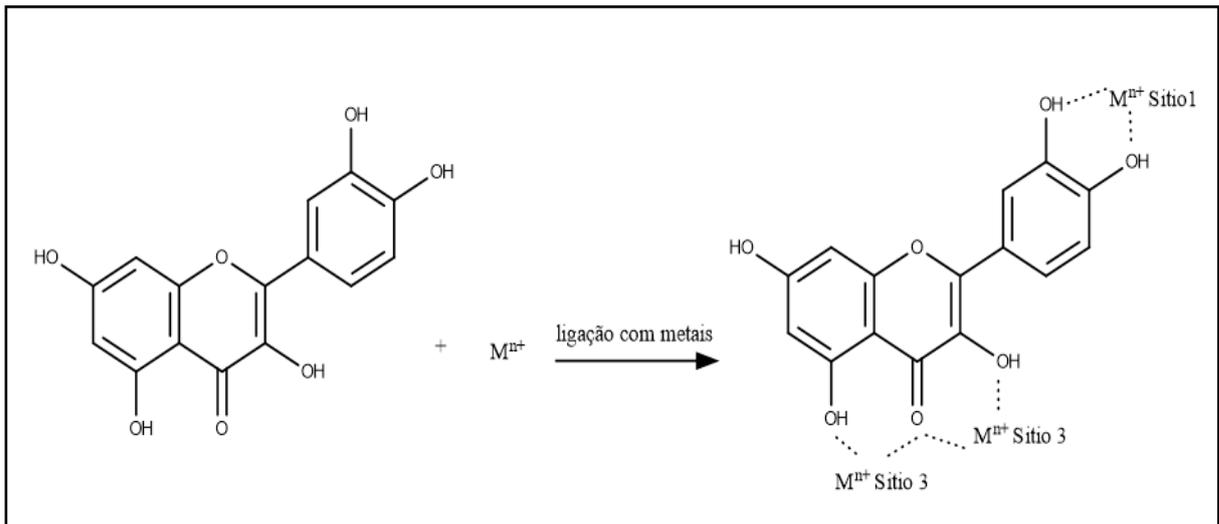
Figura 1.3: A) Mecanismo de reação antioxidante por doação de hidrogênio através de ruptura homolítica; B) Mecanismo de ação antioxidante por doação de elétrons.



Fonte: adaptado de LEOPOLDINI et al 2011

Algumas enzimas carreadoras específicas, possuem a capacidade de formar complexos estáveis com metais. Esta é uma propriedade também atribuída aos compostos fenólicos das classes dos flavonoides, como mostra o esquema abaixo (LEOPOLDINI et al 2011).

Figura 1.4: Representação dos possíveis sítios de interação entre metais e flavonoides.



Fonte adaptado de: (LEOPOLDINI et al 2011).

1.5 Antioxidantes Mais Comuns no Organismo Humano

É essencial para qualquer organismo, tecido ou célula aeróbica manter o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. As proteções biológicas contra os radicais livres abrangem duas linhas principais: a proteção enzimática, que é produzida ativamente pelo organismo, em resposta à presença dos radicais, e a proteção por moléculas com capacidade antioxidante que podem ou não ser adquiridas através da dieta (BARREIROS; DAVID, 2006).

Entre as enzimas que estão relacionadas com o papel de neutralizar espécies radiculares ou de convertê-las em substâncias menos reativas pode-se citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GRx) e enzimas de ligação a metais como a transferrina (WALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Das moléculas não enzimáticas de produção endógena pode-se citar o ácido lipoide, glutatona, L-arginina, coenzima Q10, a melatonina, ácido úrico, bilirrubina e proteínas quelantes de metal (WILLCOX, ASH, CATIGNANI, 2004). Entre as moléculas não enzimáticas de origem exógena as mais estudadas são as diversas classes de fenóis provenientes de plantas como flavonoides e ácidos fenólicos (HALLIWELL, 2007).

A catalase foi a primeira enzima antioxidante descrita e tem como finalidade a neutralização de radicais livres, sendo constituída por quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um grupo heme e uma molécula de NADPH. É capaz de converter o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

A superóxido dismutase (SOD) realiza a catálise da reação de neutralização do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Existem dois tipos de SOD: a que apresenta maior concentração no citosol, possuindo cobre e zinco em sua composição (Cu-Zn-SOD) e a que se apresenta em maior concentração nas mitocôndrias, com manganês na composição (Mn-SOD), em ambos os casos os metais auxiliam na troca de elétrons (MULLER, F. L. *et al.* 2006). A SOD apresenta como produto da sua reação o peróxido de hidrogênio e apesar de essa molécula ser relativamente mais estável por não apresentar radicais livres desemparelhados, é altamente capaz de permear as membranas biológicas e ser facilmente degradada em algumas espécies reativas de oxigênio, a enzima catalase atua diretamente na dismutação do peróxido de hidrogênio e o converte em oxigênio molecular e água (BABIOR, 1997).

Outro sistema que pode ser citado é aquele composto pela glutatona (GSH/GSSG) em conjunto com duas enzimas, a glutatona-redutase (GR) e a glutatona-peroxidase (GPx). Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutatona opera em ciclos entre sua forma reduzida (GSH) e sua forma oxidada (GSSH), que é a forma dimerizada da forma reduzida (BABIOR, 1997).

Entre os antioxidantes vitamínicos pode-se citar a vitamina E que é capaz de conferir proteção à membrana celular por atuar interagindo com os oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. A vitamina C, ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO, porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada ou quando exposta a metal (MATÉS, 2000).

Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tióis, entre eles a N-acetilcisteína, mercaptopropionilglicina e diversos outros de origem exógena que podem agir em organismos que apresentem desequilíbrio entre agentes pró- e antioxidantes (SHAH *et al.*, 2014).

O beta-caroteno também é uma vitamina solúvel em água e é amplamente estudada para atividade antioxidante sendo considerada a melhor eliminadora de oxigênio singlete. O selênio é um mineral essencial que forma o centro ativo de várias enzimas antioxidantes incluindo a glutaciona peroxidase, as mesmas considerações podem ser feitas para o manganês e para o zinco (FOOD INGREDIENTES BRASIL 2009).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente mais encontrados e estudados são os compostos fenólicos tais como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (MACÊDO, 2015). Em particular, os flavonoides, pois possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, devido à presença de muitas hidroxilas que podem participar na doação de elétrons e de hidrogênios (FOOD INGREDIENTES BRASIL 2009).

1.6 Metabólitos secundários de plantas

A prática do uso de plantas para prevenir e tratar doenças ou promover o bem-estar data da antiguidade, sendo apontado como um dos métodos mais antigos existentes utilizados pela humanidade. Por esta razão plantas medicinais têm sido usadas terapeuticamente ao redor do mundo, sendo em muitos casos um aspecto importante em várias culturas medicinais tradicionais (AMEH, 2010). O estudo de plantas medicinais envolve a identificação de substâncias que apresentam potencial biológico, sendo boa parte dessas atividades biológicas classificadas como provenientes de compostos oriundos do metabolismo secundário (PLAZA, 2007).

Através do metabolismo secundário são produzidas uma grande variedade de substâncias (AMEH, 2010). Já foi determinado que a maior parte desses metabólitos possuem propriedades específicas como, por exemplo, na defesa da planta contra predadores. Alguns são feromônios, usados para atrair insetos para a polinização; outros são fitoalexinas, que protegem as plantas contra infecções microbianas. Assim, o metabolismo secundário acaba exercendo um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, ou seja, representa uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante e a sua síntese é frequentemente influenciada por condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Estudos indicam que substâncias pertencentes a todas as classes citadas possuem algum grau de atividade antioxidante, contudo, os maiores responsáveis por desempenhar esse papel são os compostos fenólicos, classe ao qual pertence os flavonoides (BOUKHRIS *et al.*, 2012; ERB *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Essa classe de substâncias é associada à função de proteção das plantas contra os raios ultravioletas, insetos, fungos, vírus e bactérias. Quimicamente, são substâncias que possuem, pelo menos, um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (GOBBO-NETO, LOPES 2007; KARAKAYA, 2004). Os compostos fenólicos são substâncias potencialmente ativas em testes químicos e biológicos como o potencial antioxidante. Os ácidos fenólicos possuem um anel aromático com, pelo menos, um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais: álcoois, aldeídos ou ácidos, e podem apresentar também diversas atividades biológicas, entre as quais, atividade anti-inflamatória e antioxidante. Há ainda como compostos de natureza fenólica estilbenos e lignanas, e de forma polimerizada os taninos e ligninas (MANACH *et al.*, 2004).

Os flavonoides são um grande grupo de polifenóis antioxidantes encontrados em frutas, legumes, e derivados como o chás e vinhos. Mais de 4.000 flavonoides já foram identificados e são divididos em diversos grupos, de acordo com a sua estrutura química, incluindo flavonóis (quercetina e canferol), flavonoides (as catequinas), flavonas (apigenina) e isoflavonas (genisteína).

Dentre os fatores ambientais que influenciam o conteúdo dos metabólitos secundários pode-se citar a sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, macro- e micronutrientes, estímulos mecânicos como injúrias ou ataque de patógenos (CAPASSO, 2000; HILGEMANN, 2010). Em geral, ocorre um aumento da produção desses compostos como forma de resposta ao estresse, ao qual plantas estão submetidas, de forma que se pode supor que plantas oriundas de ambientes mais ríspidos apresentam uma maior concentração natural de flavonoides, por exemplo (FINI *et al.*, 2011; SELMA, ESPIN e TOMAS-BARBERAN 2009).

1.7 Bioma da Caatinga

A Caatinga é considerada pelo Ministério do Meio Ambiente como um dos maiores biomas brasileiros, abrangendo aproximadamente 970 mil km² (BRASIL, 2006), cobrindo uma área mais ou menos contínua do Nordeste do Brasil. Essa região está submetida a um clima semiárido, bordejado por áreas de clima mais úmido.

A vegetação desta área compreende plantas que apresentam características relacionadas à adaptação ao perfil ambiental, tal como a deficiência hídrica devido à localização, majoritariamente entre o Equador e o Trópico de Capricórnio. A Caatinga dispõe de abundante intensidade luminosa em todo seu território. Durante todo o ano as temperaturas são altas e pouco variáveis, espacial e temporalmente, com médias anuais entre 25 e 30 °C e poucos graus de diferença entre as médias dos meses mais frios e mais quentes. A disponibilidade hídrica não só é limitante quanto altamente variável no tempo e no espaço, resultando em chuvas erráticas e concentradas em poucos meses do ano, e, em anos chuvosos, alternados irregularmente com anos de intervalo com secas (BRASIL, 2010).

De maneira geral, os solos são de origem sedimentar e lixiviados ao longo de milhões de anos, são pouco férteis e deficientes em fósforo e cálcio. As diferentes disponibilidades de nutrientes formam, junto com a disponibilidade hídrica, outra grande fonte de diferenciação das condições ambientais (MENEZES; GARRIDO; MARIN, 2005).

Em decorrência das condições menos favoráveis e pela ação da antropização, as alturas máximas das árvores pouco ultrapassam os 10 m, de modo que a presença de arbustos é mais abundante. Há poucas espécies perenifólias e, em geral, com populações com folhas coriáceas. O bioma Caatinga tem sido objeto de utilização intensa para a satisfação de necessidades humanas e os recursos florestais da região como frutos, fibras, corantes, ervas medicinais, madeira para construção, lenha e água servem a uma multiplicidade de fins, estando presentes na alimentação, habitação, vestuário, lazer e saúde (BRASIL, 2010).

1.8 *Triplaris gardneriana* Wedd (pajeú)

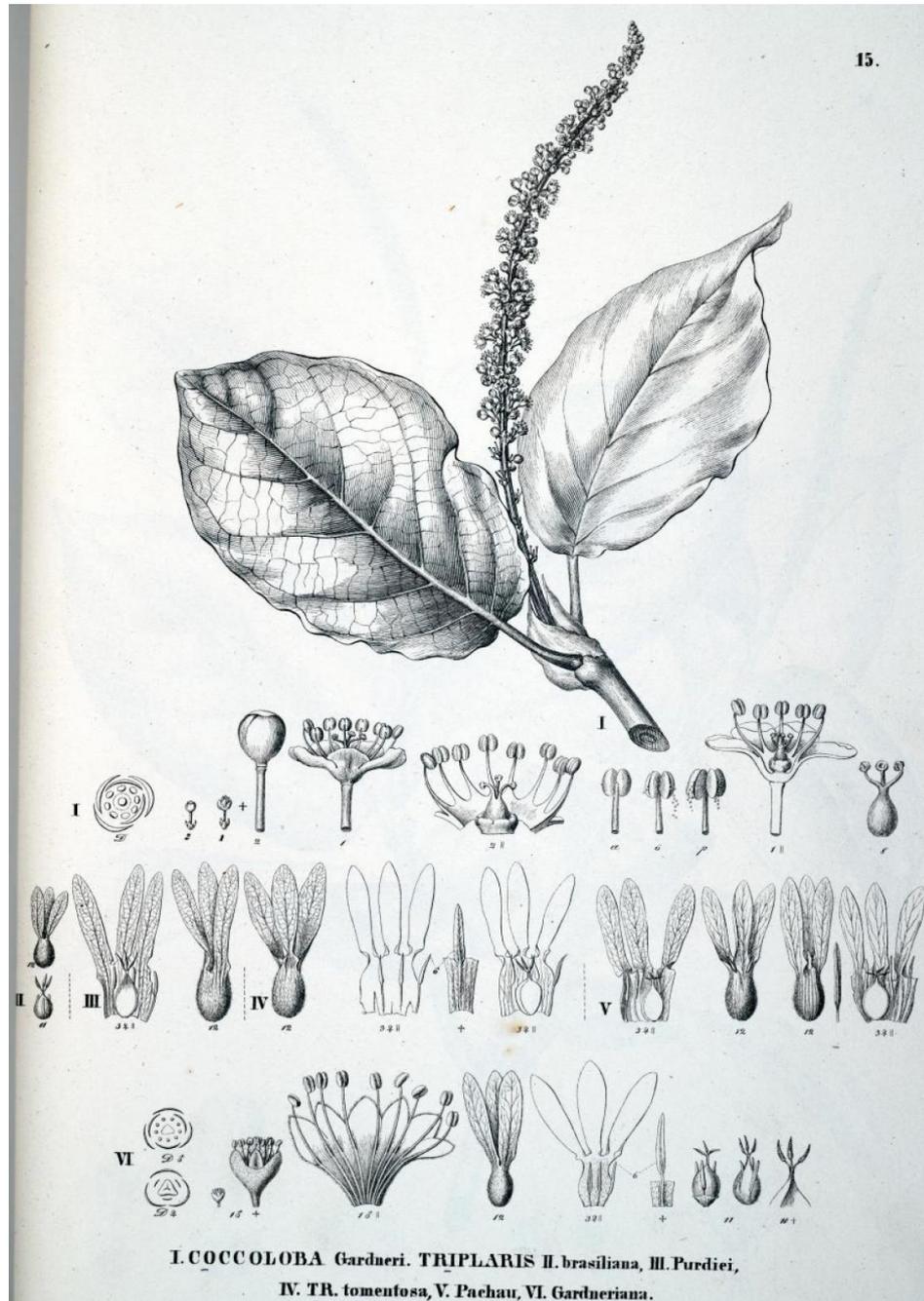
Triplaris gardneriana Wedd. (Poligonáceae) é conhecida popularmente como pajeú, pajauá, pau jaú, coaçu ou pau-formiga. Tem como sinónímias botânicas *Triplaris baturitensis*

Hub. (VINGT-UN ROSADO; ROSADO, 2009) e *Triplaris pachau* Mart. (MELO, 2010). Pode atingir 4 a 15 m de altura, está presente na Caatinga e região do Pantanal Matogrossense nas várzeas inundáveis e em encostas úmidas (MELO, 2000). No Semiárido, *T. gardneriana* é uma espécie característica da mata ciliar do Rio São Francisco, sendo considerada de grande interesse na recuperação de áreas degradadas (FRANÇA *et al.*, 2012)

É uma planta dioica com tronco tortuoso e ramificado, revestido por casca fina, lisa e descamante. As folhas do tipo coriáceas apresentam pilosidade na face inferior. Floresce durante os meses de julho-agosto e é coletada com frutos no mês de setembro. As inflorescências são paniculadas e mudam de cor de acordo com o estágio de maturação dos frutos. Inicialmente são rosadas e, com o amadurecimento dos frutos, ficam pardacentas, sendo bastante apreciadas por abelhas. O fruto é seco e apresenta apenas uma semente brilhosa e de coloração marrom-caramelada (ARAUJO, 2009).

Rebrota facilmente após queima ou corte, gerando plantas com vários caules. Produz anualmente grande quantidade de sementes, facilmente disseminadas pelo vento. Devido ao seu grande porte esta espécie é indicada para arborização áreas urbanas (ALENCAR, 2008).

Figura 1.5: Representação da estrutura das folhas, flores e frutos de *Triplaris gardneriana* Wedd.



Fonte: Flora Brasiliensis (2016)

Figura 1.6: Fotografia dos frutos e da árvore de *Triplaris gardneriana* Wedd.



Fonte: fotografado por João de Deus Medeiros campus da UnB – Brasília – Distrito Federal
Brasil, 2010

Na medicina popular o cozimento da casca e das raízes de *T. gardneriana* é utilizado para o tratamento da blenorragia e leucorreia; suas folhas são usadas em banhos de assento para tratar hemorroidas sangrentas e inflamação dos órgãos internos (ARAUJO, 2009; CARTAXO, 2010). Alguns estudos relatam atividades biológicas para esta espécie, incluindo um estudo anterior, desenvolvido pelo nosso grupo, que se propôs a identificar o potencial biológico de diversas plantas oriundas da caatinga. Dentre elas se destacou o extrato das sementes de *T. gardneriana* que mostrou atividade antibacteriana, antioxidante e anticolinesterásica (FARIAS et al., 2013). As demais atividades estão listadas na Tabela 1.1 e mostram o potencial farmacológico desta espécie.

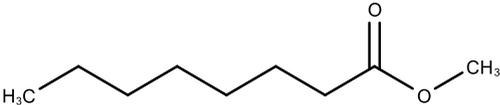
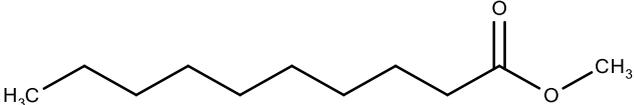
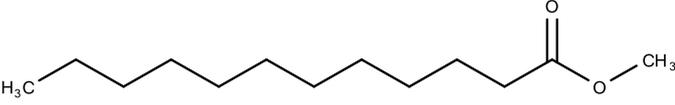
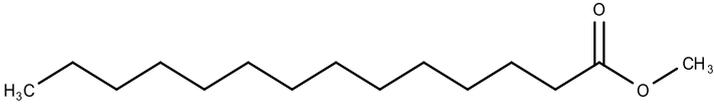
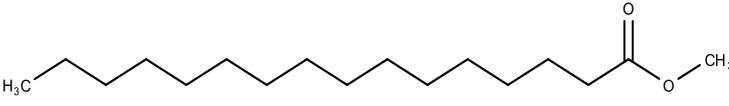
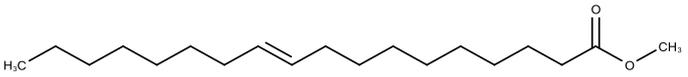
Tabela 1.1 Atividades biológicas encontradas para *Triplaris gardneriana* Wedd

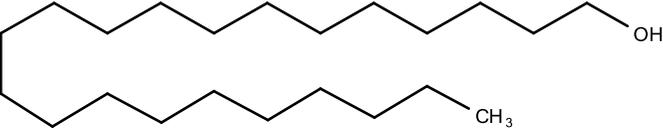
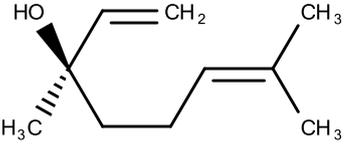
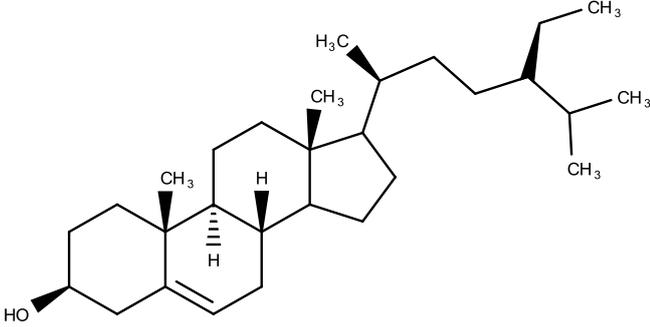
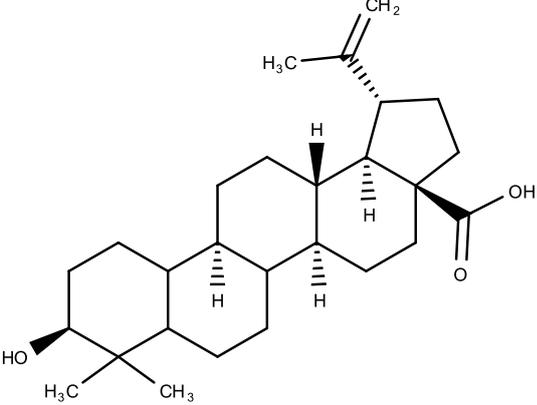
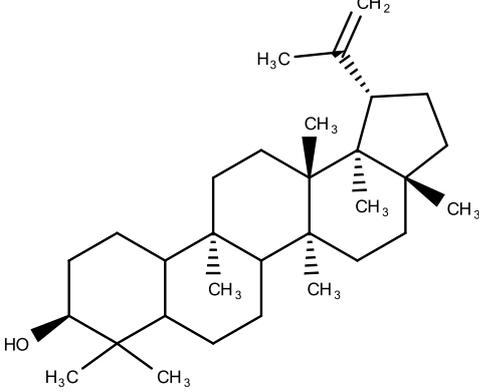
Atividade biológica	Tipo de amostra	Referência
Atividade molusciscida	Extrato etanólico das cascas	SOUZA <i>et al.</i> , 1974
Estimulante da musculatura lisa e toxicidade	Extrato aquoso das cascas	BARROS <i>et al.</i> , 1970.
Atividade antibacteriana, antioxidante e anticolinesterásica	Extrato etanólico das sementes	FARIAS <i>et al.</i> , 2013.
Atividade antibacteriana, antioxidante e fotoprotetora	Extrato das folhas e óleo fixo das folhas e sementes	MACÊDO <i>et al.</i> , 2015

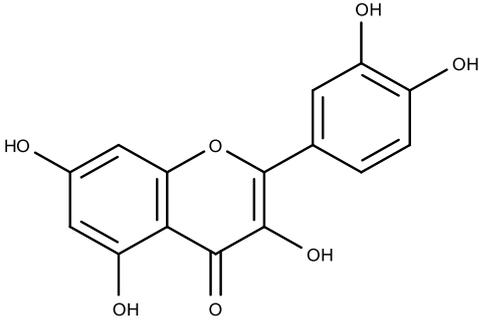
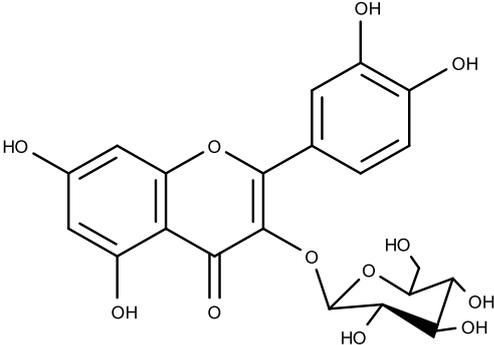
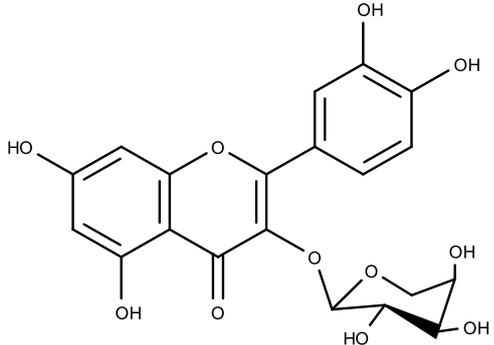
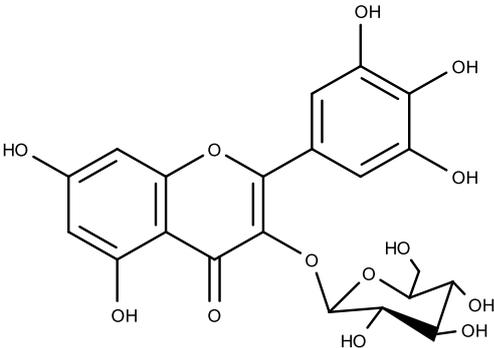
Fonte: Elaborado pelo autor.

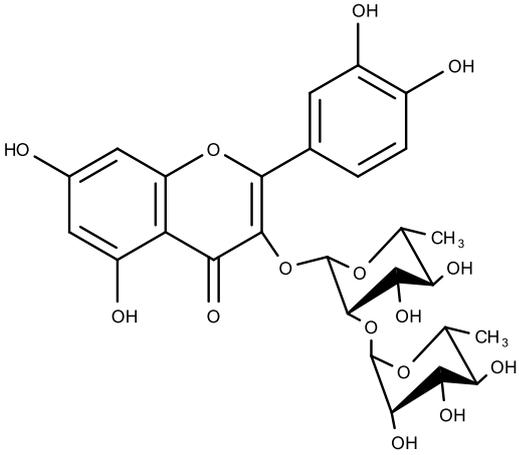
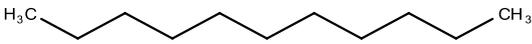
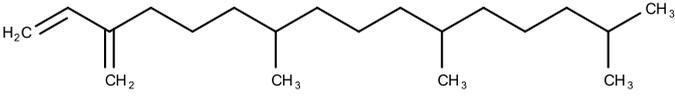
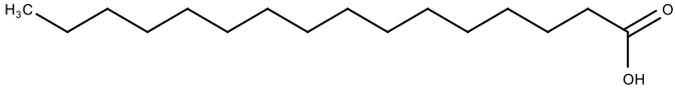
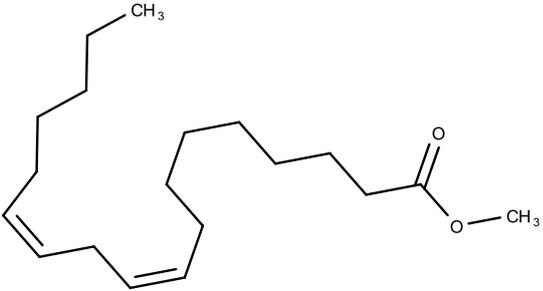
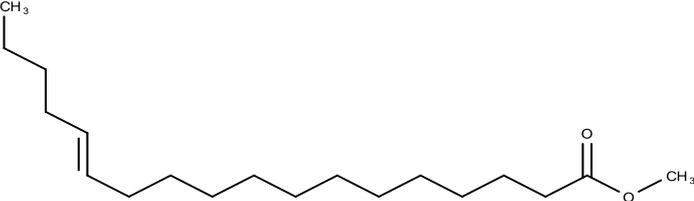
Em relação à composição química do súber, foi identificado um hidrocarboneto alifático. Na madeira constatou-se a ocorrência de ferulatos (BRAZ FILHO; RODRIGUES, 1974). Nas folhas foram identificados flavonoides ligados a diferentes tipos de açúcar (MACÊDO, *et al.*, 2015). Também foi analisada a composição do óleo essencial dos frutos que apresentaram predominância de ésteres (65,93%) como constituintes voláteis, sendo 21,67% de palmitato de metila e 21,72% de 10-octadecenoato de metila, além de octanoato de metila, decanoato de metila, laurato de metila, tetradecanoato de metila e 1-docosanol e linalol (CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010). Macêdo *et al.*, 2015 identificaram flavonoides e toda a composição do óleo fixo (Tabela 1.2)

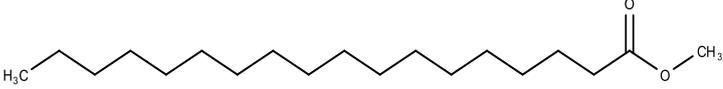
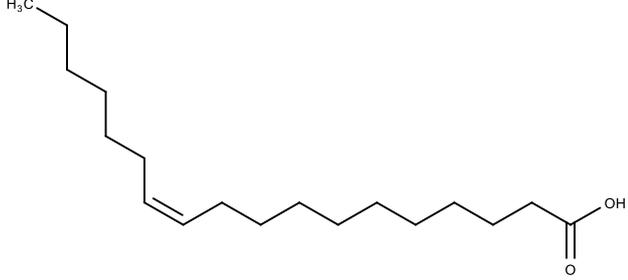
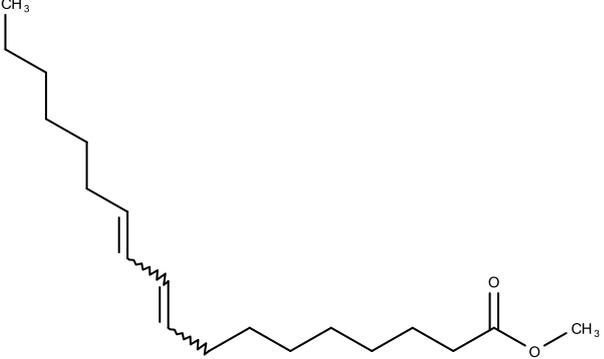
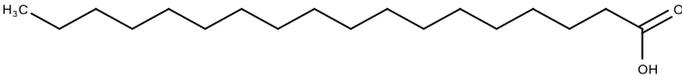
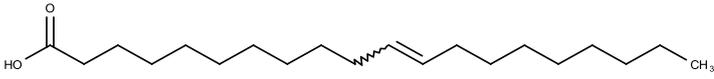
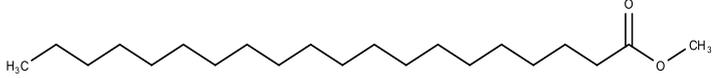
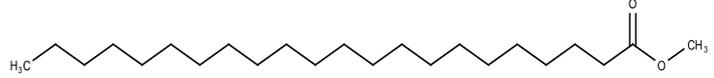
Tabela 1.2 Nome e estrutura dos compostos químicos já identificados em diferentes partes de *Triplaris gardneriana* por diferentes autores.

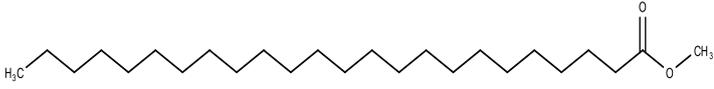
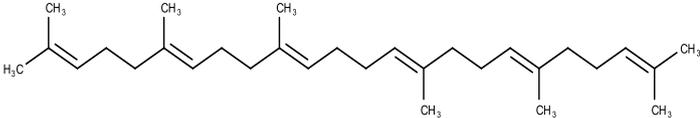
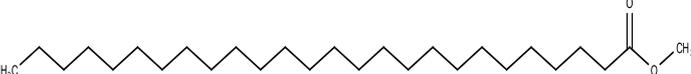
Nome/forma de obtenção	Referência	Estrutura
Octanoato de metila/ Óleo essencial dos frutos	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010	 <chem>CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
Decanoato de metila/óleo essencial dos frutos	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010	 <chem>CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
Laurato de metila/óleo essencial dos frutos/óleo fixo das folhas	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010; MACÊDO et al, 2015	 <chem>CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
Tetradecanoato de metila/ Óleo essencial dos frutos/óleo fixo das folhas e sementes	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010	 <chem>CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
Palmitato de metila/ Óleo essencial dos frutos/óleo fixo das folhas e sementes	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010; MACÊDO et al, 2015	 <chem>CCCCCCCCC(=O)OC</chem>
10-Octanoato de metila/ Óleo essencial dos frutos/óleo fixo da semente	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010; MACÊDO et al, 2015	 <chem>CCCCCCCCC(=O)OC</chem>

1-Docosanol	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010	
Linalol/óleo essencial dos frutos	CARNEIRO; CITO; PESSOA, 2010	
β -sitosterol/casca /óleo fixo das folhas	BRAZ FILHO; RODRIGUES, 1974; MACÊDO et al, 2015	
Ácido betulínico/ não mencionado	LORENZI, 2002 apud ARAUJO, 2009	
Lupeol / extrato das folhas	MACÊDO et al, 2015	

Quercetina/ext rato das folhas	MACÊDO et al, 2015	 <p>The image shows the chemical structure of Quercetin, a flavonoid. It consists of a central chromone ring system with two hydroxyl groups at the 3 and 7 positions, and a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 6 position.</p>
Quercetina- hexosídeo / extrato das folhas	MACÊDO et al, 2015	 <p>The image shows the chemical structure of Quercetin-3-O-beta-D-glucopyranoside. It is a glycoside where the 3-hydroxyl group of Quercetin is linked to a beta-D-glucopyranose sugar unit.</p>
Quercetina- pentosídeo/Ext rato das folhas	MACÊDO et al, 2015	 <p>The image shows the chemical structure of Quercetin-3-O-beta-D-xylopyranoside. It is a glycoside where the 3-hydroxyl group of Quercetin is linked to a beta-D-xylopyranose sugar unit.</p>
Miricetina- hexosídeo/extr ato das folhas	MACÊDO et al, 2015	 <p>The image shows the chemical structure of Miricetin-3-O-beta-D-glucopyranoside. It is a glycoside where the 3-hydroxyl group of Miricetin (which has hydroxyl groups at positions 3, 5, and 7) is linked to a beta-D-glucopyranose sugar unit.</p>

<p>Quercetina- ramnobiósídeo /extrato das folhas</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Undecano/óleo fixo das folhas</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Neofitadieno/ó leo fixo das folhas</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Ácido palmítico/óleo fixo das folhas e das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Linoleato de metila/ óleo fixo das folhas e das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Oleato de metila/óleo fixo das folhas</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Octadec-13- enoato de metila/ óleo fixo da folha</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	

<p>Estearato de metila/óleo fixo das folhas e das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p><i>Cis</i>- ácido vacênico/óleo fixo das folhas e das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>9,11-octadecadienoato de metila/óleo fixo das folhas e das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Ácido esteárico/óleo fixo das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Eicosenoic-11-anoato/óleo fixo das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Eicosenoato de metila/óleo fixo das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	
<p>Behenato de metila/óleo fixo das folhas e das sementes</p>	<p>MACÊDO et al, 2015</p>	

Lignocerato de metila/óleo fixo das folhas e das sementes	MACÊDO et al, 2015	
Esqualeno/óleo fixo das folhas	MACÊDO et al, 2015	
Tetratetracontano/óleo fixo das folhas	MACÊDO et al, 2015	
Cerotato de metila/óleo fixo das folhas e das sementes	MACÊDO et al, 2015	

Fonte: Elaborado pelo autor

1.9 Toxicogenômica

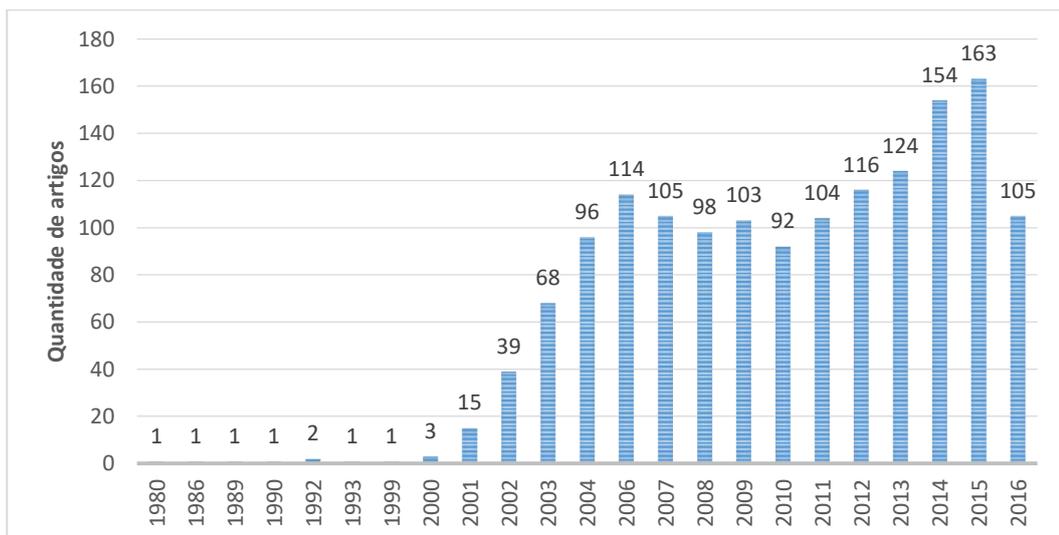
Muitos compostos químicos, provenientes da indústria, poluentes ou mesmo compostos de origem vegetal podem ser potencialmente tóxicos para o homem. O uso de muitos desses compostos como cosméticos, fármacos, aditivos alimentares e pesticidas tornam obrigatório uma prévia avaliação da toxicidade (REIS, 2006). A toxicologia tradicionalmente utiliza testes em animais, geralmente roedores, para identificar o risco de compostos químicos para humanos, mesmo sendo bem estabelecidos nos quesitos citológicos, fisiológicos, metabólicos e morfológicos, esses experimentos, além de considerações éticas, exigem um grande número de animais, tempo e dinheiro para a obtenção de resultados estatisticamente confiáveis e significativos, logo a ciência sempre está em busca de testes alternativos que visem reduzir a utilização de animais (CHEN *et al.*, 2012). O advento das tecnologias ômicas, como a genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica, proporcionaram grandes avanços na compreensão dos detalhes sobre os mecanismos moleculares de vários tipos de toxicidade (CAETANO, 2014).

A toxicogenômica é a integração entre tecnologias ômica, bioinformática e a toxicologia (BOVERHOF; ZACHAREWSKI, 2006). Esta tecnologia tem recebido a atenção e os investimentos da indústria farmacêutica por estar se mostrando preditiva no quesito de

mecanismos de ação e toxicidade além de vislumbrar a possibilidade de identificar medicamentos em potencial, de forma mais rápida, segura e econômica (BOVERHOF; ZACHAREWSKI, 2006). A utilização de microarranjos de DNA, a base da toxicogenômica, possibilita a investigação da expressão de dezenas de milhares de genes simultaneamente, permitindo a visualização de diferentes perfis de alteração e de assinatura gênica, que são únicos para cada composto e fornecem uma visão única sobre a toxicidade de uma droga que dificilmente pode ser alcançado por tecnologias convencionais (CHEN *et al.*, 2012).

Em uma pesquisa online foram encontradas 1.607 respostas para a pesquisa com o termo “Toxicogenomics” (12/07/2016), na base de dados Pubmed de trabalhos médicos e científicos, que faz parte do grande conjunto de bases de dados NCBI (*National Center for Biotechnology information*). Sendo a primeira citação a do artigo de 1980 de Jeffrey L. Blumer e colaboradores intitulado “Toxicogenetics of Niridazole in Inbred Mice”, que realizou uma análise da toxicidade do nidrazol. Depois desse trabalho inicial, apenas outros nove trabalhos correspondem à pesquisa até o ano de 1999 quando houve um aumento progressivo na publicação de artigos na área, até a data corrente da descrição deste trabalho, com 105 trabalhos apenas no ano de 2016 (Gráfico 1.1).

Gráfico 1.1: Quantidade de trabalhos publicados relacionados com toxicogenômica por ano desde 1980 até os dias atuais.



Fonte: Dadas gerados a partir do banco de dados PubMed, utilizando a palavra chave “toxicogenomics”.

Produtos naturais estão sempre presentes como base de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (CHAVAN *et al.*, 2006). Por se tratarem de misturas complexas os extratos e outras formulações de origem vegetal são quimicamente diversos e são capazes de modular múltiplos alvos biológicos simultaneamente incluindo a alteração de vários genes. Logo, a utilização de uma ferramenta como a toxicogenômica, que é capaz de analisar a expressão de muitos genes ao mesmo tempo, se torna adequada para melhorar a compreensão sobre os mecanismos genéticos de resposta de organismos frente a este tipo de amostra (LO, *et al.*, 2012, YOUNS *et al.*, 2010).

Utilizando a mesma base de dados (PubMed) para pesquisar o termo “*antioxidant*” são encontrados 468.068 resultados correspondentes com os primeiros trabalhos datados de 1974 com crescimento gradual até o momento com 22.953 trabalhos apenas para o ano de 2015, mostrando o quanto a pesquisa com esse enfoque é relevante para a ciência. Contudo, quando realizamos o cruzamento dos termos “*toxicogenomics*” e “*antioxidant*”; “*plant*” ou “*phenol*” temos como resultados 63, 43 e 31 trabalhos respectivamente, indicando que a pesquisa utilizando a toxicogenômica para investigar a resposta genética frente a compostos antioxidantes, fenóis e extratos de origem vegetal em geral ainda é uma área pouco explorada.

1.10 Referências

ALENCAR, F. O. C. C., Arborização Urbana no Distrito Federal: história e espécies do cerrado – Brasília: Novacap, p. 387, 2008.

AMEH, S. J.; OBODOZIE, O. O.; INYANG, U. S.; ABUBAKAR. M. S.; GARBA, M., Current phytotherapy – A perspective on the science and regulation of herbal medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 72 – 81, 2010.

AMIEVA, M. R.; EL-OMAR, E. M., Host-Bacterial Interactions in Helicobacter pylori Infection. **Gastroenterology**, v. 134, p. 306-323, 2008.

ARAUJO, M., M., Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais no assentamento Santo Antônio, Cajazeiras, PB Brasil. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos 2009

BABIOR, B. M., Superoxide: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 141-145, 1997.

BARREIROS A. L. B. S.; DAVID J. M., Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, **Quimica. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARROS, G. S.; MATOS, F. J. A.; VIEIRA, J. E. V.; SOUSA, M. P.; MEDEIROS, M. C., Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 116-122, 1970.

BASTOS, D. H.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G., Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Archives of Brazilian Endocrinology and Metabolism**, São Paulo , v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000500017>.

BOUKHRIS, M.; BOUAZIZ, M.; FEKI, I.; JEMAI, H.; ABDELFATTAH EL FEKI; SAYADI, S., Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. In alloxan induced diabetic rats. **Lipids in Health and Disease**. v. 11, p. 81, 2012.

BOVERHOF, D., R.; ZACHAREWSKI, T., R., Toxicogenomics in Risk Assessment: Applications and Needs **Toxicological Sciences**, v. 89(2), p. 352–360, 2006. doi:10.1093/toxsci/kfj018

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga, Serviço florestal brasileiro, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministerio da Integração Nacional – MIN. Nova delimitação do semi-árido brasileiro. Brasília, p. 32, 2006.

BRAZ FILHO, R.; RODRIGUES, A. S., Constituintes químicos de *Triplaris gardneriana*. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1974, Recife, Pernambuco. **Ciência e Cultura**, v. 26. p. 184, 1974.

- CAETANO, H., T., Toxicogenômica e Toxicologia: Parte I. As ciências “ômicas”. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 1, p. 40-49, 2014.
- CAPASSO, R.; IZZO A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N.; Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58 – S65, 2000.
- CARNEIRO, J. G.M.; CITO, A. M. G. L.; PESSOA, E. F., Constituintes voláteis do fruto do pajezeiro (*Triplaris* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 907-909, 2010.
- CARTAXO, S. L; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P., Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.
- CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C.; O papel do estresse oxidativo na DPOC: Conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.
- CHAVAN, P.; JOSHI, K.; PATWARDHAN, B.. DNA microarrays in herbal drug research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 447-457, 2006.
- CHEN, M., ZHANG, M.,BORLAK,J., TONG, W., A Decade of Toxicogenomic Research and Its Contribution to Toxicological Science. **Toxicological sciences**, v. **130(2)**, p. 217–228, 2012.
- DROGE W.; Free radicals in the physiological control of cell function, **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- ERB, M.; HOFFMANN-ENGER, B.; DEPPE, H.; SOEBERDT, M.; HAEFELI, R. H.; Features of Idebenone and Related Short-Chain Quinones that Rescue ATP Levels under Conditions of Impaired Mitochondrial Complex I. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e36153, 2012.
- EVERETT, E.; CÉSPEDES, L. R.; SHELFORD, C.; EXLEY, J. F.; COLLINGWOOD, J.; DOBSON, G.; VAN DER LAAN, C. A.; JENKINS, E.; Arenholz N. D.; Telling Ferrous, iron formation following the co-aggregation of ferric iron and the Alzheimer's disease peptide b-amyloid (1-42) **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 95, p. 20140165, 2014..
- FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U., Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from brazilian semiarid region. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema dedefesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M., Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 48, p. 17-24, 2008.

FINI, A.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; TATTINI, M.; Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants, **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 5, p. 709-711, 2011.

FLORA BRASILIÊNSIS: Acessado em 05/08/ 2016, disponível em http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=10803

FLOYD, R. A.; Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J**; v. 4, p. 2.587-97. 1990.

FOOD INGREDIENTES BRASIL, Dossiê antioxidantes, **Revista Food ingredientes Brasil**, nº6, 2009.

FRANÇA, P. R. C.; GONÇALVES, E. P.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. A. L.; LIMA, C. F.; VIEIRA, R. M.; GALINDO E. A., **Germinação e Vigor de Sementes de Coaçu em Diferentes Substratos**. Associação Brasileira de Horticultura, 2007.

GALLE, J., Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. 11, p. 2135-2137, 2001.

GENESTRA, M., “Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants,” **Cellular Signalling**, vol. 19, no. 9, pp. 1807–1819, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374 – 381, 2007.

HALLIWELL, B., Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls. **Biomedical journal**, v. 37, n. 3, p. 99, 2014.

HALLIWELL, B., Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 341–347, 2007.

HALLIWELL, B., The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637-644, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 246, n. 2, p. 501-514, 1986.

HILGEMAN, N.; Avaliação da capacidade antioxidante in vitro e in vivo contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de plantas medicinais. Tese de doutorado em química - Universidade Federal de Sana Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

HOSHINO Y, MISHIMA M. Antioxidants & redox signaling redox-based therapeutics for lung diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 4, p. 701-704, 2008.

JACOB, K. D.; NICOLE, N. H.; ANDRZEJ, R. T.; MICHELE, K. E., Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease. **Mechanisms of ageing and development**, v. 134, n. 3, p. 139-157, 2013.

JOÃO DE DEUS MEDEIROS, UnB – Distrito federal, Distrito federal – Brasil, 2010, acessado em 05/08/2016, disponível em <https://www.flickr.com/search/?text=triplaris%20gardneriana>

KARAKAYA, S.; Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453-454, 2004.

KHANSARI, N.; SHAKIBA, Y.; MAHMOUDI, M., Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of AgeRelated Diseases and Cancer, **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 3, p. 73-80, 2009

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, mar. 2011. ISSN 03088146.

LO, H. Y.; LI, C. C.; HUANG, H. C.; LIN, L. J.; HSIANG, C. Y.; HO, T. Y. Application of transcriptomics in Chinese herbal medicine studies. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 2, n. 2, p. 105, 2012.

MACÊDO, S. K. S., TAMIRES DOS SANTOS, A.; CHRISTIANE, A. A. F; ANA PAULA, O.; VICTOR HUGO, A. A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; EDIGÊNIA, C. C. A.; JACKSON ROBERTO, G. S. A.; NAIANE, D. S. S. AND XIRLEY, P. N.; Photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 9, n. 7, p. 207–215, 2015.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p.727-747, 2004,

MATÉS, J.M.; Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p. 83–104, 2000.

MELO, E. Polygonaceae of the "Cadeia do Espinhaço", Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 3, p. 273-300, 2000.

MENEZES, R. S. C.; GARRIDO, M. S.; MARIN, A. M. P. Fertilidade dos solos no semi-arido. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife, PE. Anais... Recife, v. 1, p. 1-30,2005.

MULLER F. L.; SONG W.; LIU Y.; CHAUDHURI A.; PIEKE-DAHL S.; STRONG R.; HUANG T. T.; EPSTEIN C. J.; ROBERTS L. J.; CSETE M.; FAULKNER J. A.; VAN REMMEN H. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 11, p. 1993-2004, 2006.

OZSUREKCI, Y.; AYKAC, K., Oxidative Stress Related Diseases in Newborns, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

Pham-Huy, L. A., Pham-Huy, C., “Free radicals, antioxidants in disease and health,” **International Journal of Biomedical Science**, vol. 4, no. 2, pp. 89–96, 2008.

- PISOSCHI, A., M.; POP, A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- PLAZA, C. V., Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- QUEIROZ, S., L., BATISTA, A., A., Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.
- REIS, L. Toxigenômica na avaliação de compostos químicos. **Revista Lusófona de ciências e tecnologias da saúde**. v.(3)1, p. 37-52, 2006.
- ROENGRIT, T.; WANNANON, P.; PRASERTSRI, P.; KANPETTA, Y.; SRIPANIDKULCHAI, B.-O.; LEELAYUWAT, N., Antioxidant and anti-nociceptive effects of *Phyllanthus amarus* on improving exercise recovery in sedentary men: a randomized crossover (double-blind) design. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11(1), p. 9, 2014.
- ROVER-JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T., Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo, **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.
- SANTOSA, S.; JONES, P. J., Oxidative stress in ocular disease: does lutein play a protective role? **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, n. 8, p. 861-862, 2005.
- SELMA, M. V.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A., Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 57, p. 6485-6501, 2009.
- SHAH, S. M. M.; SADIQ, A.; SHAH, S. M. H.; ULLAH, F., Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14(1), p. 181, 2014.
- SOUZA, M. P.; ROUQUAYROL, M.Z. Molluscicidal activity of plants from northeast Brazil. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**. v. 7, n. 4, p. 389394, 1974.
- VINGT-UN ROSADO; ROSADO, A. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza: **Acervo Virtual Oswaldo Lamartine de Faria**. Mossoró, p. 624, 2009.
- VOSS, P.; SIEMS, W.; Clinical oxidation parameters of aging. **Free radical research**, v. 40, n. 12, p. 1339-1349, 2006.
- WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L., Antioxidants and prevention of chronic disease, **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 4, p. 275-295, 2004.
- YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V., Antioxidants in health and disease, **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

Youns, M.; Hoheisel, J. D.; Efferth, T, Toxicogenomics for the prediction of toxicity related to herbs from traditional Chinese medicine. **Planta medica**, v. 76, n. 17, p. 2019-2025, 2010.

Capítulo II

ANÁLISES QUÍMICAS E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.1. Caracterização do problema/justificativa científica

Em organismos aeróbicos, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies altamente reativas se formam naturalmente como resultado do metabolismo ou são intencionalmente produzidas por este. Como exemplos dessas substâncias temos o ânion superóxido, radical peróxil, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peroxinitrito (DAIBER, 2010; MOTHANA, 2011).

Em um organismo fisiologicamente ativo as ERO são detoxificadas e/ou são eliminadas por enzimas e compostos antioxidantes de origem endógena e/ou obtidos de forma exógena. Indivíduos idosos e pessoas submetidas a fatores de aumento da produção de ERO estão sujeitos a um quadro de estresse oxidativo que pode desencadear processos de peroxidação lipídica, degradação de proteínas e danos ao DNA, induzindo estados fisiopatológicos relacionados com diversos efeitos adversos e doenças, como o envelhecimento precoce, inflamação, catarata, arteriosclerose, câncer, Parkinson, Alzheimer e síndromes autoimunes e degenerativas (FUSCO *et al.*, 2009; KSOURI *et al.*, 2011; TERASHIMA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2009; NADOUR *et al.*, 2012).

A avaliação da atividade antioxidante de novos compostos tem sido uma questão relevante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de frutas, legumes, chás e sucos como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco, podendo ser utilizados para reduzir as chances de acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, diabetes e câncer (GHASEMZADEH & GHASEMZADEH, 2011) ou ainda atuar como coadjuvantes no tratamento de diversas doenças (SILVA *et al.*, 2005).

Plantas medicinais possuem diversos compostos químicos com potencial antioxidante. Dentre as classes com essa propriedade, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por apresentarem comprovada atividade na inibição de processos que envolvem radicais livres, como peroxidação lipídica, inflamações crônicas e outras (SOUSA *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2012, PARK *et al.*, 2008).

As condições ambientais, biótica e abióticas, tais como estímulos mecânicos como injúrias ou ataque de patógenos bem como o órgão da planta e seu estado de desenvolvimento podem influenciar o conteúdo dos metabólitos secundários (CAPASSO, 2000; HILGEMANN, 2010). É possível supor que vegetais provenientes de biomas onde altas temperaturas e restrições

hídricas são comuns, como aquelas apresentadas pela Caatinga, podem apresentar uma maior concentração natural de moléculas biologicamente ativas como os compostos fenólicos em geral (FINI *et al.*, 2011).

Em um estudo preliminar realizado por nosso grupo (Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia, UFC)). As sementes de algumas plantas da Caatinga apresentam atividade antioxidante nas sementes, entre elas *Triplaris gardneriana* Wedd., planta que constitui o objeto de estudo do presente projeto. Este trabalho indicou a viabilidade da investigação mais aprofundada dessa planta e de suas moléculas bioativas com atividade antioxidante (FARIAS *et al.*, 2013).

A pesquisa sobre plantas de biomas negligenciados, como a Caatinga, por si só, é de extrema relevância, e a bioprospecção dessas plantas pode resultar em descobertas significativas de substâncias bioativas, abrindo novos horizontes de pesquisa com fitoterápicos e trabalhos de conservação de sua Flora, trazendo benefícios à sociedade e ao seu entorno, até mesmo estimulando os órgãos competentes a uma melhor manutenção do meio ambiente.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo Geral

Este trabalho objetiva identificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante presente no extrato etanólico e frações obtidos das sementes de pajeú (*Triplaris gardneriana* Wedd.)

2.2.2. Objetivos Específicos

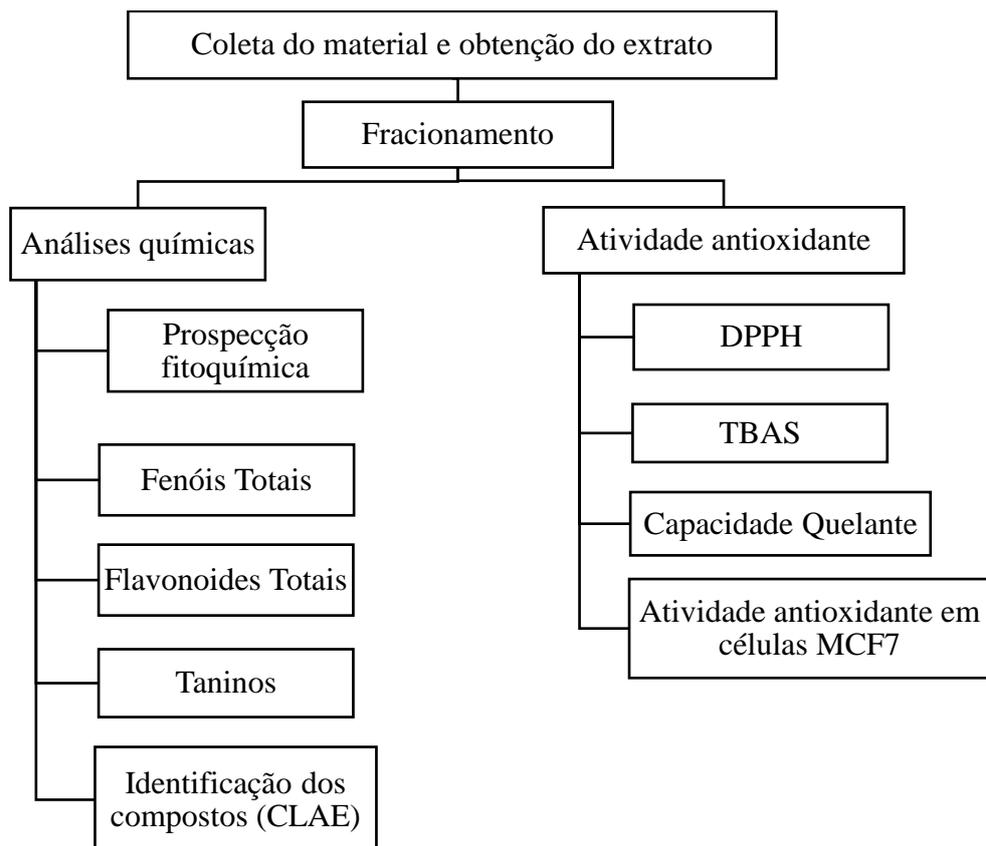
- Obter o extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* Wedd. (Poligonaceae) e realizar a caracterização química qualitativa das classes de metabólitos secundários presentes;
- Fracionar o extrato etanólico de *T. gardneriana* e realizar a caracterização química qualitativa das classes de metabólitos secundários presentes em cada fração;
- Verificar o potencial antioxidante *in vitro* das amostras (extrato, frações e substâncias isoladas) por diversas metodologias;
- Avaliar *in vitro* a capacidade das amostras em prevenir a geração intracelular de ERO;
- Avaliar *in vitro* a capacidade das amostras em restaurar o balanço oxidativo intracelular de ERO.

2.3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia experimental seguiu as etapas descritas no fluxograma 2.1. Após a obtenção do extrato etanólico, será realizado seu fracionamento e, posteriormente, as análises químicas e biológicas:

- Análises químicas, que consistem em determinações quali- e quantitativas de compostos fenólicos no extrato e em suas frações;
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* por meio de diferentes metodologias para elucidar as diferentes vias de ação;

Fluxograma 2.1: Atividades previstas para o desenvolvimento do projeto de pesquisa subdividido em duas linhas principais: análises químicas e atividade antioxidante. CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - *Thiobarbituric acid reactive substances*; Fe: Ferro,

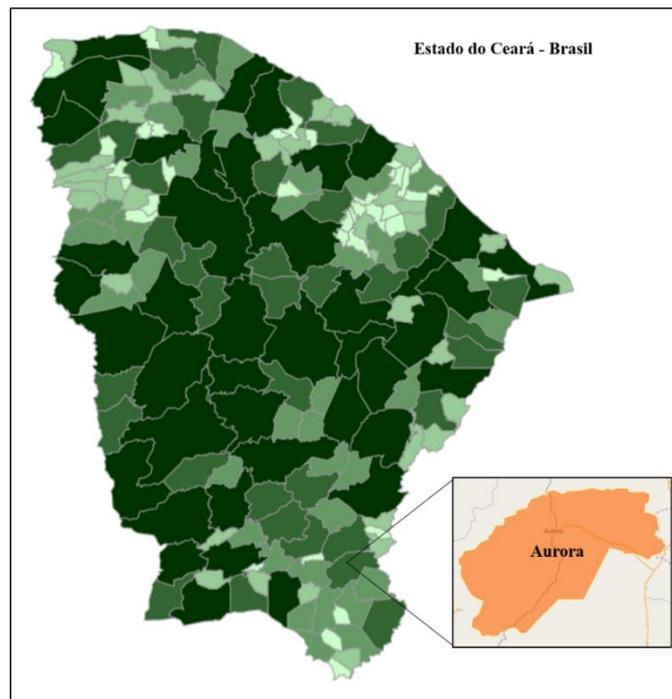


2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal

Sementes de *T. gardneriana* Wedd foram coletadas ao final do período de floração e início do período de frutificação que ocorrem entre janeiro e março. O local de coleta foi a cidade de Aurora, no sul do estado do Ceará, na região Nordeste do Brasil (Figura 2.1). Esta cidade está situada dentro da região do bioma da Caatinga. Para realização da coleta o projeto conta com o registro de número 47978-1, para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico junto ao SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade.

Figura 2.1: Mapa ilustrativo da cidade local de coleta.



Fonte - Adaptado do IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016.

Após a coleta foram preparadas exsicatas que foram levadas para identificação no Herbário Prisco Bezerra (EAC39600), localizado na Universidade Federal do Ceará – UFC (Fortaleza, Brazil).

2.4.2 Preparação do Extrato

As sementes coletadas foram selecionadas e secas em estufa a 50 °C, sendo, em seguida, trituradas, para aumento da superfície de contato. Em seguida, o material foi submerso em etanol P.A. (1:2 M/V) para extração prolongada a temperatura ambiente e em recipientes protegidos da luz. Foi realizada a troca do solvente, a cada três dias de extração, atingindo uma relação final de massa/volume de 1:6, segundo a metodologia descrita por Matos (1988), com modificações.

O extrato foi submetido a duas filtrações seguidas, a primeira utilizando algodão, e a segunda, papel filtro, para garantir retirada total da torta e retenção de impurezas menores. A destilação do solvente foi realizada em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada entre 50-60 °C, com posterior retirada do excedente etanólico em banho-maria. O extrato bruto obtido foi acondicionado a -20 °C até o momento das análises ou dos processos de fracionamento. O rendimento obtido para o Extrato Etanólico de *Triplaris gardneriana* (EETg) foi de 26%.

2.4.3 Obtenção das Frações do Extrato Etanólico das Sementes

Para realização do fracionamento, 20 g do extrato etanólico foi homogeneizado com o auxílio de um almofariz em sílica gel 60 G até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Utilizando um funil de Büchner e kitassato acoplado a uma bomba de vácuo, o extrato foi tratado adicionando-se diferentes solventes em ordem crescente de polaridade. Cada solvente foi adicionado até que após sua passagem a sílica se mostrasse visualmente límpida. Os solventes utilizados foram: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água.

Esse processo cromatográfico teve como objetivo realizar uma primeira separação dos compostos presentes no extrato etanólico por meio da afinidade dos diferentes compostos pelas polaridades dos solventes utilizados. Em seguida, cada fração foi separadamente filtrada para garantir total retirada da sílica e foram submetidas à destilação em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura controlada, entre 50-60 °C, com posterior retirada dos solventes excedentes em banho-maria. As frações obtidas foram: Fração hexânica de *T. gardneriana* - FHTg; Fração clorofórmica de *T. gardneriana* - FCTg; Fração acetato de etila de *T.*

gardneriana – FATg; Fração metanólica de *T. gardneriana* – FMTg; Fração aquosa de *T.s gardneriana* – FAqTg. Assim como o EETg, as frações foram acondicionadas em frascos protegidos da luz e mantidas a -20 °C até o momento das análises químicas e demais ensaios.

2.4.4 Análises Químicas

2.4.4.1 Prospecção Fitoquímica

O EETg foi submetido à análise preliminar para a detecção de grandes classes de metabólitos secundários. A metodologia utilizada foi descrita por Matos (1997). Em resumo, parte do extrato foi solubilizada em etanol 70% (0,3 g/30 mL), e, em seguida, alíquotas de 3 mL da solução foram separadamente submetidas a diversos tratamentos, como acidificação, alcalinização, agitação e aquecimento. Mudanças da coloração, formação de precipitados e de espuma nos tratamentos foram observadas e analisadas, pois são indicativos de diferentes classes de metabólitos.

2.4.4.2 Determinação de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais dos extratos e frações de *T. gardneriana* foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), com algumas modificações. Resumidamente, em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 50 µL das amostras, em concentrações pré-determinadas, a 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu (33% v/v), seguido por uma espera de 3 minutos para, logo, adicionar 100 µL de água destilada e 100 µL de carbonato de sódio (7,5%), nesta ordem. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos no escuro e a absorbância foi medida a 700 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Epoch, *Take 3 module*, BioTek fabricante, Winooski, VT, EUA). Para a quantificação, o ácido gálico foi usado como referência para a realização da curva padrão de compostos fenólicos. O coeficiente de determinação da curva analítica foi de $R^2 = 0,9998$. O conteúdo total fenólico é expresso em microgramas de ácido gálico por miligramas de amostra. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

2.4.4.3 Determinação de Flavonoides Totais

Para determinação da concentração de flavonoides foi utilizado o método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio, como descrito por Woisk e Salatino (1998), com algumas modificações. Quercetina foi utilizada para realização da curva padrão e obtenção do fator de calibração. Dez miligramas de quercetina foram dissolvidas em etanol 80%, sendo, em seguida, feitas diluições para a obtenção das concentrações 25, 50 e 100 µg/mL. As soluções padrões ou do extrato e frações (0,5 mL) foram separadamente misturadas com 1,5 mL de etanol 95%; 0,1 mL de cloreto de alumínio 10%; 0,1 mL de acetato de potássio 1 M e 2,8 mL de água destilada. Após a incubação à temperatura ambiente, por 30 minutos, a absorbância da mistura foi lida a 415 nm. O cloreto de alumínio foi substituído por água destilada no branco. Os resultados foram expressos em microgramas de quercetina por miligrama de amostra. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.4.4.4 Determinação de Taninos

A determinação de taninos foi executada pelo método de difusão radial (HAGERMAN, 1987). Este método tem como princípio a reação entre taninos e proteínas em gel de agarose, formando um halo visível e mensurável. Para esta reação, um tampão de 50 mM de ácido acético, 60 µM de ácido ascórbico e 0,04% de azida sódica foi preparado (pH 5,0). Este tampão foi usado para preparar o gel de agarose 1%. Inicialmente a solução tampão foi aquecida até completa homogeneização da agarose e, depois, arrefecida a 45 °C. Neste ponto, 0,1% de albumina bovina sérica foi adicionada. Rapidamente, o gel foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (15 mL em cada). As placas tampadas foram colocadas sob refrigeração, por 10 minutos, para assegurar a geleificação. Poços de 4 mm de diâmetro foram feitos no gel com distância de, no mínimo, 2 cm entre os poços e das bordas da placa. Com ajuda de uma micropipeta, quatro alíquotas sucessivas de 8 µL de amostra foram adicionadas aos poços. Essas placas foram incubadas por 96 h a temperatura ambiente. Para obter uma curva padrão, o mesmo procedimento foi realizado com diluições seriadas feitas a partir de uma solução etanólica (70%) de ácido tânico a uma concentração variando entre 84 e 1680 µg/poço. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

2.4.4.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

2.4.4.5.1 Química, Aparelhos e Procedimentos Gerais

Todos os reagentes utilizados possuíam pureza com grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, epicatequina, ácido elágico, rutina, quercetrina, isoquercetrina, quercetina, canferol e glicosídeos de canferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada utilizando o sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT com duas bombas alternadas ligadas ao degaseificador DGU 20A5 com o integrador CBM 20^a, UV-VIS com detector DAD (diodo) SPD-M20A e Software LC *solution*.

2.4.4.5.2 Quantificação de Compostos por CLAE

A análise cromatográfica com fase reversa foi realizada utilizando colunas C18 (4,6 mm x 250 mm), com partículas medindo 5 µm de diâmetro. A fase móvel continha uma solução de água e 2% de ácido acético (A) e metanol (B), com composição do gradiente de 5% de B nos primeiros dois minutos mudando para a obtenção de 25, 40, 50, 60, 70 e 100% de B nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 80 minutos, respectivamente, segundo a metodologia descrita por Laghari *et al.*, (2011), com ligeiras modificações. O extrato e frações de *T. gardneriana* (EETg; FMTg; FATg; FCTg e FAqTg) e a fase móvel foram filtradas (filtro milipore - 0,45 µm), degaseificadas com auxílio de um ultra-som. As amostras foram analisadas a uma concentração de 20 mg / mL. A taxa de fluxo foi de 0,7 mL / min e o volume de injeção foi de 40 µL. As soluções padrão foram preparadas em concentrações variando entre 0,030 e 0,250 mg/mL de catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, canferol e rutina, e entre 0,45 e 500 mg/mL para ácidos gálico, clorogênico, elágico e cafeico. A quantificação foi realizada utilizando o método padrão e integração externa dos picos a 257 nm para o ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 325 nm para clorogênico, elágico e ácido cafeico, e 365 para a quercetina, quercitrina, isoquercitrina, canferol, rutina e glicosídeo de canferol. Os picos da cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os

de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). As curva de calibração foram: para o ácido gálico: $Y = 14063x + 1187,9$ ($r = 0,9997$); ácido clorogênico: $Y = 12850x + 1372,5$ ($r = 0,9993$); ácido caféico: $Y = 12748x + 1240,8$ ($r = 0,9991$); ácido elágico: $Y = 13065x + 1197,8$ ($r = 0,9999$); catequina: $Y = 11964x + 1387,6$ ($r = 0,9999$); epicatequina: $Y = 12678x + 1329,7$ ($r = 0,9990$); rutina: $Y = 12756x + 1367,1$ ($r = 0,9996$); quercetina: $Y = 14274x + 1341,5$ ($r = 0,9995$); quercitrina: $Y = 12694x + 1357,4$ ($r = 0,9993$); isoquercitrina: $Y = 12571x + 1358,5$ ($r = 0,9997$) e canferoll: $Y = 13657x + 1293,8$ ($r = 0,9999$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ foram calculadas com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, tal como definido por Boligon *et al.* (2013). LD e LQ foram calculados como $3,3$ e $10 \sigma / S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

2.4.5 Atividade Antioxidante *in vitro*

2.4.5.1 Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A capacidade antioxidante do extrato e frações foram avaliadas utilizando o método fotocolorimétrico do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), descrito por Mensor *et al.* (2001). O radical DPPH apresenta em sua forma instável a coloração púrpura e, quando neutralizado, torna-se incolor. O princípio dessa técnica consiste em verificar se há ou não neutralização, com base nas absorbâncias das soluções de DPPH e das amostras a serem avaliadas.

Nesse método, é preparada uma solução de $0,3$ mmol de DPPH em etanol. A avaliação foi realizada utilizando placas de microdiluição de 96 poços, onde as amostras para testes foram preparadas adicionando-se $100 \mu\text{L}$ da solução DPPH em $100 \mu\text{L}$ de soluções das amostras, que foram diluídos em etanol P.A, em concentrações variando de 1 a $500 \mu\text{g/mL}$ e em triplicata.

Como controle negativo, foi utilizado 100 µL de DPPH e 100 µL de etanol. Para controle positivo se utilizou ácido ascórbico nas mesmas concentrações das amostras testadas. A reação ocorreu no escuro à temperatura ambiente durante 30 min. A absorbância foi lida com auxílio de um espectrofotômetro a 518 nm. A atividade antioxidante foi estimada utilizando a seguinte fórmula:

$$\%N = 100 \times (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}$$

Onde %N é o percentual de neutralização, Abs_{controle} é a absorbância do controle negativo (DPPH + Álcool); e Abs_{amostra} é a absorbância das amostras. Uma vez obtida a atividade antioxidante convertida em porcentagem será realizado o cálculo para determinação da capacidade de inibir 50% do DPPH (CI₅₀) em µg/mL.

2.4.5.2 Grau de Inibição da Peroxidação Lipídica -TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

Ao ocorrer danos à camada lipídica há a produção de diversos subprodutos, entre eles espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico como o malondialdeído. A metodologia que foi utilizada nessa investigação é similar à utilizada na degradação da desoxirribose com séries de reações, seguidas da leitura das absorbâncias na faixa de 532 nm.

Foi preparada uma solução de gema de ovo (Solução 3:2 - hexano:álcool isopropílico) na proporção de 1 g para 10 mL. Esta solução foi filtrada e rotoevaporada, sob pressão reduzida, a 60 °C, até a obtenção de resíduo seco. Para o ensaio TBARS, se solubilizou 0,05 g do resíduo em 10 mL de água destilada.

A produção de TBARS foi determinada utilizando um método modificado, de Sabir e Rocha (2008). Os homogeneizados obtidos com fosfolípideo de ovo e diferentes concentrações das amostras (16 -250 µg/mL), em conjunto com um volume adequado de água deionizada (volume total de 500 µL), foram pré-incubados a 37 °C durante 1 h na presença ou ausência de ferro como agente indutor de peroxidação lipídica por estresse oxidativo. A reação de cor ocorre pela adição, após a pré-incubação, de 500 µL de tampão ácido acético (pH-3) e 500 µL de TBA

0,6% dissolvido em água destilada. As misturas de reação, incluindo uma série de diluições de 0,03 mM de MDA padrão, foram incubadas a 97 °C por 1 h e, após esse período, foi realizada uma partição com butanol para cada solução. A leitura da absorbância deverá ser realizada após o resfriamento dos tubos, utilizando a fase butanólica, com comprimento de onda ajustado para 532 nm. Todos os testes foram acompanhados de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de MDA para realizar o cálculo do fator de correção, esses dados foram utilizados para o cálculo da concentração de MDA (nmol de MDA/g de tecido). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.5.3 Atividade Quelante

A fim de avaliar propriedade quelante dos extratos e frações, foi usado o método da fenantrolina, com pequenas modificações (PUNTEL; NOGUEIRA; ROCHA, 2005). Resumidamente, uma mistura contendo 40 µL de Fe²⁺ (120 µM Fe₂SO₄) e 20 µL das amostras nas concentrações de 62,5 a 1.000 µg/mL foi somada a 591 µL de água destilada mais 376 µL de tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,2), seguido de 5 minutos de espera para formar complexos entre o Fe(II) e os compostos que têm essa propriedade. Depois disso, 13 µL de fenantrolina (0,25%) foram adicionados para formar complexos coloridos com os íons de ferro que permaneceram livres. A absorbância foi registrada a 510 nm. Os valores foram expressos em percentual em relação ao controle (mistura de reação sem amostra). As soluções de Fe₂SO₄ foram preparadas logo antes do uso em água destilada. Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi usado como controle positivo do ensaio nas mesmas concentrações das amostras. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.4.5.4 Cultivo de células MCF 7

Frascos de cultivo celular contendo uma suspensão de células de carcinoma de mama MCF 7 (ATCC, HTB-22; número de passagem de 8-12), a uma densidade de 5,10⁴ células/mL em meio de cultura DMEM (enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado e 3 mL de penicilina/estreptomicina), foram incubadas numa atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade relativa.

Depois de 72 h de incubação foi realizada uma troca do meio de cultura seguida da análise em microscópio óptico para investigação de contaminações e estimação da confluência celular, que deve estar entre 40 e 50%. Os frascos eram então incubados novamente e uma nova avaliação e troca de meio de cultura é realizada após 48 h (confluência celular 70-80%).

Após 72 h da última troca do meio de cultura (confluência celular entre 90 e 100%) o meio de cultura é retirado, as células são lavadas, tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura, contadas em câmara de Neubauer, para ajuste de concentração e passadas para novos frascos ou semeadas para placas de 96 poços para os ensaios.

2.4.5.5 Espécies reativas de oxigênio intracelular

A geração Intracelular de ROS foi estimada utilizando um indicador de radicais livres no citoplasma, o reagente vermelho fluorescente CELLROX[®] *Deep Red* da Life Technologies[™], Holanda. CELLROX[®] reagente é um corante estável que não é fluorescente enquanto está em estado reduzido, mas é capaz de se difundir através da membrana da célula, onde é oxidado na presença de espécies reativas de oxigênio gerando, então, um produto fluorescente brilhante. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de ERO formada dentro da célula (Bone, Seredick et al. 2013).

Dois compostos diferentes foram utilizados como indutores do estresse oxidativo x: o hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) e a menadiona. Como inibidor do estresse oxidativo padrão indicado pela *Life Technologies* foi usado N-acetil-cisteína (NAC). Para o controle negativo foi usado o meio de cultura celular DMEM contendo a mesma quantidade de DMSO (dimetil sulfóxido), utilizado para dissolver amostras.

Foram feitas algumas alterações nas instruções do fabricante (<http://www.lifetechnologies.com>) para permitir a avaliação da capacidade das amostras em prevenir o estresse oxidativo induzido por TBHP e menadiona. Da mesma forma para avaliar a capacidade das amostras em ajudar a células a restaurar o balanço oxidativo, depois de terem sido submetidas a um aumento na produção de ERO, induzido por TBHP e menadiona. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.4.5.5.1 Avaliação da capacidade das amostras em prevenir a geração de ERO intracelular.

Placas de microdiluição de 96 poços, contendo 100 µL em cada poço de uma suspensão de células MCF 7, a uma densidade de $5 \cdot 10^4$ células/mL em meio de cultura DMEM foram incubadas por 72 h numa atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade relativa. Ao final do período de cultivo, foram adicionados 25 µL das substâncias a serem testadas, sendo elas: NAC (concentração final 5 mM), EETg (100 µg/mL), quercetina (40 µg/L - controle de flavonoide), ácido gálico, ácido cafeico (20 e 100 µg/mL respectivamente - controles de ácido fenólico), ou meio de cultura fresco como controle negativo.

Após a adição das amostras, as placas foram incubadas, novamente, a 37 °C durante 1 h. Em seguida, o meio de cultura de cada poço foi renovado para evitar que as amostras presentes no meio extracelular interferissem no experimento. Subsequentemente foram adicionados 25 µL TBHP (concentração final de 100 µM) ou menadiona (concentração final de 100 µM) para induzir estresse oxidativo. A exposição durou 1 h e, então, 50 µL de solução corante contendo Hoechst 33342 (concentração final de 4 µM, um corante fluorescente de indicação de DNA) e reagente CellROX® (concentração final 5 mM) foram adicionados a cada poço, atingindo o volume final de 200 µL, seguido de uma nova incubação durante 45 min a 37 °C.

As intensidades de fluorescência foram detectadas pelo analisador de imagens celulares *Cellavista Imager* (Bio SyntenTec Services GmbH, Elmshorn, Alemanha). Hoechst 33342 foi detectado com comprimento de onda de excitação a 395 (DAPI) LED e comprimento de onda de emissão a 452/45 nm (DAPI) nm. A fluorescência do reagente CellROX® *Deep Red* foi detectada com excitação em comprimento de onda 620 nm (Cy5) e comprimento de onda de emissão a 692/40 nm (Cy5). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o teste foi repetido para confirmação dos resultados obtidos.

2.4.5.5.2 Avaliação da capacidade das amostras em restaurar o balanço oxidativo intracelular de ERO.

Placas de microdiluição de 96 poços, contendo 100 µL em cada poço de uma suspensão de células de carcinoma de mama MCF 7, a uma densidade de $5 \cdot 10^4$ células/mL em meio de cultura DMEM foram incubadas por 72 h numa atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade

relativa. Ao final do período de cultivo, foi adicionado 25 µL TBHP (concentração final de 100 µM) ou menadiona (concentração final de 100 µM) para induzir estresse oxidativo. Também foi adicionado em poços separados 25 µL de meio de cultura fresco como controles negativos.

Após a adição dos indutores de estresse as placas foram incubadas, novamente, a 37 °C durante 1 h. Em seguida, o meio de cultura de cada poço foi renovado para evitar que as amostras presentes no meio extracelular interferissem no experimento. Subsequentemente, foram adicionadas 25 µL das substâncias a serem testadas, sendo elas: NAC (concentração final 5 mM), EETg (100 µg/mL), quercetina (40 µg/L - controle de flavonóide), ácido gálico, ácido cafeico (20 e 100 µg/mL, respectivamente - controles de ácido fenólico), ou meio de cultura fresco.

A exposição às amostras durou 1 h e, então, 50 µL de solução corante, contendo Hoechst 33342 (concentração final de 4 µM, um corante fluorescente de indicação de DNA) e reagente CellROX® (concentração final 5 mM) foi adicionado a cada poço, atingindo o volume final de 200 µL, seguido de uma nova incubação durante 45 min a 37 ° C.

As intensidades de fluorescência foram detectadas pelo analisador de imagens celulares *Cellavista Imager* (Bio SynenTec Services GmbH, Elmshorn, Alemanha). Hoechst 33342 foi detectado com comprimento de onda de excitação a 395 (DAPI) LED e comprimento de onda de emissão a 452/45 nm (DAPI) nm. A fluorescência do reagente CellROX® *Deep Red* foi detectada com excitação em comprimento de onda 620 nm (Cy5) e comprimento de onda de emissão a 692/40 nm (Cy5). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o teste foi repetido para confirmação dos resultados obtidos.

2.5 Resultados

2.5.1 Caracterização química

A análise fitoquímica do extrato etanólico de *T. gardneriana* mostrou um perfil que compreende várias classes de metabólitos secundários tais como fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóis, xantonas, auronas, flavonoides, leucoantocianidinas, terpenos e saponinas (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Triplaris gardneriana* Wedd.

Extrato	Classes de metabólitos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
EETg	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+

Tabela: 1 = Fenóis; 2 = taninos condensados; 3 = taninos pirrogálicos; 4 = antocianinas; 5 = antocianidinas; 6 = flavonas; 7 = flavonóis; 8 = flavonóis; 9 = flavononois; 10 = xantonas; 11 = chalconas; 12 = auronas; 13 = proantocianidinas; 14 = catequinas; 15 = terpenos; 16 = saponinas; + = presença; - = Ausência

As presenças de alguns compostos pertencentes a algumas dessas classes foram confirmadas, identificadas e quantificadas por métodos subsequentes à caracterização química.

A fração que obteve o melhor rendimento foi a metanólica representando 66,13% do peso do extrato etanólico que foi inicialmente utilizado. Isso provavelmente ocorre devido à maior proximidade entre a polaridade do metanol e a do etanol na escala eluotrópica. Por ordem de rendimento, a fração metanólica foi seguida pela fração hexânica, fração acetato de etila, clorofórmica e fração aquosa, com 8,85; 6,42; 4,99 e 2%, respectivamente. A fração hexânica foi descartada, pois a sua composição, predominantemente apolar, dificultou a realização dos experimentos, e o ensaio preliminar com DPPH não demonstrou nenhum indício de atividade antioxidante. Todas as demais amostras tiveram a sua composição investigada através do CLAE. A fração clorofórmica também foi descartada dos experimentos por não apresentar nenhum indício de atividade antioxidante na análise preliminar com o DPPH. A fração aquosa apresentou atividade antioxidante, mas o seu rendimento foi o mais baixo entre todas as frações, o que dificultava a obtenção para repor o seu estoque, todo o material disponível foi utilizado para identificação da composição química através da CLAE e ensaios antioxidantes DPPH e atividade quelante.

A determinação de fenóis mostrou que a fração de acetato de etila conseguiu concentrar mais compostos fenólicos, seguida pela fração metanólica e extrato etanólico com valores de 174,67; 131,94 e 92,78 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente (Tabela 2.2). Para a determinação de flavonoides a fração acetato também obteve a maior concentração (57,05 $\mu\text{g}/\text{mg}$) seguido do extrato e fração metanólica que apresentaram resultados estatisticamente semelhantes (35,56 e 31,90 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectivamente (Tabela 2.2). Em relação ao ensaio de estimativa de taninos, a fração de acetato de etila teve a mais alta concentração com 0,43 equivalente de ácido tânico

em μg por grama de amostra, seguido pelo extrato etanólico com 0,36 e a fração metanólica com 0,25 $\mu\text{g/g}$ amostra (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Taninos, fenois e flavonoides totais de *Triplaris gardneriana* Wedd

Amostras	Caracterização química		
	Fenois totais*	Flavonoides**	Taninos***
Extrato etanólico	92.78 \pm 3.01a	35.56 \pm 1.88a	0,355 \pm 0,04a
Fração metanólica	131.94 \pm 4.99b	31.90 \pm 3.94a	0,259 \pm 0,04b
Fração acetato de etila	174.67 \pm 4.22c	57.05 \pm 6.72b	0,428 \pm 0,02a

Os valores representam a média \pm desvio padrão de três leituras diferentes. Valores seguidos da mesma letra, para cada ensaio, são semelhantes segundo a análise de variância ANOVA.

*Ácido gálico equivalente em μg por mg de extrato ou fração.

**Quercetina equivalente em μg por mg de extrato ou fração.

***Ácido tânico equivalente em μg por mg de extrato ou fração.

2.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

A análise por CLAE conseguiu identificar nas amostras um total de 12 picos correspondentes aos compostos padrão, sendo quatro ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico e ácido cafeico) e oito flavonoides (catequina, epicatequina, rutina, quercetina, isoquercetrin, quercetrina, canferol e glicosídeo de canferol) (Figura 2.2). As estruturas de cada composto identificado podem ser visualizadas nas figuras 2.3 e 2.4.

Os compostos identificados tiveram uma ampla diferença de concentração entre o extrato e as frações. Por vezes, um composto se apresentava como majoritário em uma fração e apresentava níveis muito baixos ou não eram detectados em outra fração. Apesar da variação dos principais constituintes, três amostras apresentaram como composto majoritário o ácido cafeico, são elas o extrato etanólico, as frações acetato de etila e clorofórmica com 12,65; 45,26 e 12,95 mg/g, respectivamente. E as frações metanólica e aquosa mostraram uma maior concentração de ácido elágico com 14,82 e 16,82 mg/g, respectivamente (Tabela 2.3). A

quantificação por CLAE também confirmou que a fração de acetato de etila concentrou uma quantidade maior de compostos fenólicos, seguido pela fração aquosa, fração metanólica, extrato etanólico e fração de clorofórmio em ordem decrescente.

O processo de fracionamento não conseguiu obter frações com composições distintas, com exceção da fração clorofórmica que apresentou somente 6 dos 12 compostos padrões utilizados na identificação. Isso pode ser o porquê de em alguns experimentos posteriores, o extrato e as frações apresentarem resultados semelhantes. Novas etapas cromatográficas são necessárias para refinar a separação desses compostos caso haja o intuito de isolá-las.

Figura 2.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência: EETg (a), FMTg (b), FAcTg (c), FCTg (d) FAqTg (e). ac. gálico (pico 1), catequina (pico 2), ac. clorogênico (pico 3), ac. cafeico (pico 4), epicatequina (pico 5), ac. elágico (pico 6), rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), isoquercitrina (pico 9), quercetina (pico 10), canferol (pico 11) e glicosídeo de canferol (pico 12).

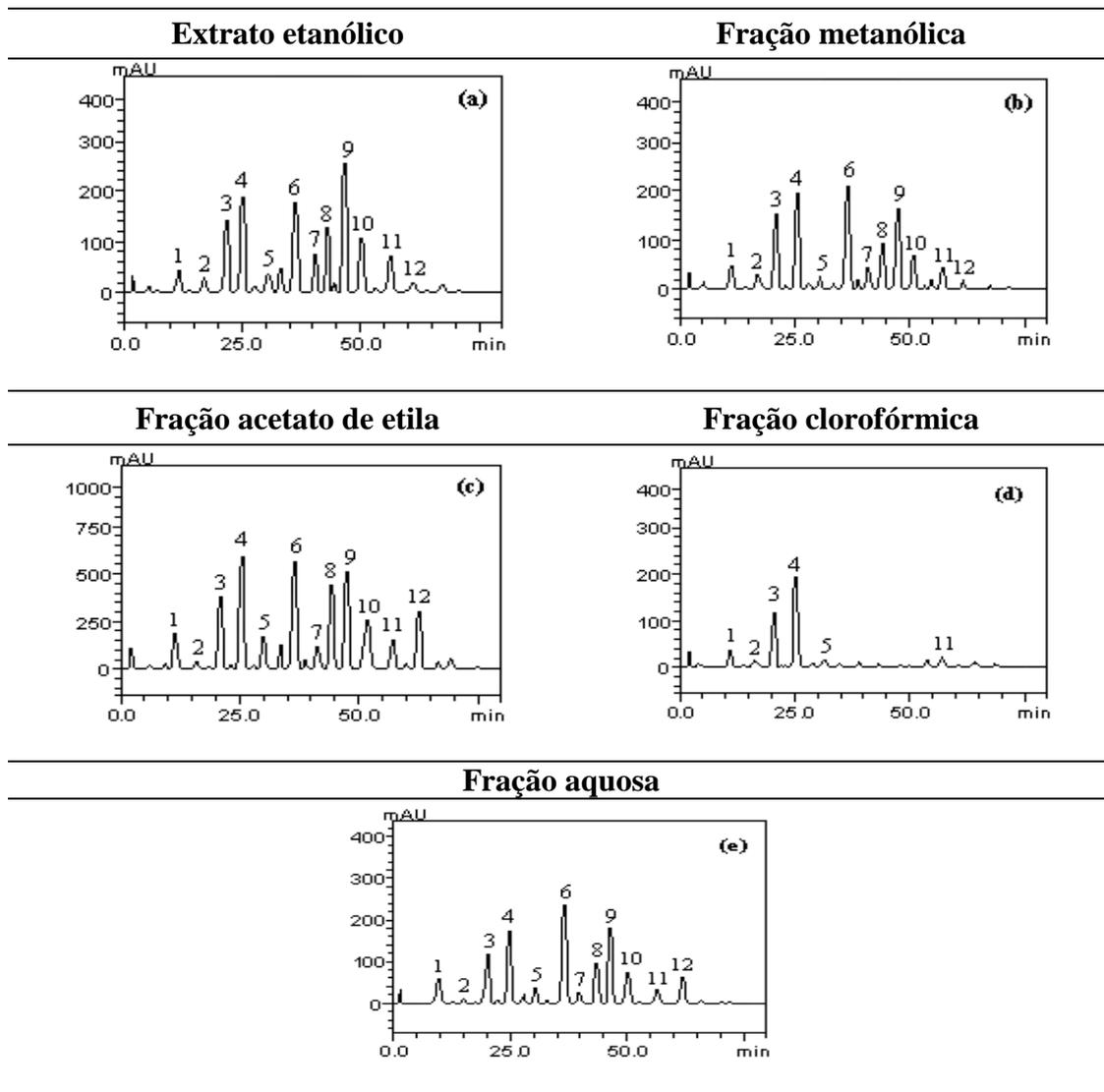
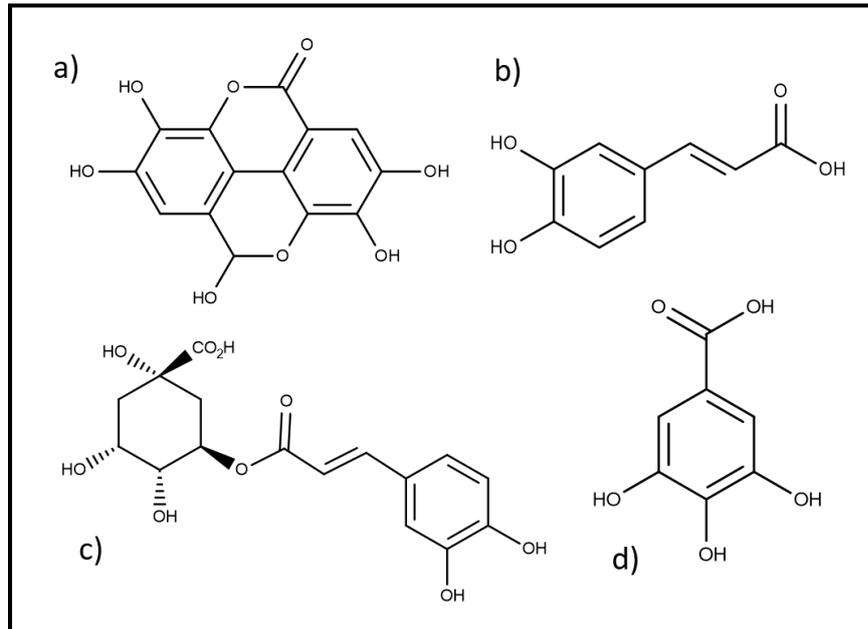
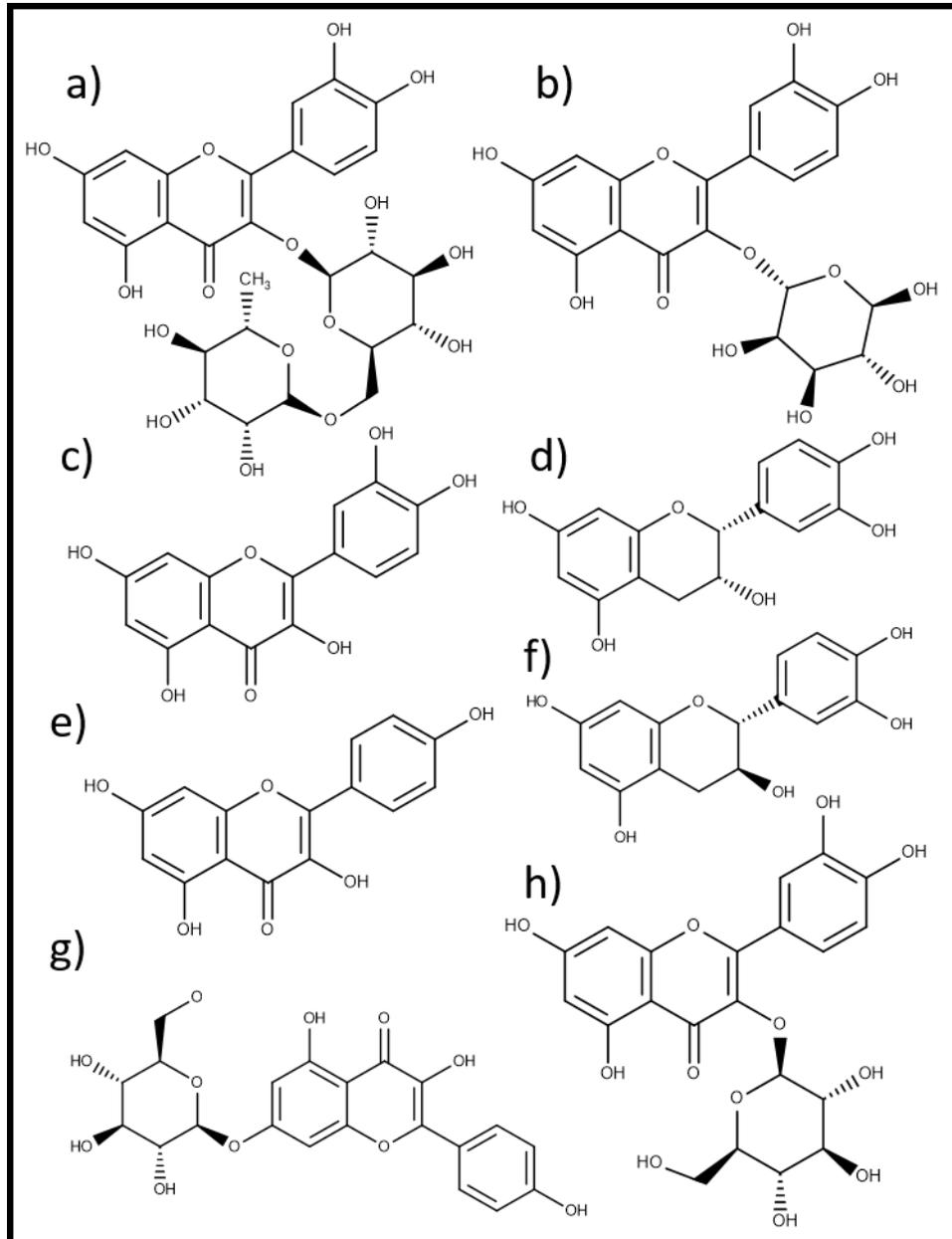


Figura 2.3: Sugestão de estrutura dos ácidos fenólicos identificados em sementes de *Triplaris gardneriana*; a) ácido elágico; b) ácido caféico; c) ácido clorogênico; d) ácido gálico



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 2.4: Sugestão de estrutura dos flavonoides identificados nas sementes de *Triplaris gardnerianda*; a) rutina; b) quercetrina; c) quercetina; d) epicatequina; e) canferol f) catequina; g) glicosídeo de canferol; h) isoquercetrina



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2.3 – Composição de fenóis e flavonoides de *Triplaris gardineriana*. Wedd. identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

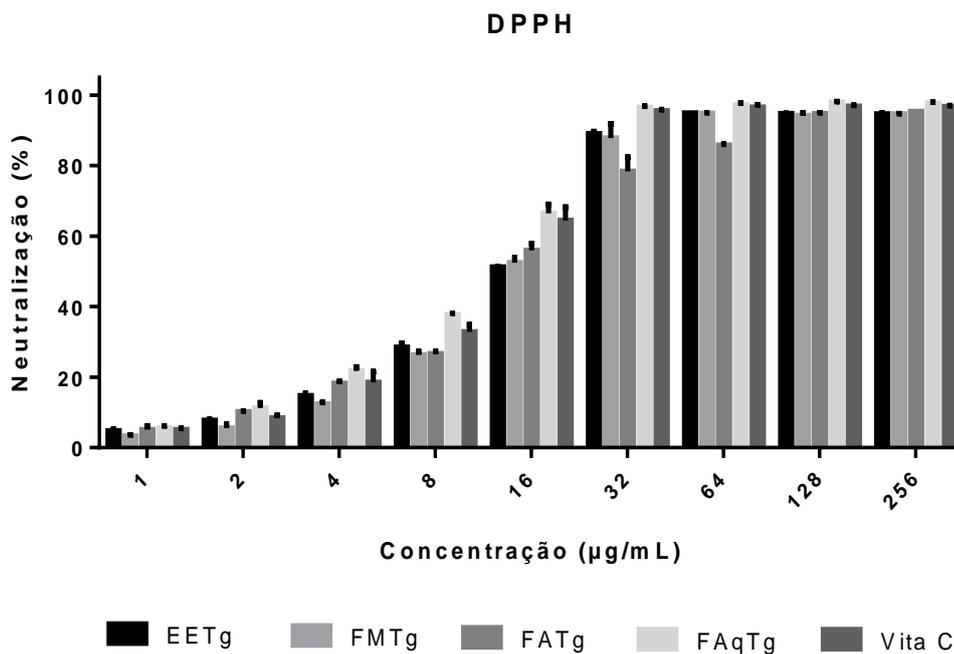
Compostos	Extrato etanólico		Fração metanólica		Fração acetato de etila		Fração clorofórmio		Fração aquosa		LOD	LOQ
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	µg/µL	µg/µL
Ácido gálico	2,59 ± 0,01a	0,25	3,08 ± 0,02a	0,30	14,95 ± 0,01a	1,49	2,21 ± 0,01a	0,22	4,32 ± 0,03a	0,43	0,018	0,059
Catequina	2,16 ± 0,01a	0,21	2,31 ± 0,01b	0,23	2,67 ± 0,03b	0,26	1,35 ± 0,03b	0,13	0,97 ± 0,01b	0,09	0,023	0,075
Ácido clorogênico	8,37 ± 0,03b	0,83	9,15 ± 0,02c	0,91	29,81 ± 0,03c	2,98	7,56 ± 0,01c	0,75	7,69 ± 0,01c	0,76	0,007	0,023
Ácido cafeico	12,65 ± 0,01c	1,26	13,49 ± 0,03d	1,34	45,26 ± 0,03d	4,52	12,95 ± 0,01d	1,29	12,30 ± 0,02d	1,23	0,034	0,112
Epicatequina	2,70 ± 0,02a	0,27	1,50 ± 0,01e	0,15	14,50 ± 0,01a	1,45	1,41 ± 0,01b	0,14	3,19 ± 0,03e	0,31	0,015	0,049
Ácido elágico	12,59 ± 0,01c	1,25	14,82 ± 0,01d	1,48	43,97 ± 0,01d	4,39	-	-	16,82 ± 0,01f	1,68	0,036	0,018
Rutina	4,81 ± 0,03d	0,48	2,96 ± 0,02e	0,29	13,78 ± 0,01a	1,37	-	-	2,45 ± 0,01e	0,24	0,029	0,095
Quercitrina	7,96 ± 0,03b	0,79	5,41 ± 0,01f	0,54	31,12 ± 0,02c	3,11	-	-	7,18 ± 0,02c	0,71	0,042	0,138
Isoquercitrina	6,14 ± 0,01e	1,61	9,05 ± 0,02c	0,90	38,41 ± 0,01e	3,84	-	-	12,59 ± 0,01d	1,25	0,031	0,102
Quercetina	7,35 ± 0,02b	0,73	4,78 ± 0,03f	0,47	19,35 ± 0,02f	1,93	-	-	6,90 ± 0,02c	0,69	0,008	0,029
Canferol	4,52 ± 0,01d	0,45	3,16 ± 0,02a	0,31	14,64 ± 0,01a	1,46	1,57 ± 0,01b	0,15	3,42 ± 0,01e	0,34	0,021	0,069
Glicosídeo de canferol	1,93 ± 0,01a	0,19	1,17 ± 0,01e	0,11	20,79 ± 0,01f	2,07	-	-	4,57 ± 0,03a	0,45	-	-

Os resultados são expressos como média ± D.P. de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

2.5. 3 Capacidade Antioxidante

O ensaio para a atividade antioxidante pelo processo de neutralização do radical livre (DPPH livre) revelou um comportamento semelhante, com respostas dose-dependentes em todas as amostras testadas (Gráfico 2.1), com uma variação de cerca de 2 $\mu\text{g/mL}$ entre a maior e a menor CI_{50} . O melhor resultado foi apresentado pela fração metanólica com CN_{50} de 11.45 $\mu\text{g/mL}$, relativamente muito próximo ao valor do controle positivo que apresentou CN_{50} de 8,87 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2.4).

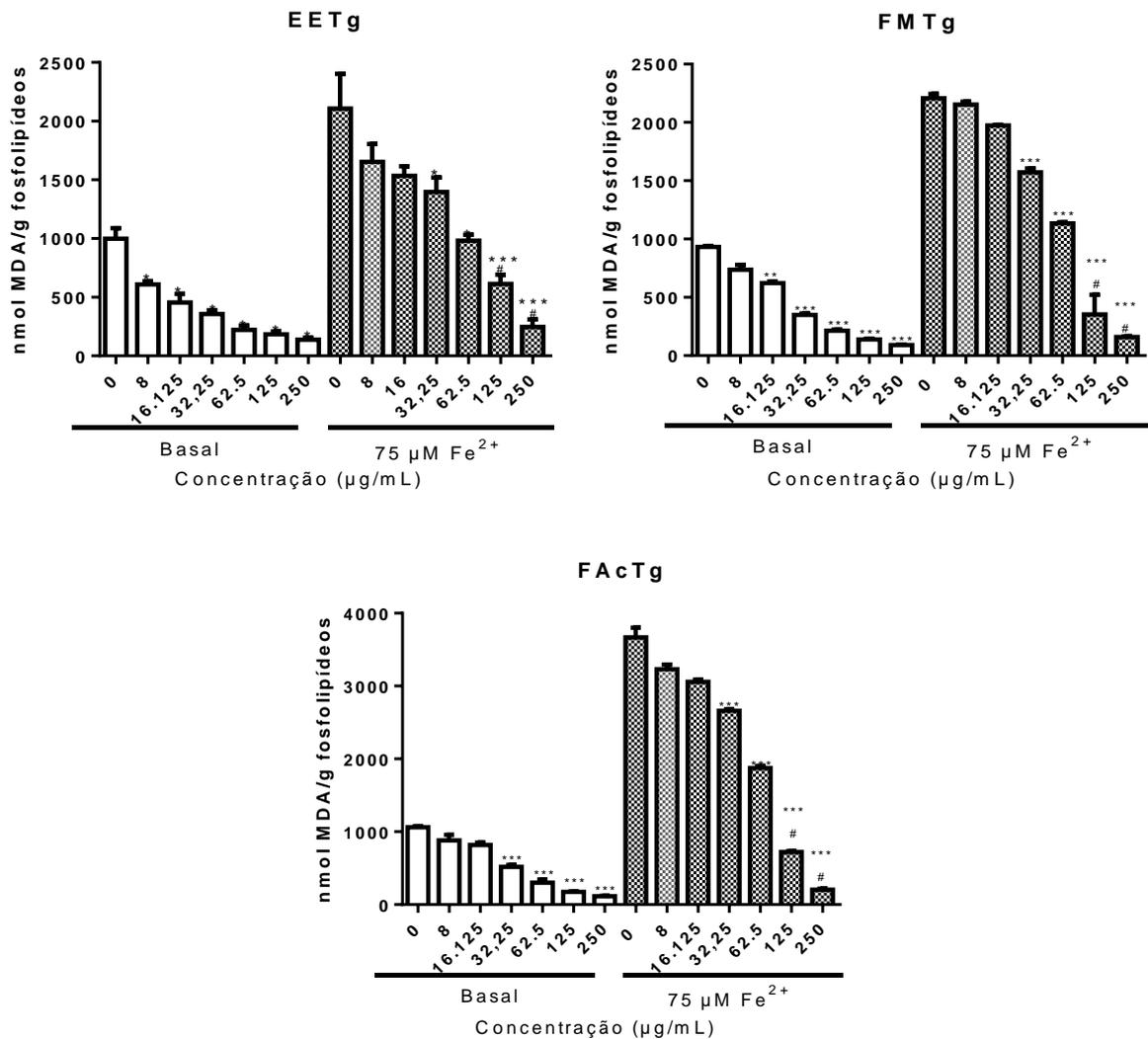
Gráfico 2.1: Perfil de capacidade de neutralização do radical livre DPPH pelas amostras; EETg - Extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; FATg – Fração acetato de etila de *T. gardneriana*; FAqTg – Fração aquosa de *T. gardneriana*; Vita C – Vitamina C.



Para a avaliação da peroxidação lipídica (método TBARS), todas as amostras também demonstraram um efeito dependente da dose, assim como apresentado para o ensaio de neutralização de radicais livres, não só em condições basais, mas também quando a peroxidação lipídica foi estimulada com ferro como agente indutor de stress (Gráfico 2.2).

O extrato etanólico apresentou redução significativa da peroxidação lipídica basal já na concentração mais baixa de 8 $\mu\text{g/mL}$, quando para a fração metanólica e para a fração acetato de etila essa redução só foi significativa a partir das concentrações de 16,125 e 32,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em relação à peroxidação lipídica induzida por ferro, todas as amostras conseguiram reduzir, significativamente, a partir da concentração de 32,25 $\mu\text{g/mL}$. E nas concentrações mais altas, de 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$, houve uma redução da peroxidação lipídica induzida por ferro a níveis significativamente inferiores ao nível basal de peroxidação lipídica (Gráfico 2.2)

Gráfico 2.2: Ensaio de inibição da peroxidação lipídica; EETg – Extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; FAcTg – Fração acetato de etila de *T. gardneriana*. ***= $P < 0,001$ em relação à concentração “0” de cada grupo; # = $p < 0,01$ em relação à concentração “0” do grupo basal



Quando calculados os valores da capacidade de inibir 50% da peroxidação lipídica - CN_{50} , o melhor resultado na ausência de ferro foi apresentado pela fração de acetato de etila (CN_{50} 6,14 $\mu\text{g/mL}$) e na presença de ferro foi obtida pelo extrato etanólico (CN_{50} 26,75 $\mu\text{g/mL}$). Como pode ser visto na Tabela 2.4, o valor mais elevado não difere muito do menor conseguido pela fração metanólica, com 28,08 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2.4).

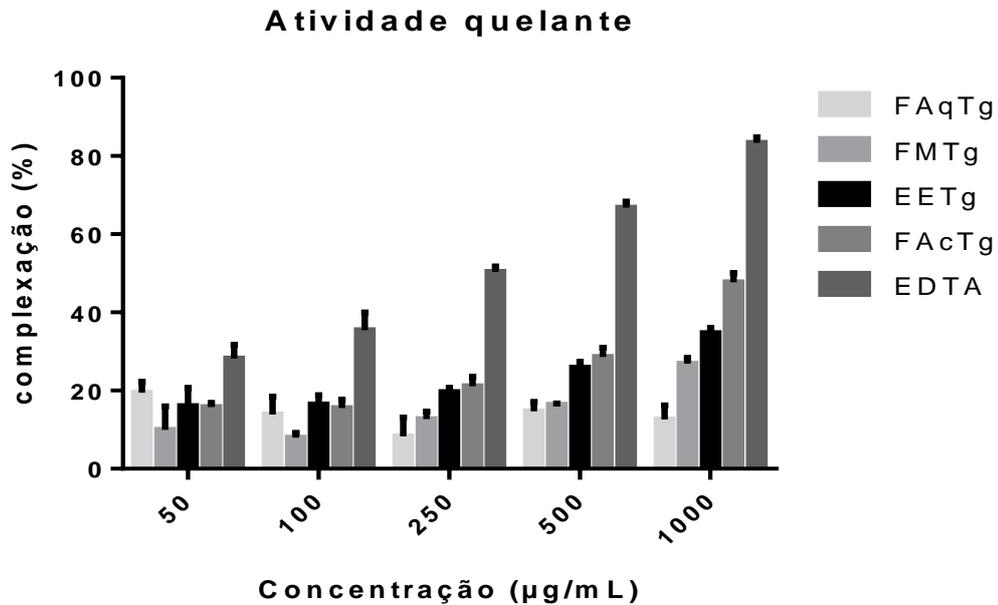
Tabela 2.4 – Atividade antioxidante do extrato e frações de sementes de *Triplaris gardneriana*. A capacidade de neutralizar 50% de radicais livres DPPH - CN_{50} e a capacidade de inibir 50% da peroxidação lipídica CI_{50} , na presença e ausência de ferro.

Amostra	DPPH - CN_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TBARS - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		Basal	Com ferro
Extrato etanólico	13,05 \pm 0,02	9,36 \pm 0,07	26,75 \pm 0,08
Fração metanólica	11,45 \pm 0,02	11,53 \pm 0,02	28,08 \pm 0,03
Fração acetate de etila	13,57 \pm 0,02	6,14 \pm 0,03	27,02 \pm 0,04
Fração aquosa	12,50 \pm 0,02	ND	ND
Controle positivo Vitamina C	8,87 \pm 0,03	-	-

ND, não determinado. Os valores são médias \pm DP de três medições.

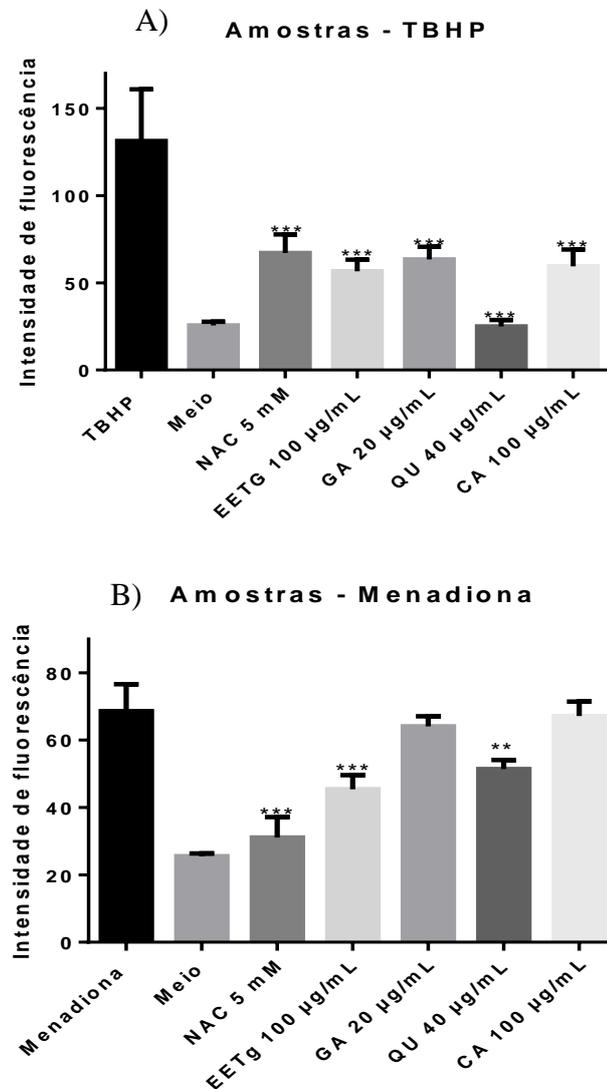
Em relação à atividade quelante, a fração de acetato de etila mostrou ter a melhor capacidade de complexação, com 48% na maior concentração testada (1,000 $\mu\text{g/mL}$), seguida do extrato etanólico com quase 40% na mesma concentração. As outras amostras apresentaram uma capacidade quelante irrelevante, com pouca variação após acréscimos de concentrações (Gráfico 2.3). Devido aos baixos valores que, por vezes, mostravam pouca ou nenhuma diferença de complexação entre concentrações distantes, não foi possível fazer o cálculo da capacidade de complexar 50% do sulfato ferroso.

Gráfico 2.3: Capacidade, em porcentagem, das amostras formarem complexos com o sulfato ferroso. FAqTg – Fração aquosa de *Triplaris gardneriana*; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; FAcTg – Fração acetato de etila de *T. gardneriana*; EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético.



Os resultados da medição de espécies reativas de oxigênio intracelular mostraram que todas as amostras são hábeis em prevenir o estresse oxidativo induzido pelo TBHP ($p < 0,001$; Gráfico 2.4). Neste caso, a quercetina apresentou o melhor resultado, reduzindo o nível de radicais livres às condições basais. Em relação à menadiona, os compostos fenólicos padrão testados apresentaram capacidade mais baixa de prevenir o estresse, quando comparado ao TBHP, nesse caso apenas a quercetina apresentou redução significativa em relação ao controle. Já o extrato etanólico e NAC conseguiram reduções significativas em ambos os tipos de indução.

Gráfico 2.4: Intensidade de fluorescência do ensaio para avaliar a habilidade das amostras em prevenir a formação de estresse oxidativo, utilizando células MCF 7, por TBHP (A) e Menadiona (B); EETg Extrato etanólico de; NAC – N-acetil-cisteína; GA – ácido gálico; QU – quercetina; CA – ácido cafeico; ** - $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.



Todas as amostras testadas também puderam ajudar às células a restaurar a homeostase oxidativa a níveis próximos ou inferiores ao basal depois de sofrerem um aumento do nível radical livre induzida por TBHP e por menadiona (Gráfico 2.5). Os resultados para esse experimento e para o experimento anteriores podem ser observados visivelmente nas micrografias das células dos ensaios, onde a cor vermelha indica a presença de radicais livres (Tabelas 2.5 e 2.6)

Gráfico 2.5: Intensidade de fluorescência do ensaio em células MCF 7 para avaliar a habilidade das amostras em restaurar o balanço oxidativo induzido por TBHP (A) e Menadiona (B); EETg Extrato etanólico de; NAC – N-acetil-cisteína; GA – ácido gálico; QU – quercetina; CA – ácido cafeico; ** - $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

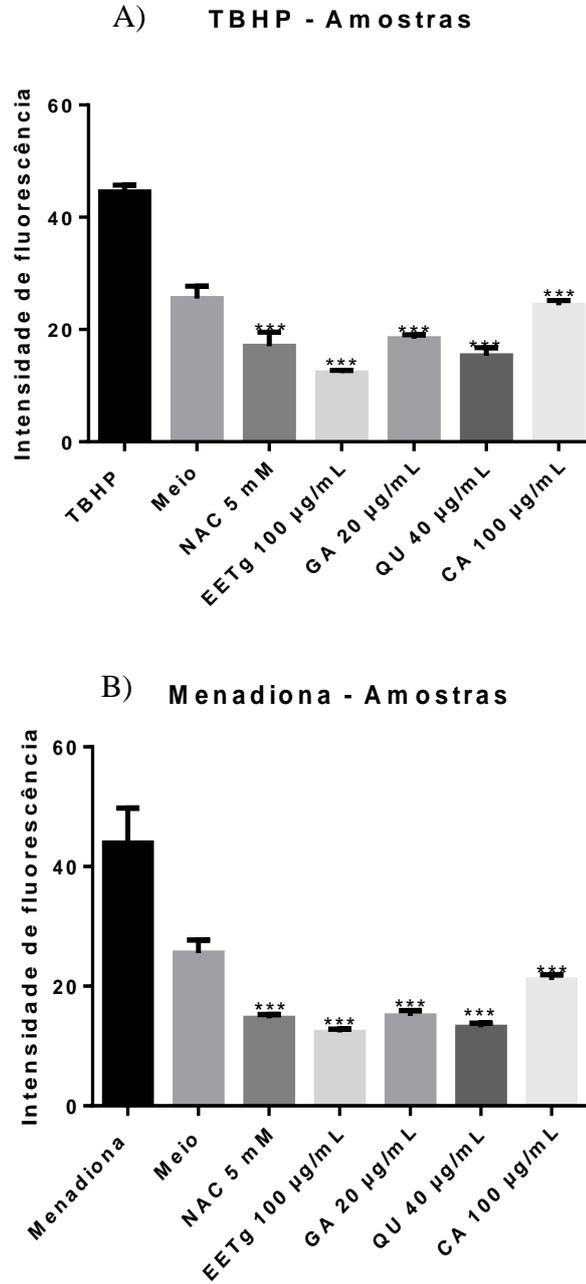
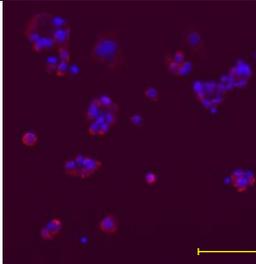
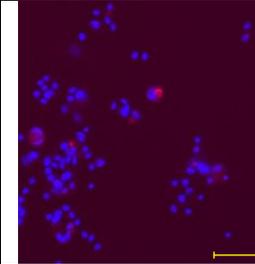
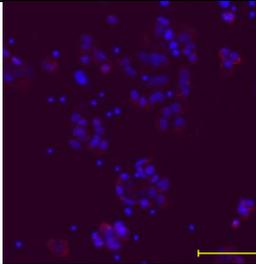
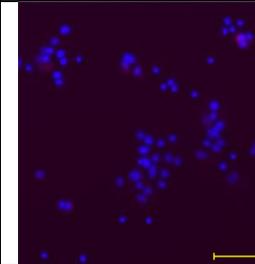
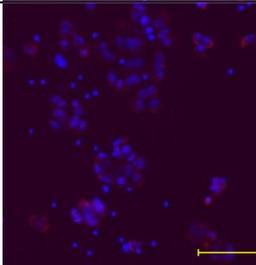
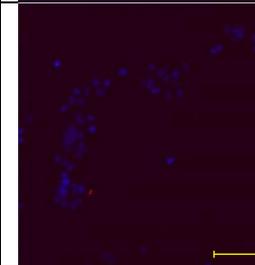
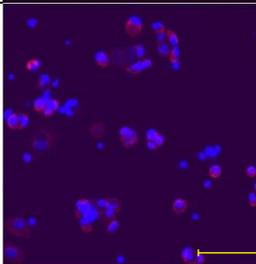
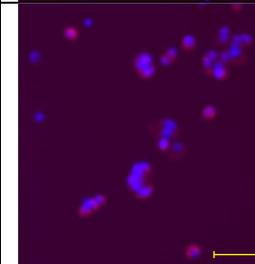
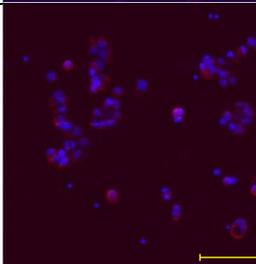
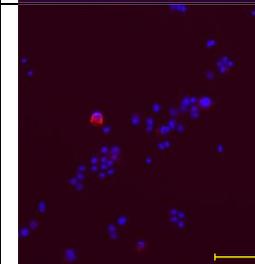
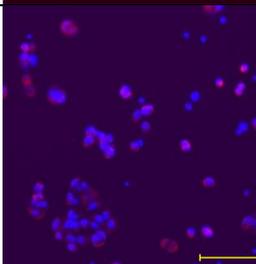
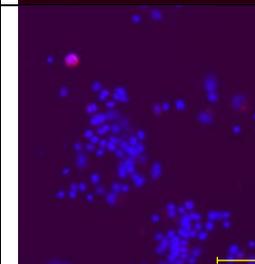


Tabela 2.5: Microfotografia de células MCF 7 tratadas com antioxidantes antes de ser induzido estresse oxidativo por TBHP e menadiona EETg- Extrato Etanólico de *T. gardneriana*; NAC – N-acetil-cisteína; GA – ac. gálico; QU – quercetina; CA – ac. cafeico; escala 90-100 μm .

Amostras	Amostras seguidas de TBHP	Amostras seguidas de menadiona
Controle (somente meio de cultura)		
NAC 5 mM		
EETg 100 $\mu\text{g/mL}$		
QU 40 $\mu\text{g/mL}$		
GA 20 $\mu\text{g/mL}$		
CA 100 $\mu\text{g/mL}$		

Tabela 2.6: Microfotografia de células MCF 7 tratadas com antioxidantes depois de ser induzido estresse oxidativo com TBHP e Menadiona EETg- Extrato Etanólico de *T. gardneriana*; NAC – N-acetil-cisteína; GA – ac. gálico; QU – quercetina; CA – ac cafeico; escala 90-100 μm .

Amostras	TBHP seguido das amostras	Menadiona seguida das amostras
Controle (somente meio de cultura)		
NAC 5 mM		
EETg 100 $\mu\text{g/mL}$		
QU 40 $\mu\text{g/mL}$		
GA 20 $\mu\text{g/mL}$		
CA 100 $\mu\text{g/mL}$		

Discussão

De todos os compostos identificados neste trabalho, apenas a quercetina tinha sido anteriormente identificada nas folhas desta planta (SANDRA *et al.*, 2015). As identificações dos outros 11 compostos não têm precedentes para esta espécie e muitos são próximos estruturalmente, e por vezes, estão a poucos passos uma das outras em suas rotas biossintéticas (Figuras 2.5, 2.6 e 2.7).

Outros autores já identificaram compostos fenólicos, semelhantes aos encontrados nesse trabalho, em plantas do gênero *Triplaris*. Hussein *et al.* (2005) identificaram nos extratos de folhas de *T. cumingiana* a presença de quercetina glicosilada e Oliveira *et al.*, (2008) também encontraram quercetina nas folhas de *T. Americana*, além de canferol, ácido gálico, dois triterpenos (friedelina e friedelinol) e um glicosídeo fenilpropanoide (vanicoside D). Sandra *et al.*, (2015) identificaram dois tipos de flavonoides (quercetina e miricetina) e suas formas glicosiladas (quercetina-hexosídeo; quercetina-pentosídeo; quercetina ramnobilosídeo e miricetina-hexosídeo) no extrato etanólico e frações de folhas *T. gardneriana*.

Alguns estudos apontam para o efeito sinérgico desses compostos naturais, principalmente porque apresentam estrita relação metabólica, e por poderem formar grandes complexos quando unidas em conjunto, como é o caso de taninos (RAHMAN, 2007). O potencial antioxidante de *T. gardneriana* Wedd é, provavelmente, um dos grandes responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios e anti-hemorroidas atribuídos pela população, e até mesmo pela ação sobre algumas infecções sexualmente transmissíveis, uma vez que, essas moléculas também são descritas na literatura como sendo capazes de combater bactérias e fungos (MATIAS *et al.* 2012).

Figura 2.5: Uma das possíveis vias de biossíntese de ácidos fenólicos; essa via apresenta como ponto de partida o ácido chiquímico, seguindo esses passos propostos o ácido gálico é precursor do ácido elágico, assim como o ácido cafeico é, juntamente ao ácido quínico, precursor do ácido clorogênico. Esta rota tem como composto comum à rota dos flavonoides a fenilalanina, mas neste caso seu destino metabólico é distinto. Fonte: adaptado de DEWICK e Haslam, 1969; LEAL, 2006; SUN, HEILMANN e KONIG, 2015.

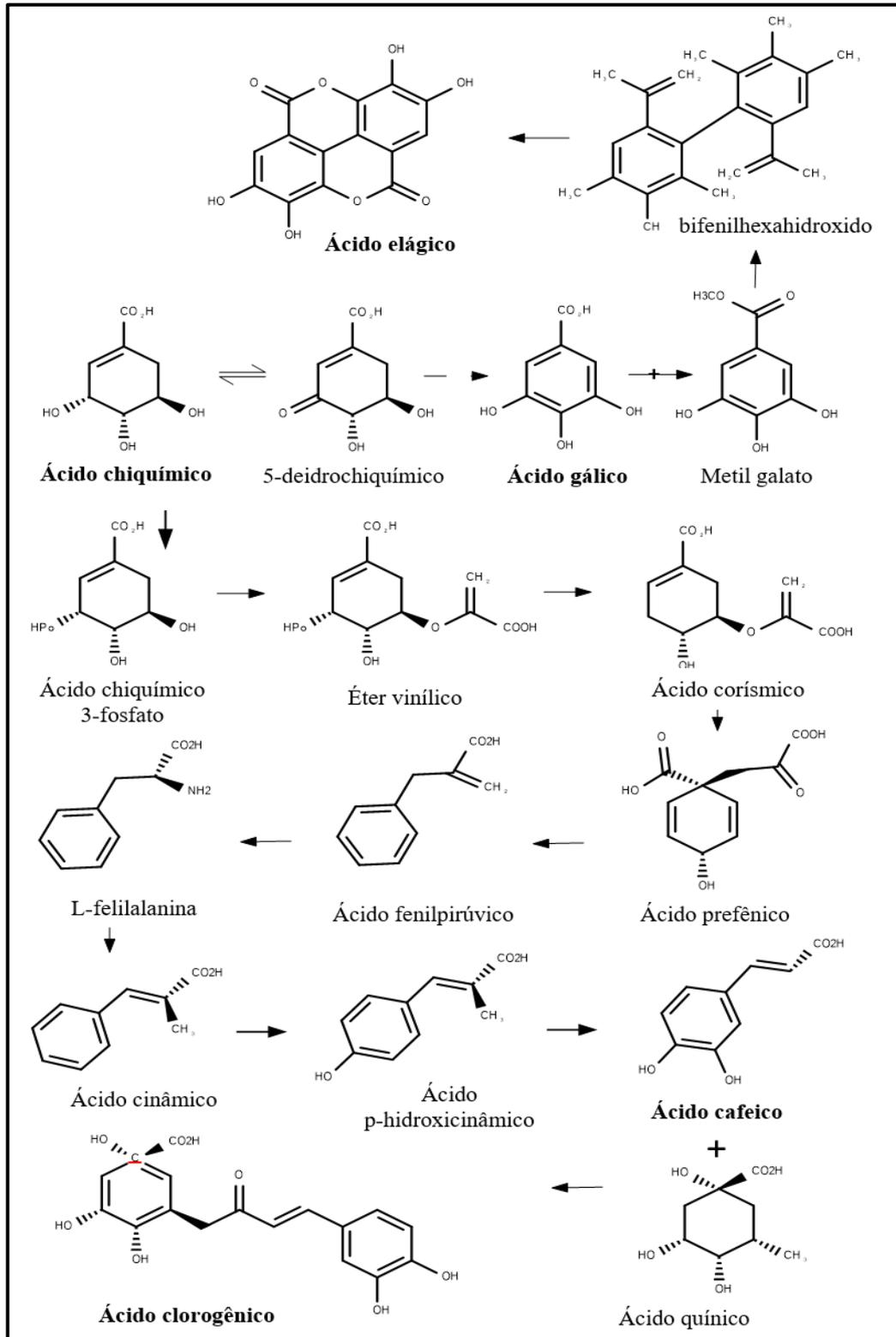


Figura 2.6: Via de biossíntese de catequinas a partir dos carboidratos. Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009; DÔRES, 2007; MAUGÉ, et al 2010; WINKEL-SHIRLEY, 2001.

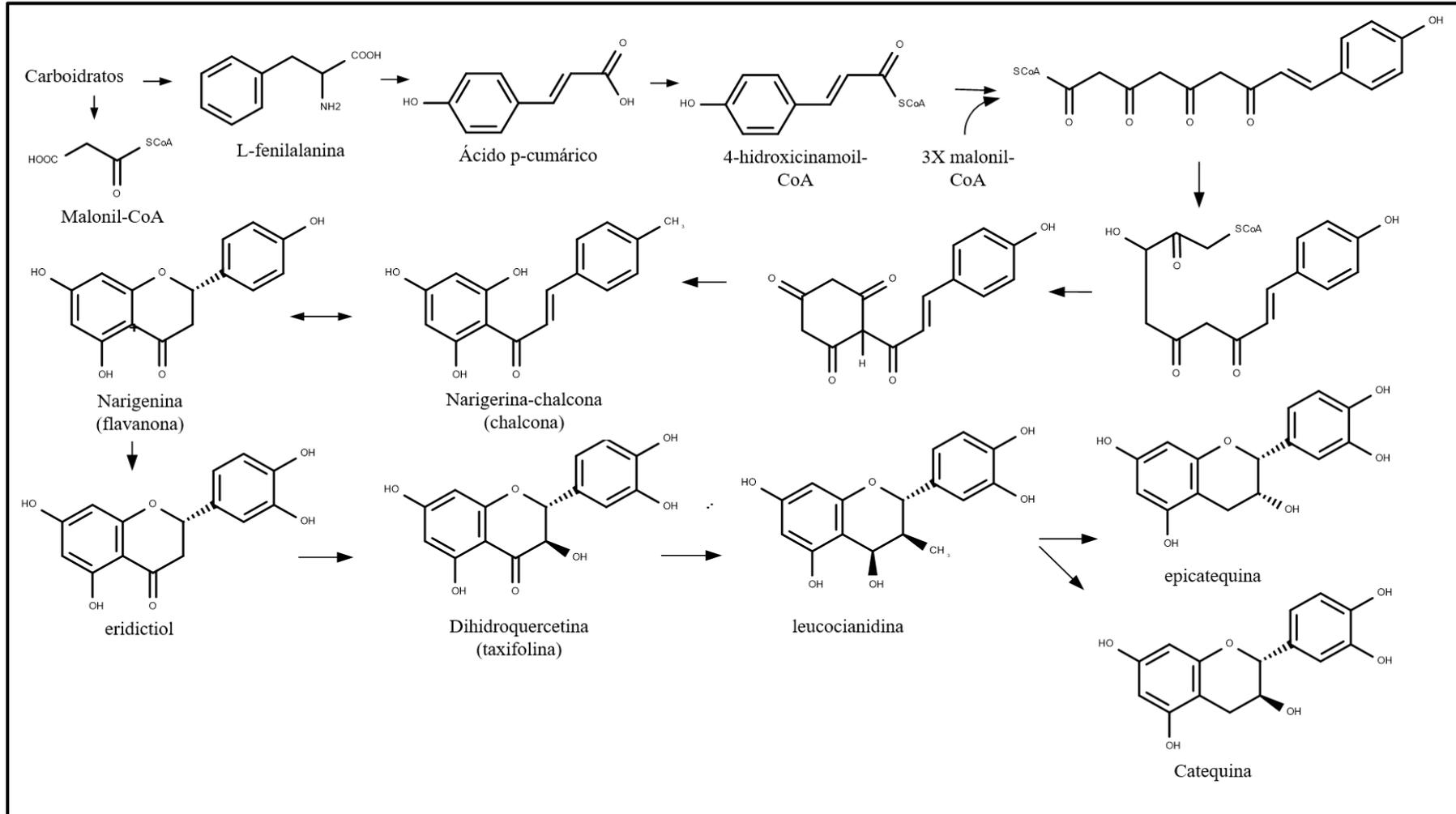
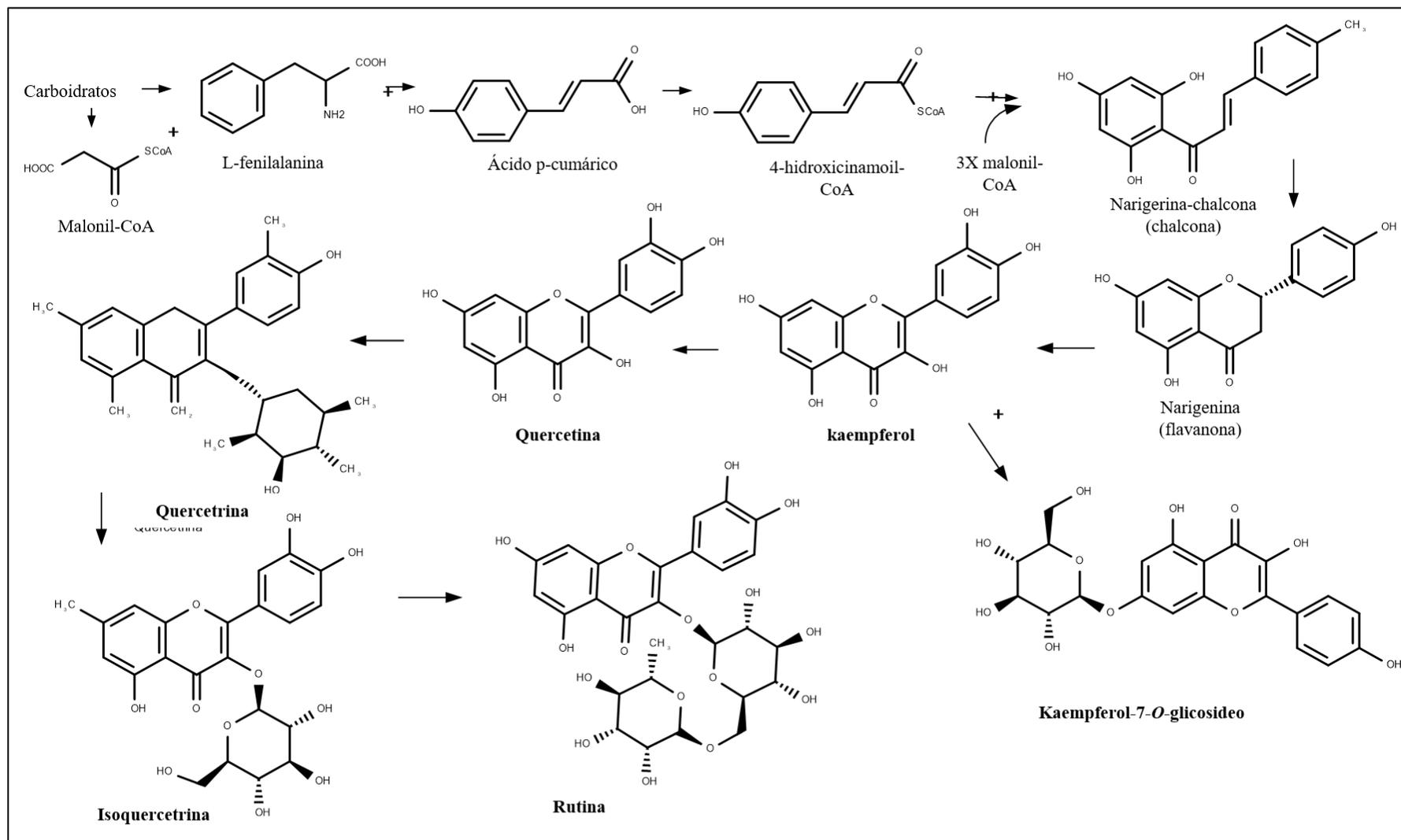


Figura 2.7: Via de biosíntese de alguns flavonoides. Seguindo essa seqüência o canferol é precursor de cinco outros compostos identificados por CLAE. DEWICK, 2009; DÔRES, 2007; MAUGÉ, et al 2010; WINKEL-SHIRLEY, 2001.



As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são baseadas, primordialmente, por três mecanismos de ação. O primeiro mecanismo envolve uma reação direta, ($\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArOH}^+ + \text{R}^-$), quando o antioxidante (ArOH) transfere um elétron para o radical livre (R^\bullet), nesse caso o anion R^- é uma espécie energeticamente estável, com um número par de elétrons, enquanto o cátion ArOH^+ ainda é menos reativo que o radical livre.

No segundo mecanismo ($\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{RH}$), ocorre uma transferência do átomo de hidrogênio, através de uma ruptura homolítica da ligação O-H. O produto desta reação são espécies RH inofensivas e radicais oxidados ArO^\bullet . Apesar de gerar outro radical, este é menos reativo com respeito a R^\bullet . O último mecanismo surge da possibilidade dos polifenóis capturarem íons metálicos de transição, produzindo compostos complexos estáveis. No primeiro mecanismo, o potencial de ionização (IP) é o parâmetro mais importante na análise da atividade antioxidante; quanto menor o valor de IP, mais fácil é a subtração do elétron com a consequente reação com o radical. No mecanismo seguinte, a entalpia de dissociação de ligação (BDE) dos grupos O-H é o parâmetro indicativo principal de atividade scavenger; quanto menor o valor de BDE, mais fácil será a dissociação do grupo OH e a reação com o radical livre (LEOPOLDINI, *et al.*, 2004; 2011)

Todos estes mecanismos dependem da estrutura e meios onde os compostos estão imersos. Considerando-se o meio aquoso, os estudos mostram que o ácido elágico seguido da epicatequina (Tabela 2.7), possuem uma elevada capacidade de agir tanto doando elétrons quanto compartilhando seus hidrogênios (MAZZONE, *et al.*, 2013).

Levando em consideração o ensaio de DPPH, pode-se inferir que o extrato e frações das sementes de *T. Gardneriana* detêm a capacidade de doar elétrons, uma vez que essa habilidade é necessária para neutralizar esses tipos de radicais livres. A capacidade de quelar metais de transição não parece ser o mecanismo de ação preponderante das amostras, haja vista que no ensaio da atividade quelante não foi possível demonstrar essa capacidade, exceto nas concentrações mais elevadas.

O ensaio TBARS revelou que as amostras possuem a capacidade de proteger a membrana de lípídeos contra a peroxidação. A atividade quelante, embora modesta, pode ter influenciado positivamente esse resultado, uma vez que a proteção foi muito evidente nas maiores concentrações. No entanto, o mais plausível é que os compostos atuem diretamente sobre os radicais livres formados ou que interajam, de um modo protetor, com a membrana lipídica. Camones *et al.* (2010) identificaram para o extrato

hidroalcoólico das folhas de *T. americana* uma NC_{50} do material frente ao DPPH de 9,54 $\mu\text{g/mL}$, valores comparáveis com os resultados do nosso trabalho (11,45-13,57 $\mu\text{g/mL}$ Tabela 3).

Tabela 2.7: Valores de ΔBDE e de ΔIP (em kcal/mol).

Composto	ΔBDE				ΔIP			
	Gás	Água	Benzeno	Metanol	Gás	Água	Benzeno	Metanol
Fenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido elágico	-	77,30	-	77,30	-	141,30	-	142,00
Ácido gálico	-10,64	-14,84	-11,51	-	-2,96	-6,45	-2,59	-
Quercetina	-10,64	-	-	-	-26,00	-	-	-
Ácido cafeico	-9,28	-11,10	-9,64	-	-10,90	-8,38	-8,24	-
Epicatequina	-9,17	-19,43	-10,36	-	-21,20	-15,86	-15,31	-
Catequina	-8,74	-	-	-	-22,40	-	-	-
Kaempferol	-1,95	-10,11	-3,24	-	-24,06	-13,23	-18,27	-

ΔBDE : variação na entalpia de dissociação de ligação; ΔIP : variação no potencial de ionização; Fonte: Leopoldini, *et al.*, (2004).

O extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* mostrou uma capacidade antioxidante superior quando comparado a outras espécies vegetais provenientes do mesmo bioma. Um trabalho anterior desenvolvido pelo nosso grupo (FARIAS *et al.*, 2013), utilizando uma técnica semelhante de neutralização do DPPH, mostrou que o extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* apresentou o melhor potencial antioxidante entre 21 extratos etanólicos de sementes de plantas do bioma Caatinga, com uma NC_{50} de 69,73 $\mu\text{g/mL}$, muitas vezes superior aos segundo e terceiros colocados na lista, que foram *Licania tomentosa* com 216 $\mu\text{g/mL}$ e *Licania rigida* com 487,51 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Sandra *et al.*, (2015) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *T. gardneriana* também apresentam forte potencial antioxidante com uma CN_{50} para o DPPH de 2,27 $\mu\text{g/mL}$, que foi bem próximo ao controle com vitamina C, de 3,21 $\mu\text{g/mL}$. Fazendo uma comparação, seus resultados foram semelhantes aos nossos resultados encontrados para o extrato etanólico das sementes que apresentou NC_{50} de 13,05 $\mu\text{g/mL}$ e a vitamina C, nas mesmas condições, apresentou NC_{50} de 8,87 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo estudo demonstrou que o extrato das folhas é capaz de prevenir a oxidação do β -caroteno, e identificou-se também uma elevada capacidade de fotoproteção contra radiação do tipo

UVA, UVB e UVC, os autores associaram essa atividade com a composição química rica em flavonoides.

Uma das substâncias utilizadas para a indução de estresse oxidativo nos sistemas biológicos é o hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) (KUMAR 2007, KUČERA, ENDLICHER *et al.*, 2014), que é um hidroperóxido orgânico. TBHP é envolvido em duas vias metabólicas principais, e ambas desencadeiam o estresse oxidativo. Uma é a reação com o citocromo P450, conduzindo a produção de radicais peroxila e alcoxila, que são capazes de aumentar a lipoperoxidação de fosfolípidos da membrana. A outra forma é a oxidação de GSH diminuindo seus valores séricos causando um desbalanço oxidativo (CRANE; HAUSSINGER *et al.*, 1983, DAVIES 1989).

Os experimentos mostraram que o TBHP foi ligeiramente superior a menadiona em capacidade de induzir o stress oxidativo, principalmente, no ensaio que avalia a capacidade de as amostras para proteger as células antes da ocorrência de danos (Gráfico 2). As alterações feitas no protocolo original de fluorescência sugerido pela Life Technologies mostraram-se eficazes em demonstrar a capacidade de proteger e restaurar as células das amostras. As imagens resultantes eram claras e com uma boa definição, resultando em resultados reproduzíveis (Tabela 2.5 e 2.6).

Provavelmente, uma forma utilizada pelas amostras para prevenir o estresse e recuperar o balanço oxidativo, após estresse induzido por TBHP, é a ação direta sobre os radicais livres produzidos por este, uma vez que o tempo de incubação é demasiado curto para a ativação de respostas genéticas, por exemplo, e durante o ensaio de DPPH foi demonstrada a capacidade de neutralização de radicais livres por EETG. O TBHP também é capaz de induzir a peroxidação lipídica das membranas celulares e EETG mostrou, para o teste de TBARS, a capacidade de reduzir os níveis de MDA de forma muito eficaz, indicando que pode ter sido um dos mecanismos de ação utilizados.

Menadiona é conhecida por induzir efeitos citotóxicos (LAUX; NEL, 2001). Os mecanismos de iniciação desse efeito residem na indução de estresse oxidativo e alterações na homeostase do Ca^{2+} celular (CHANDRA, SAMALI; ORRENIUS, 2000). O metabolismo da menadiona gera espécies reativas de oxigênio e provoca a oxidação de GSH (DI MONTE, *et al.* 1984, SATA, *et al.*, 1997).

Além do NAC e EETg a única amostra que apresentou capacidade de reduzir, significativamente, a indução de estresse oxidativo por menadiona foi a quercetina e, em

contrapartida, os dois ácidos fenólicos testados, ácidos gálico e cafeico, praticamente não tiveram nenhum efeito. Analisando os resultados é possível supor que talvez os ácidos fenólicos não sejam eficientes como os flavonoides, em bloquear o caminho usado pela menadiona para induzir estresse oxidativo. É plausível inferir que a habilidade do EETg neste caso talvez esteja correlacionada com a quantidade e variedade de flavonoides presentes em sua constituição.

Apesar de não conseguir impedir a indução de estresse por menadiona, os ácidos fenólicos foram plenamente capazes, assim como o EETg, NAC e quercetina, de restaurar os níveis de radicais livres quando utilizados após o estresse oxidativo, não só para menadiona, mas também para o TBHP, o que reforça a hipótese de que uma das principais vias utilizadas por esses compostos seja a neutralização direta de radicais livres.

Outra consideração possível é que o metabolismo dessas amostras pode resultar em moléculas que também são capazes de interagir com radicais livres, por exemplo, o NAC, um precursor metabólico para a enzima antioxidante natural GSH que tem a função específica de neutralizar o peróxido de hidrogênio (BRUCK, *et al.*, 1999; BAVARSAD SHAHRIPOUR; HARRIGAN; ALEXANDROV, 2014). Assim, espera-se que o aumento da concentração de um precursor facilite a formação do produto final. É importante lembrar, neste caso, que o mecanismo de indução de estresse oxidativo por TBHP e a menadiona envolve a oxidação da GSH e a depleção desse tipo de estresse pelo NAC reforça esta hipótese.

Taninos, flavonoides e outros compostos fenólicos foram e ainda são considerados por muitos autores substâncias antinutricionais, devido à sua capacidade para formar complexos com proteínas e metais, bloqueando a digestão e a absorção desses nutrientes. No entanto, nos últimos anos, as pesquisas realçam a capacidade antioxidante dessas moléculas, bem como de outras atividades biológicas. Esses recursos mudaram a perspectiva sobre os polifenóis e, hoje em dia, pensamos nos mesmos como importantes componentes eficazes de alimentos funcionais (LOURDES; GIADA, 2013). A maioria desses compostos estão presentes na dieta humana em concentrações diferentes, o que sugere que são, em sua maioria, seguros para consumo além de apresentar baixa toxicidade (PANDEY; KIZVI, 2009). A busca de fontes que apresentam altas concentrações de moléculas funcionais, como os encontrados neste trabalho é cada vez mais necessária para atender à demanda de produtos e alimentos que visam melhorar a saúde.

2.7 Conclusão

O extrato das sementes de *T. gardneriana* e suas frações, estudados neste trabalho, demonstraram um perfil fenólico promissor com excelente concentração de moléculas com atividade antioxidante, como flavonoides e ácidos fenólicos e que apresentam mecanismos de ação diferentes e complementares, provavelmente por se tratar de uma mistura complexa de substâncias. Muitos compostos foram identificados pela primeira vez para esta planta, e a relação destes com a capacidade de prevenir e restaurar o estresse oxidativo nas células vivas foi elucidada em parte. Outras abordagens podem ser utilizadas para melhor identificar os mecanismos de ação, e os compostos podem ser isolados e avaliados individualmente. No futuro, é possível que *T. Gardneriana* Wedd seja uma fonte de fitoquímicos bioativos que podem ser utilizados na indústria farmacológica e/ou na produção de alimentos nutracêuticos.

2.8 Referências

BAVARSAH SHAHRIPOUR, R.; HARRIGAN, M. R.; ALEXANDROV, A. V., N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain and behavior**, v. 4, n. 2, p. 108-122, 2014.

BOLIGON, A. A.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; FACCIM DE BRUM, T.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; SANTOS R. C. V.; ALVES, C. F. S.; ATHAYDE, M. L., Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2229–2239, 2013.

BONE, B.; SEREDICK, B.; OLSZOWY, M, Reactive oxygen probes-a broad range of colors with easier labeling and compatibility with fixation: novel CellROX® reagents from Molecular Probes®(P3295). **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1 Supplement, p. 211.5-211.5, 2013.

BURKE JR, J. F., J. D.; PIRSCH, E. L.; RAMOS, D. R.; SALOMON, D. M.; STABLEIN, D. H.; VAN BUREN, D. H.; WEST, J. C., "Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal-transplant recipients." **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 6, p. 358-363, 1994.

BRUCK, R.; AEED, H.; SHIRIN, H.; MATAS, Z.; ZAIDE, L.; AVNI, Y., HALPERN, Z., The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. **Journal of hepatology**, v. 31, n. 1, p. 27-38, 1999.

CAMONES, M. A. I.; RUITON, C. F.; TEIXEIRA, B. J.; TARRILLO, I. G. M.; ESPINOZA, E. R. T.; OSTOS FLOR, H.; Pharmacognostic study, antioxidant activity and toxicity to dose limit of *tripalis americana* l. (*tangarana colorada*). **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 76, n. 1, p. 34-42, 2010.

CAPASSO, R.; IZZO A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N.; Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58 – S65, 2000.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3, p. 323-333, 2000.

CRANE, D.; HÄUSSINGER, D.; GRAF, P.; SIES, H..Decreased flux through pyruvate dehydrogenase by thiol oxidation during t-butyl hydroperoxide metabolism in perfused rat liver. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 364, n. 2, p. 977-988, 1983.

DAIBER, A., Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 897–906, 2010.

DAVIES, M. J., Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. **Biochemical Journal**, v. 257, n. 2, p. 603-606, 1989.

DEWICK, P. M.; HASLAM, E., Phenol biosynthesis in higher plants. **Biochemical journal**. v. 113, p. 537-542, 1969.

DEWICK, P. M., Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3rd ed. **John Wiley & Sons Ltd**, p. 168, 2009.

DI MONTE, D.; BELLOMO, G.; THOR, H.; NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 235, n. 2, p. 343-350, 1984.

DÔRES, R. G. R. Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth). Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. U., Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v.2013, 2013.

FINI, A.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; TATTINI, M.; Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. **Plant Signal Behavior**. v. 6(5), p. 709–711, 2011.

FUSCO, D.; COLLOCA, G. L. O.; MONACO, M. R.; CESARI M., Effects of antioxidant supplementation on the aging process. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, p. 377–387, 2009.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N., Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5(31), p. 6697-6703, 2011.

Hagerman, A E., Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13(3), p. 437–49, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I., The deoxyribose method: A simple “Test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Anal. Biochem.** v. 165, p. 215–219. 1987.

HILGEMAN, N.; Avaliação da capacidade antioxidante in vitro e in vivo contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de plantas medicinais. Tese de doutorado em química - Universidade Federal de Sana Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

HUANG, W. Y.; ZHANG, H. C.; LIU, W. X.; LI, C. Y., Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 13(2), p. 94-102, 2012.

KSOURI, R.; MEGDICHE-KSOURI, W.; JALLALI, I.; DEBEZ, A.; MAGNÉ, C.; HIROKO, I.; ABDELLY, C., Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 1, p. 38. 2011.

KUČERA, O.; ENDLICHER, R.; ROUŠAR, T.; LOTKOVÁ, H.; GARNOL, T.; DRAHOTA, Z.; ČERVINKOVÁ, Z., The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro." **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

KUMAR, T. R., Induction of oxidative stress by organic hydroperoxides in testis and epididymal sperm of rats in vivo. **Journal of andrology**, v. 28(1), p. 77-85, 2007.

LAGHARI, A. H.; MEMON, S.; NELOFAR, A.; KHAN, K. M.; YASMIN, A.;
Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1850–1855, 2011.

LAUX, I.; NEL, A., Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways. **Clinical Immunology**, v. 101(3), p. 335-344, 2001.

LEAL, C. P. S.; Isolamento e quantificação de marcadores químicos de *Castella asiática* L. e *Cynara scolymus*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, 2006.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; MARINO, T.; TOSCANO, M., Antioxidant Properties of Phenolic Compounds : H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 22, p. 4916-4922, 2004.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.

LifeTechnology. "Live-Cell Imaging Reagent." from <https://www.lifetechnologies.com/nl/en/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/fluorescence-microscopy-and-immunofluorescence-if/microscopy-reagents-and-media/live-cell-imaging-reagents.html>.

LOURDES, M. DE; GIADA, R., Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases—A role for antioxidants**. **InTech**, p. 87-112, 2013.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, F. A. V.; SILVA, J. M. F. L.; SOBRAL-SOUZA C. E.; TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M. M.; SANTOS, K. K. A.; BRAGA, M. F. B. M.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; MENEZES I. R. A; COUTINHO, H. D. M..
Screening the in vitro modulation of antibiotic activity of the extracts and Fractions of

Ocimum gratissimum L., **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p. 1902-1907, 2012.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC, 1988.

MATOS, F. J. DE A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC edições, 1997.

MAZZONE, G.; TOSCANO, M.; RUSSO, N., Density functional predictions of antioxidant activity and UV spectral features of nasutin A, isonasutin, ellagic acid, and one of its possible derivatives. **Journal of agricultural and food**, v. 61, n. 40, p. 9650–7, 2013.

MAUGÉ, C.; GRANIER, T.; LANGLOIS D'ESTAINOT, B.; GARGOURI, M.; MANIGAND, C.; SCHMITTER, J. M.; CHAUDIÈRE, J.; GALLOIS, B., Crystal structure and catalytic mechanism of leucoanthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*. **Journal of molecular biology**, v. 397, n. 4, p. 1079-1091, 2010.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITAO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITAO, S. G., Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MOTHANA, R.A.A., Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of the endemic Soqotraen *Boswellia elongata* Balf. and *Jatropha unicostata* Balf. in different experimental models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2594–2599, 2011.

NADOUR, M.; MICHAUD, P.; MOULTI-MATI, F., Antioxidant activities of polyphenols extracted from olive (*olea europea*) of chamlal variety. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1802-1810, 2012.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009.

PARK, H. H.; LEE, S.; SON, H. Y.; PARK, S. B.; KIM, M. S.; CHOI, E. J.; SINGH, T. S.; HA J. H.; LEE, M. G.; KIM, J. E.; HYUN, M. C.; KWON, T. K.; KIM, Y. H.; KIM, S. H., Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro-inflammatory cytokines in mast cells. **Archive of Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 1303-1311, 2008.

PEREIRA, R. M.; FACHINETTO, R.; PRESTES, A. S.; PUNTEL, R. L.; SANTOS DA SILVA, G. N.; HEINZMANN, B. M.; BOSCHETTI, T. K.; ATHAYDE, M. L.; BURGER, M. E.; MOREL, A. F.; MORSCH, V. M.; ROCHA, J. B. T., Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 973–983, 2009.

PUNTEL, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T., Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 225–235, 2005.

RAHMAN, K., Studies on free radicals , antioxidants , and co-factors. **Clinical Interventions in aging**. v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

SABIR, S. M.; ROCHA, J. B. T., Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, v. 111, p. 845–851, 2008.

SANDRA, K. S. M.; TAMIRES DOS SANTOS, A.; CHRISTIANE, A. A. F; ANA PAULA, O.; VICTOR HUGO, A. A.; SIQUEIRA FILHO , J. A.; EDIGÊNIA, C. C. A.; JACKSON ROBERTO, G. S. A.; NAIANE, D. S. S. AND XIRLEY, P. N.; Photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 9, n. 7, p. 207–215, 2015.

SATA, N.; KLONOWSKI-STUMPE, H.; HAN, B.; HÄUSSINGER, D.; NIEDERAU, C., Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 6, p. 844-850, 1997.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; RENNÓ, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO, A. B. M.; NOGUEIRA, F. L. P.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F. M.;

- MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A., Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**. v. 299, p. 152–178, 1999.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. S.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SUN, J.; SHAO-FANG, L.; CHU-SHU, Z.; LI-NA, Y.; JIE, B.; FENG, Z.; QING-LI, Y., Chemical composition and antioxidant activities of *Brussonetia papyfera* fruits. **Plos One**, v 7, p. 1-8, 2012.
- SUN, Q.; HEILMANN, J.; KÖNIG, B., Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties – a review from the chemical point of view. **Beilstein journal of organic chemistry**. v.11, p. 249–264, 2015.
- TERASHIMA, M.; KAKUNO, Y.; KITANO, N.; MATSUOKA, C.; MURASE, M.; TOGO, N.; WATANABE, R.; MATSUMURA, S., Antioxidant activity of flavonoids valuated with myoglobin method, **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 291–298, 2012.
- BRENDA. W. S., Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p. 485-493, 2001.
- WOISKY, R.; SALATINO, A., Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**, v. 37, p. 99-105. 1998.

Capítulo III
ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

3.1 Caracterização do problema/justificativa científica

A caracterização da toxicidade de um composto depende muito das circunstâncias da análise. Muitos alimentos comuns na dieta humana contêm elementos que podem ser considerados tóxicos, como glicosídeos cianogênicos presentes nas sementes de algumas frutas, como a maçã, os tiocianatos encontrados nos brócolis, alcaloides em batatas, e lectinas na soja, esta também rica em compostos considerados antinutricionais como taninos (ERNST, 2007). No entanto, esses alimentos são considerados seguros para o consumo, mostrando que a concentração e o tratamento empregado podem alterar o seu grau de toxicidade (GEORGE, 2011).

Olhando por outro ângulo, uma droga sintética que possui um ou mais princípios ativos sempre apresenta os chamados “efeitos colaterais” que são os riscos assumidos em troca do benefício da droga. Quando falamos de plantas que possuem propriedades medicinais e biológicas, estamos citando espécies que contêm não só um, mas dezenas de compostos com alguma finalidade farmacológica, que originalmente possuem funções de defesa nos vegetais, como é o caso de metabólitos secundários biologicamente ativos (GEORGE, 2011; MOSIHUZZAMAN, 2012; PATWARDHAN; MASHELKAR 2009).

Acredita-se que esses muitos compostos podem, e normalmente trabalham, de forma sinérgica ou se anulando. Em teoria, em uma mistura complexa como um extrato vegetal pode haver um composto cancerígeno e cinco compostos anticancerígenos, levando a mistura total no caminho de uma ação anticancerígena. Porém, não é errado pensar que um ou vários desses compostos possuam a capacidade de induzir efeitos adversos quando ingeridos, fazendo com que algumas plantas possam ser categorizadas como venenosas para o consumo humano (MOSIHUZZAMAN 2012; PATWARDHAN, MASHELKAR 2009).

Um estudo de 2013 (IFEOMA; OLUWAKANYINSOLA, 2013) indicou que existe uma demanda crescente para os medicamentos à base de plantas, mas que apenas 10% deste tipo de produto são verdadeiramente padronizados e possuem informações sobre seus componentes ativos, mecanismos de ação e toxicidade, ignorando assim o risco do uso de ervas e seus potenciais efeitos adversos nocivos quando usados como medicamentos. Isso demonstra o quão importante é o investimento na pesquisa na área da toxicidade de compostos de origem vegetal.

Os testes toxicológicos para medicamentos são realizados em etapas, iniciando por ensaios preliminares *in vitro*, seguidos de ensaios *in vivo* com animais e avaliação clínica para que seja provada eficácia e segurança se uso, para então ser aprovado oficialmente (ANVISA 2016). Houve uma grande evolução para os ensaios *in vitro*, na tentativa de se aproximar cada vez mais de respostas que prevejam resultados de tratamentos *in vivo* e, com isso, reduzir a necessidade de utilização de animais, ao mesmo tempo que procura ampliar os conhecimentos das bases bioquímicas e mecanismos de ação das amostras que estão sendo testadas (TONG; FANG; MENDRICK, 2009).

Dentre as técnicas *in vitro* utilizadas para analisar a toxicidade as tecnologias – ômicas, incluindo a proteômica, metabolômica e genômica, se tornaram uma grande base para estudos de exposição a novos compostos em nível molecular. Assim, a partir desse conceito surgiu a toxicogenômica que é capaz de verificar o perfil de expressão gênica de uma célula, tecido ou órgão na presença de um composto. Esta técnica aliada às emergentes tecnologias de sequenciamento e bioinformática se tornaram uma ferramenta confiável, sensível, com resultados reprodutíveis e de amplo alcance com capacidade preditiva para avaliação de mecanismos de ação e segurança de uso (TONG; FANG; MENDRICK, 2009).

Neste contexto, e considerando a capacidade antioxidante potencialmente farmacológico apresentado pelo extrato etanólico das sementes de *Triplaris gardneriana*, o trabalho buscou avaliar a toxicidade, do extrato e frações das sementes de *Triplaris gardneriana* wedd, por diversas metodologias *in vitro*, com destaque para investigação toxicogenômica e ensaios *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho objetiva avaliar por diferentes métodos a toxicidade do extrato etanólico e frações obtidos a partir de sementes de pajeú (*Triplaris gardneriana* Wedd).

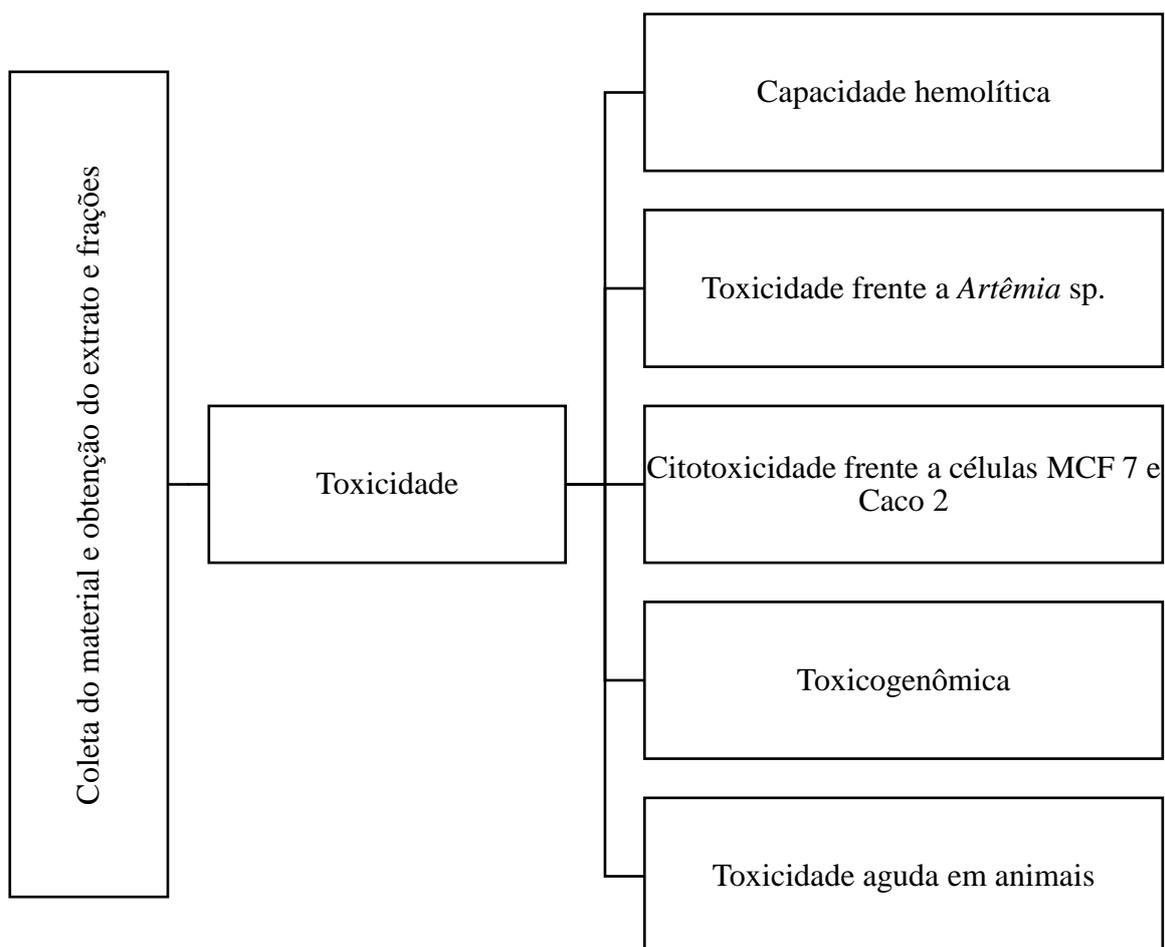
3.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade hemolítica do extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* Wedd em sangue de coelhos e de humanos;
- Determinar a toxicidade do extrato etanólico e frações das sementes de *T. gardneriana* Wedd frente a náuplios de *Artemia* sp.;
- Determinar a citotoxicidade do extrato etanólico e fração metanólica das sementes de *T. gardneriana* Wedd por meio de ensaio *in vitro* com linhagens de células humanas MCF 7 e Caco 2 (mama e colón retal, respectivamente);
- Avaliar a toxicidade das amostras por meio da investigação da alteração no perfil da expressão gênica em linhagens de células humanas (MCF 7) quando expostas ao extrato etanólico de *T. gardneriana* e seus constituintes majoritários;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* Wedd;

3.3 EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia experimental seguirá as etapas descritas no fluxograma 3.1. Após a obtenção do extrato etanólico, será realizado seu fracionamento e, posteriormente, as análises toxicológicas por diferentes metodologias para comprovação dos resultados.

Fluxograma 3.1: Atividades previstas para o desenvolvimento das análises de toxicidade de *Triplaris gardneriana*; MCF 7 – linhagem de células carcinogênicas de mama; Caco 2 – Linhagem de células carcinogênicas de cólon intestinal.



3.4 Materiais Biológicos

3.4.1 Sangue

O sangue foi cedido por voluntários adultos jovens saudáveis na faixa dos 20 aos 30 anos. Foi coletada uma alíquota de 2 mL de sangue de dois indivíduos dos tipos sanguíneos A, B e O. Alíquotas de 2 mL de sangue de coelhos também foram coletadas. Logo, após a coleta, o sangue foi processado através de sucessivas homogenizações com salina (0,9% NaCl), seguida de centrifugação a $1.000 \times g$ por 5 minutos. Em cada etapa o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o pellet separado para a nova ressuspensão (5x). Em um balão volumétrico, fez-se uma suspensão com o pellet de hemácias resultante a 1% com salina (NaCl 0,9% m/v), essa suspensão foi imediatamente utilizada para os ensaios ou armazenadas sob refrigeração ($\sim 8^\circ\text{C}$). As suspensões respeitaram o limite máximo de 24 horas para serem utilizadas.

Dois coelhos machos da raça Califórnia, com três meses de idade, foram adquiridos junto ao Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC, Fortaleza, Ceará. Os coelhos foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC com água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum*.

3.4.3 Cultivo de células MCF 7

Células MCF 7 foram cultivadas assim como descrito no capítulo II item 2.4.5.4

3.4.4 Cultivo de células Caco 2

Frascos de cultivo celular contendo uma suspensão de células de carcinoma de cólon intestinal (ATCC, HTB-37; número de passagem de 20-42), a uma densidade de $10,10^4$ células/mL em meio de cultura DMEM (enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado, 0,6% de penicilina/estreptomicina e 1% de aminoácidos não essenciais), foram incubadas numa atmosfera de 5% CO_2 e 100% de umidade relativa.

Depois de 72 h de incubação foi realizada uma troca do meio de cultura seguida da análise em microscópio óptico para investigação de contaminações e estimação da confluência celular, que deve estar entre 40 e 50%. Os frascos eram então incubados novamente e uma nova avaliação e troca de meio de cultura foi realizada após 48 h (confluência celular 70-80%).

Após 72 h da última troca do meio de cultura (confluência celular entre 90 e 100%), este foi retirado, as células lavadas, tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura, contadas em câmara de Neubauer, para ajuste de concentração e passadas para novos frascos ou semeadas para placas de 96 poços para os ensaios.

3.4.5 Cultivo de células Caco- 2 diferenciadas

Para induzir a diferenciação de células carcinogênicas de cólon humano foram utilizadas placas de 6 poços de poliéster Transwell®. Cada poço desse tipo de placa tem diâmetro interno de 24 mm e é composto por dois compartimentos, um superior e um inferior, que recebem meio de cultura e que se comunicam através de uma membrana semipermeável (0,4 µm de tamanho de poro), onde as células semeadas se fixam e se multiplicam para formar um epitélio com porção apical e basal.

As células Caco 2 foram semeadas a uma densidade de 40.000 células/cm² em 1,5 mL de DMEM (enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado, 0,6% de penicilina/estreptomicina e 1% de aminoácidos não essenciais), nos compartimentos superiores dos poços e 2,5 mL de meio de cultura foi adicionado nos compartimentos inferiores. Dessa forma, as células Caco 2 foram cultivadas até permitir a sua diferenciação através de incubação durante 21 dias, a 37 °C, atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Os meios de ambos os compartimentos foram renovados duas vezes por semana onde também eram avaliados cada poço, individualmente, em microscópio óptico para investigação de possíveis contaminações.

Após 21 dias de cultivos foi realizada, através de microscópio óptico, a verificação quanto à diferenciação das células que foram então utilizadas para ensaios de citotoxicidade e toxicogenômica.

3.4.6 Animais para o teste de toxicidade oral aguda

Quinze camundongos fêmeas convencionais, da linhagem Wistar, nulíparas e não prenhas foram adquiridas com três semanas de idade do Biotério Central da UFC (BIOCEN-UFC). Foram selecionados, aleatoriamente, dentre os animais disponíveis levando em consideração alguns critérios: (1) todos os animais eram do sexo feminino; (2) as fêmeas eram nulíparas e não estavam prenhas; (3) no começo do experimento, os animais tinham entre 8 e 12 semanas de idade e tinham peso dentro do intervalo de 20% da média de peso corporal do grupo.

A temperatura do biotério de experimentação era de 24°C (± 2 °C). A umidade foi monitorada: nunca esteve abaixo de 30% e tão pouco excedeu 70% de umidade relativa. A iluminação foi artificial, com ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de escuro.

Para alimentação, foi utilizada ração convencional de laboratório com suprimento ilimitado de água. O número de animais foi de cinco por gaiola. Os animais foram marcados para facilitar a identificação e mantidos nas gaiolas por tempo hábil para permitir aclimação às condições do laboratório.

Todos os animais utilizados e o material biológico foram descartados de acordo com as Normas e Procedimentos de Biossegurança e Bioética (BAZZANO, 2006). Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, que adota os preceitos do COBEA e obedece à Lei No 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

3.4.7 Material Vegetal

O extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* e frações foram obtidos e armazenados de acordo com o descrito no capítulo 2 nos itens 2.4.2 e 2.4.3.

3.4.8 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica das amostras foi investigada segundo a metodologia descrita por Bernheimer (1988) e Merker e Levine (1986), com algumas modificações.

Suspensões de eritrócitos de coelhos e de humanos (tipo A, B e O) a 1% foram diluídas em proporção de 1:10 (v/v) em NaCl 0,9%, contendo várias diluições do extrato etanólico (8 a 2000 µg/mL). Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37°C durante 1 h.

O grau de hemólise foi calculado pela liberação de hemoglobina, medida por absorbância a 540 nm, após centrifugação a 1.000 x g por 5 min. A hemólise completa (100%) foi obtida por diluição de 100 µL da suspensão de células em 900 µL de água destilada, utilizando-se ainda um controle negativo com a mesma proporção de células em solução salina.

3.4.9 Toxicidade em *Artemia* sp.

Cistos de *Artêmia* sp. foram submersos para eclosão em solução salina (NaCl 0,9%) sob temperatura ambiente, iluminação e aeração constante por 24 horas. Este ensaio foi realizado utilizando o extrato das sementes de *T. gardneriana* e suas frações metanólica e acetato de etila, em concentrações variando entre 31 e 1.000 µg/mL, em solução salina (NaCl 0,9%). Cada concentração foi testada em triplicata. Tubos contendo apenas solução salina foram usados como controle negativo. Dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), foi usado como controle positivo. Dez náuplios de *Artemia* sp. foram adicionados em cada tubo e incubadas por 24 h. Os tubos foram examinados e o número de náuplios mortos foram contados e registrados. O percentual de mortes (equação abaixo) e a CL₅₀ foi determinada a partir de análise de regressão da função probito.

Percentual de morte (%): $(\text{Total de náuplios} - \text{Náuplios vivos}) / \text{Total de náuplios} \times 100$

3.4.10 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de mama MCF 7

A viabilidade celular de células MCF 7 tratadas com as amostras foram determinadas utilizando o kit ATP-Lite™. O ensaio detecta a luminescência emitida quando o ATP das células metabolicamente ativas fornece a energia necessária para a enzima luciferase converter luciferina em oxiluciferina (MANDIMIKA *et al.*, 2007a; 2007b; 2008).

Células de MCF 7 (ATCC, HTB-22; número de passagem 7 a 13), foram tratadas com tripsina, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio de cultura. A concentração final para MCF 7 foi de 10.000 células/poço. Placas de microtitulação de 96 poços foram semeadas com 100 µL da suspensão celular e, em seguida, incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) e 100% de umidade relativa. Após 48 h, 17 µL de soluções contendo as amostras (extrato, fração metanólica e controles), em meio de cultura foram adicionados, cuidadosamente, sobre as células perfazendo um volume final de 117 µL em cada poço (concentração final variando de 60 a 250 µg/mL para EETg e FMTg).

Foram realizados controles nas mesmas condições, onde somente o meio DMEM ou somente o controle contendo DMSO (volume final < 0,5%), foi adicionado às células. Também foi avaliada a viabilidade celular frente ao ácido cafeico e à quercetina que foram identificados como ácido fenólico e flavonoide majoritários, pelo CLAE, respectivamente (concentrações variando de 10 a 150 µg/mL e de 5 a 80 µg/mL respectivamente). Ácido gálico foi avaliado como controle positivo de composto fenólico (concentrações variando de 2,5 a 60 µg/mL).

Após 6 e 24 h de incubação, o meio de cultura foi removido e foi adicionado a cada poço 150 µL de uma solução de lise celular dissolvida em meio de cultura (1/3 v/v), conteúdo do kit ATP-Lite™. As placas foram agitadas durante 5 min, a 700 rpm utilizando um agitador de placas (Microtitre plate shaker - SSM5, Stuart Equipment, Staffordshire, Reino Unido). Foram então adicionados 50 µL de solução de substrato (conteúdo do kit ATP-Lite™) e as placas foram novamente agitadas nas mesmas condições anteriores. Ao término da agitação, as placas foram protegidas da luz, por 10 min e levadas ao leitor de microplacas (BIOTEK Synergy HT, Winooski, VT, EUA) para medição da luminescência. Cada concentração de cada amostra foi testada em triplicata e os controles em sextuplicata.

3.4.11 Citotoxicidade em células Caco 2 (HTB-37)

A viabilidade celular de células Caco 2 tratadas com as amostras foram determinadas utilizando o kit ATP-Lite™. Células Caco 2 (número de passagem 32 a 40), indiferenciadas, foram tratadas com tripsina, contadas em câmara de Neubauer e

ressuspensas em seus respectivos meios de cultura. A concentração final foi de 15.000 células/poço. Placas de microtitulação de 96 poços foram semeadas com 100 µL da suspensão celular e, em seguida, incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) e 100% de umidade relativa. Após 72 h, 17 µL de soluções contendo as amostras em meio de cultura foram adicionados, cuidadosamente, sobre as células perfazendo um volume final de 117 µL em cada poço (concentração final variando de 60 a 250 µg/mL para EETg e FMTg).

Foram realizados controles nas mesmas condições, onde somente o meio DMEM ou somente o controle contendo DMSO (concentração final < 0,5%), foi adicionado às células. Também foi avaliada a viabilidade celular frente ao ácido cafeico e a quercetina que foram identificados como ácido fenólico e flavonoide majoritários, pelo CLAE, respectivamente (concentrações variando de 10 a 150 µg/mL e de 5 a 80 µg/mL respectivamente). Ácido gálico foi avaliado como controle positivo de composto fenólico (concentrações variando de 2,5 a 60 µg/mL).

Após 6 e 24 h de incubação, o meio de cultura foi removido e foi adicionado a cada poço 150 µL de uma solução de lise celular dissolvida em meio de cultura (1/3 v/v), conteúdo do kit ATP-Lite™. As placas foram agitadas durante 5 min, a 700 rpm utilizando um agitador de placas (Microtitre plate shaker - SSM5, Stuart Equipment, Staffordshire, Reino Unido). Foram então adicionados 50 µL de solução de substrato (conteúdo do kit ATP-Lite™) e as placas foram novamente agitadas nas mesmas condições anteriores. Ao término da agitação, as placas foram protegidas da luz, por 10 min e levadas ao leitor de microplacas para medição da luminescência. Cada concentração de cada amostra foi testada em triplicata e os controles em sextuplicata.

Para a avaliação da citotoxicidade em células Caco 2 diferenciadas também foi utilizado o Kit ATP-lite nas mesmas condições do ensaio com células MCF 7 e células Caco- 2 indiferenciadas, mas primeiramente realizou-se o procedimento de diferenciação como descrito no item 3.4.5, utilizando placas *Transwell* de 48 poços, cujo volume final na câmara superior é igual ao das placas de 96 poços.

3.4.12 Ensaio de exposição de células MCF 7 às amostras para análise da alteração do perfil de expressão gênica

Os resultados obtidos através da análise de viabilidade celular foram utilizados para estabelecer as concentrações subcitotóxicas das amostras, sendo estas as que não reduzem mais do que 20% da viabilidade celular, após um período de 24 horas de exposição (100 µg/mL para o extrato etanólico) (MANDIMIKA et. al. 2007a; 2007b; 2008).

Foram, então, realizadas as coletas de RNA total utilizando kits com essa finalidade (QIAGEN – Hilden, Alemanha; AIA shredder kit - 79656; RNeasy mini kit – 74106; Rnase – Free Dnase set (50) – 79254). Inicialmente, uma nova exposição foi efetuada utilizando células MCF- 7, onde ao final do período o meio de cultura foi removido e as células foram lisadas pela adição de uma solução tampão do Kit contendo 0,1% de β -mercaptoetanol. Este tampão é altamente desnaturante por conter tiocianato de guanidina, o que inativa imediatamente as RNAses e garante a purificação de RNA intacto. O lisado celular obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga e armazenado a -80 °C até o momento da extração do RNA total. As exposições das células às amostras foram realizadas em triplicatas, com exceção das exposições conduzidas com os controles (DMSO e Ctrl Quim), as quais foram feitas em sextuplicatas.

3.4.13 Isolamento, purificação, quantificação e pureza das amostras de RNA total

Os lisados das células MCF- 7, obtidos como descrito no item anterior, foram utilizados para o isolamento do RNA total. De modo geral, o procedimento envolveu várias etapas de lavagens (com tampões específicos e etanol) e centrifugações para forçar a passagem através de micro colunas, onde o RNA se liga por afinidade. Antes de ter o RNA isolado, o material foi passado através de colunas QIAshredder (contidas no kit RNeasy), visando homogeneizá-lo e reduzir sua viscosidade, e tratado com RNase-Free DNase Set para inativação do DNA. Em seguida, o procedimento de isolamento do RNA total prosseguiu como nas instruções do fabricante.

O volume de 1,5 µL foi retirado de cada solução de RNA isolado, correspondente a uma amostra, para leitura em um espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Wilmington, NC, EUA) para dosagem da concentração de RNA e avaliação do grau de pureza, sendo considerados valores ideais entre 1,9 e 2,1 para a razão 260/280 e valores entre 2,0 e 2,2 para a razão 260/230.

3.4.14 Método de hibridização dos genes.

As amostras de RNA total isolado e purificado (100 ng/ μ L) foram mantidas em gelo seco e enviadas congeladas, num volume total de 20 μ L, à companhia ServiceXS (Leiden, Holanda) para realização de sequenciamento de nova geração – NGS (*New Generation Sequencing*), segundo os passos como se segue.

O kit NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit para Illumina® foi utilizado para processar as amostras. A preparação das amostras foi realizada de acordo com o protocolo "NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit para Illumina" (NEB #E7420S/L). Resumidamente, o mRNA foi isolado do RNA total usando esferas magnéticas oligo-dT. Após a fragmentação do RNA, a síntese do cDNA foi realizada. Isto foi utilizado para a ligação com os adaptadores sequenciais e para a amplificação via PCR ("Polymerase Chain Reaction") do produto resultante. O tamanho dos produtos resultantes foi consistente com a distribuição de tamanho esperado (300-500 pb).

O agrupamento e sequenciamento de DNA foi realizado com o Illumina NextSeq 500 de acordo com o protocolo do fabricante. Foi usada uma concentração de entrada de 1.6 pM de cDNA. Análise de imagens, "base calling", e controle de qualidade foi realizada com o Illumina data analysis pipeline RTA v2.4.11 e o Bcl2fastq v2.17.

3.4.15 Análises de bioinformática

3.4.15.1 Normalização dos dados dos microarranjos

Para normalização dos dados foi utilizado o pacote edgeR ("Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R"). Em uma breve descrição, essa ferramenta matemática realiza a análise diferencial da expressão do perfil de RNA-seq com replicação biológica. Utiliza uma série de ferramentas e metodologias estatísticas que pode ser aplicada para a análise diferencial de dados de genômica, gerando informações sobre o nível de significância das leituras. No mesmo pacote foi utilizado o teste "Quantile adjusted conditional maximum likelihood para calcular o *FDR* (*False Discovery Rate*)"

que é usado como um pós teste realizando ajustes no valor de “ p ”, reduzindo o valor de falso positivo (ROBINSON, CARTHY, SMYTH, 2010).

3.4.15.2 A Construção de mapas de expressão gênica

Os dados normalizados dos microarranjos foram, hierarquicamente, agrupados usando os programas “Cluster” (correlação descentralizada, agrupamento por ligação de médias), utilizando como parâmetros três observações com leituras superiores a 0,6 entre as amostras de cada gene (EISEN *et al.*, 1998). O programa “Treeview” foi utilizado para gerar imagens dos mapas de expressão gênica das amostras (GUTTULA, ALLAM, GUMPENY 2012).

3.4.15.3 Análises das vias metabólicas diferencialmente expressas

Para definição das vias metabólicas que foram significativamente alteradas nas células tratadas com as amostras, foi utilizado o software “Consensus Path Data Base” – CPDB ou *Consensus*, tratando-se de uma plataforma virtual para análise funcional dos genes. Ao se informar uma determinada lista de genes a plataforma identifica vias metabólicas celulares, e suas funções, que são controladas por genes presentes na lista informada, além disso informa quantos genes tem cada via alterada, quantos genes da lista informada participam de uma mesma via e quantos por cento do total de genes que regulam a via esse valor representa. Todas as informações ficam disponíveis na forma de uma tabela, além disso, um valor de “ q ” é gerado e, com isso, é possível filtrar quais vias foram significativamente alteradas ($q < 0,05$).

Para a obtenção das listas das vias metabólicas alteradas, inicialmente, foi submetido uma lista de genes previamente tratada. O tratamento consistiu da aplicação de filtros para detecção de genes significativamente expressos (valor p ajustado pelo FDR para ser menor que 0,05) e com alteração de expressão de cerca de uma vez e meia (50%) em relação ao controle $\text{LogFC} \pm 0,6$. Cada lista foi separadamente submetida à análise no *Consensus* e as vias que apresentaram valores de q menores que 0,05 foram selecionadas.

Foram construídas imagens que ilustram a rede de conexão entre as principais vias alteradas por cada amostra. As características e funções dos genes presentes nas vias mais

alteradas por cada mostra foram investigadas utilizando duas bases de dados diferentes, o NCBI (National Center for Biotechnology information) e o KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

3.4.15.4 Identificação de funções biológicas e riscos apresentados pelos tratamentos

Para análise de possíveis riscos desencadeados pelas alterações de expressão gênica desencadeadas em células de MCF 7 tratadas, foi-se utilizado o software Ingenuity (Qiagen®), uma plataforma virtual para análise funcional dos genes. Ao se informar uma determinada lista de genes, a plataforma identifica diversas variáveis, como: funções celulares e moleculares alteradas, principais vias alteradas, sistemas fisiológicos alterados, doenças e bio-funções relacionadas e os principais efeitos toxicológicos esperados.

Os dados normalizados dos microarranjos ($FDR < 0,05$) de cada amostra foram agrupados, através da aplicação de filtros ($\text{LogFC} \pm 0,6$), em genes que tiveram um aumento de, pelo menos, uma vez e meia na expressão (superexpressão) ou uma redução de, pelo menos, uma vez e meia na expressão (subexpressão).

3.4.15.5 Análises comparativa entre a assinatura de expressão gênica das amostras e o de drogas conhecidas

A natureza dos processos e das vias afetadas pelas amostras foram analisadas por meio do banco de dados e algoritmo de busca Mapa Conectivo (Connectivity Map database) (LAMB *et al.*, 2006; LAMB, 2007). O conjunto de alterações na expressão de uma determinada linhagem celular em resposta a um exógeno específico é denominado de assinatura de expressão. Usando o Mapa Conectivo, foi feita uma busca de similaridade entre as assinaturas de expressão gênica obtidas após a exposição das células MCF 7 por 6 h às amostras testadas e as assinaturas em resposta a compostos conhecidos, cujo mecanismo de ação é bem estabelecido. O banco de dados contém informações obtidas a partir das linhagens celulares MCF 7, HL-60 (células de leucemia promielocíticas humanas), PC3 (células de câncer de próstata). A similaridade entre as assinaturas é classificada de acordo com um escore de conectividade, dando o grau de

semelhança das amostras a diversos compostos. Para tal fim, as identidades específicas na plataforma Illumina (Illumina IDs) dos genes significativamente regulados para cima ou para baixo, em cada grupo, foram, primeiramente, convertidas em identidades da plataforma Affymetrix U133A IDs, utilizando o programa Martview (<http://www.biomart.org/biomart/martview/>) e, posteriormente, foram baixados para o Mapa Conectivo (<http://www.broad.mit.edu/cmap/>).

3.4.16 Avaliação de toxicidade aguda

O estudo de toxicidade oral aguda foi realizado de acordo com o protocolo 425, teste limite, da OECD (OECD, 2001). Este protocolo de toxicidade aguda envolve a administração oral por gavagem, de uma substância teste a camundongos (descritos anteriormente), seguida de observação por 14 dias, registrando-se peso corporal, quaisquer efeitos adversos e o comportamento dos animais.

As amostras foram administradas através de cânulas por gavagem em pequenas frações com volume adequado ao volume estomacal dos animais durante um período inferior a 12 horas. Os animais estavam em jejum de 3 horas antes de cada aplicação, permanecendo em jejum por mais 1 hora. Logo, retorna a alimentação por 1 hora antes do próximo jejum. Assim 3 administrações orais foram feitas para cobrir a dose necessária.

A dose inicial é selecionada com base em algum indício que aquela dose produzirá alguns sinais de toxicidade sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade. Baseados na literatura sobre extratos etanólicos de plantas e toxicidade de compostos fenólicos, além do histórico de uso seguro das plantas em estudo, decidiu-se fazer o teste na dose limite no intuito de poupar animais (2.000 mg/kg de peso corporal)

Animais moribundos ou animais que estão, obviamente, sentindo dor ou mostrando sinais de sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados humanamente. Estes devem ser considerados na interpretação dos resultados da mesma maneira que animais que morreram durante o teste.

Foram feitos dois controles: (1) só com água destilada e (2) com o veículo usado para diluir as amostras. As amostras em questão são extremamente difíceis de dissolver em água nas concentrações requeridas para dose limite do teste (2.000 mg de amostra /

kg de peso do animal). Portanto, as amostras foram diluídas em 1 parte de álcool (70%) e, posteriormente, diluídas em 3 partes de água destilada. Assim, a concentração de álcool teria menos probabilidade de causar efeitos colaterais, o que poderia prejudicar a interpretação do teste.

Os animais foram observados, individualmente, nos primeiros 30 minutos e, logo, periodicamente nas primeiras 24 horas. Depois, diariamente até completar 14 dias. Devem ser observados: alterações na pele e pêlos, olhos e mucosa, alterações na respiração, na circulação, no sistema nervoso central e autônomo, na atividade somatomotora e no comportamento. Observar também tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Os animais foram pesados nos dias 0, 1, 4, 7, 14. Ao final, todos foram sacrificados e seus órgãos observados cuidadosamente.

3.5 Resultados

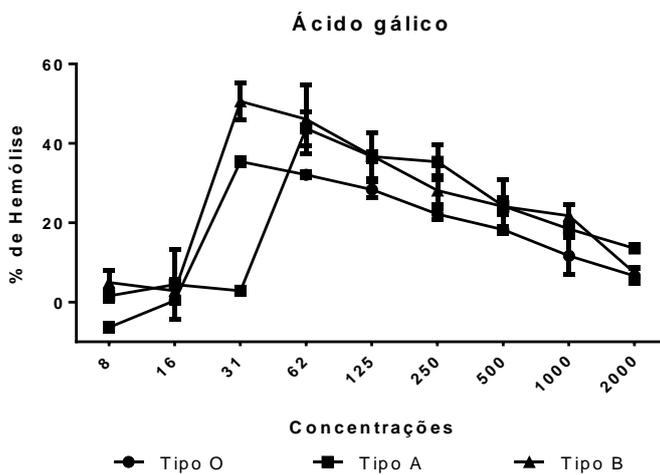
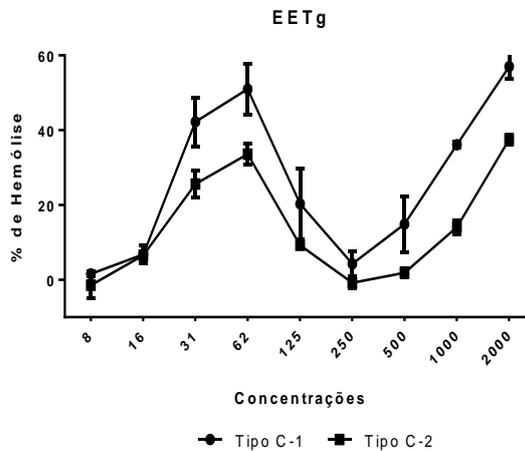
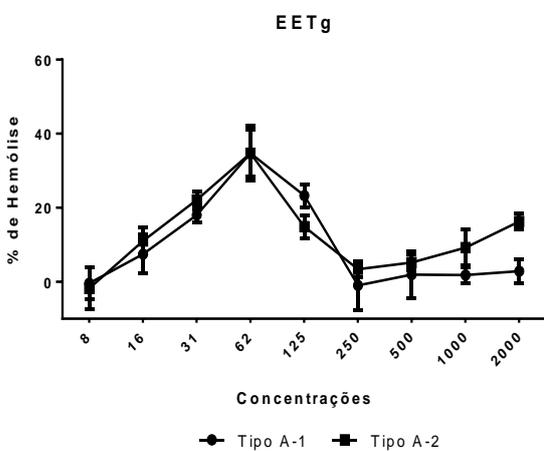
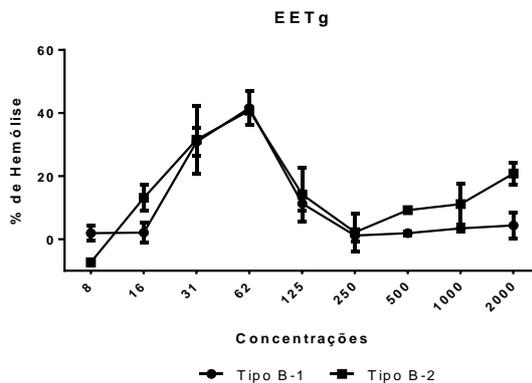
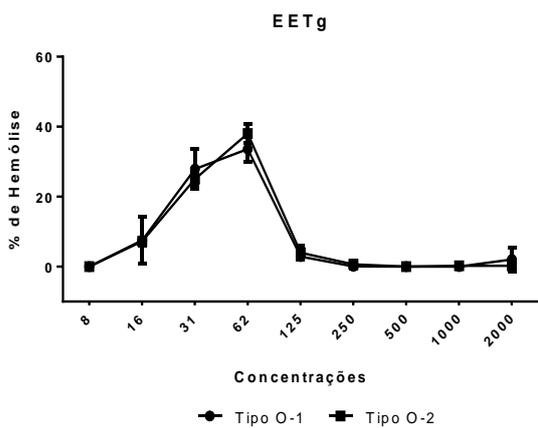
3.5.1 Atividade hemolítica

Utilizando sangue humano do tipo A, B e O, o extrato etanólico de *T. gardneriana* apresentou um percentual máximo de hemólise de aproximadamente 40% na concentração de 62 µg/mL. A curva geral apresentou um aumento na capacidade hemolítica que atingiu o máximo na concentração, anteriormente, citada e começou a reduzir voltando a níveis basais na concentração de 250 µg/mL (Gráfico 3.1).

A exceção desse comportamento, do EETg, aconteceu quando utilizado sangue de coelho, onde a hemólise aumentou de forma dose-dependente até a concentração de 62 µg/mL, reduziu a níveis basais na concentração de 250 µg/mL e, a partir desse ponto, voltou a aumentar, atingindo, novamente, algo entre 40 e 60% de hemólise na concentração de 2.000 µg/mL (Gráfico 3.1).

O ácido gálico apresentou o mesmo comportamento, com sangue humano, atingindo um máximo nas concentrações de 32 e 62 µg/mL, voltando a reduzir gradativamente chegando próximo aos níveis basais na concentração mais alta de 2.000 µg/mL (Gráfico 3.1).

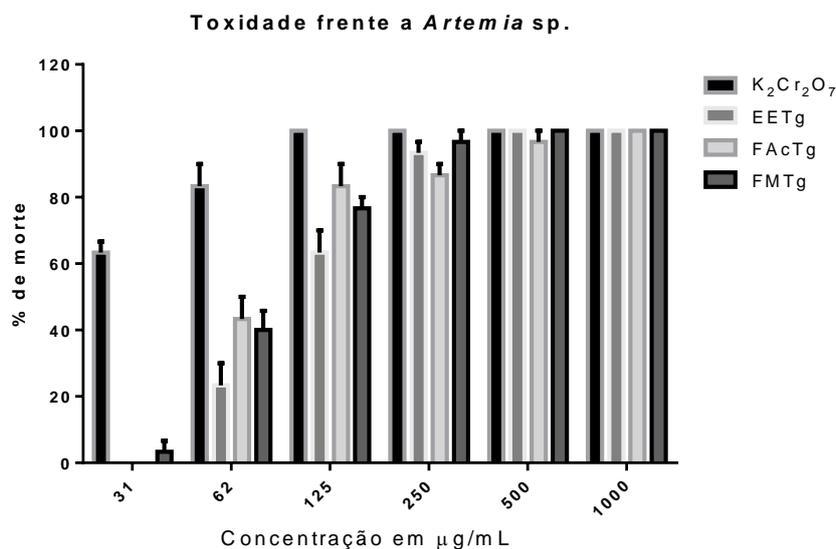
Gráfico 3.1: Capacidade hemolítica das amostras frente a diferentes tipos sanguíneos; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; cada número corresponde a um indivíduo diferente e o tipo C refere-se ao sangue de coelho.



3.5.2 Toxicidade frente a náuplios de *Artemia* sp.

Todas as amostras apresentaram perfil dose-dependente quanto à toxicidade frente a náuplios de *Artemia* sp. nas concentrações testadas (Gráfico 3.2). As concentrações mais altas (500 e 100 $\mu\text{g/mL}$) inviabilizaram 100% dos náuplios. Por outro lado, apenas o controle positivo teve ação efetiva na concentração mais baixa de 31 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 3.2: Toxicidade das amostras frente a náuplios de *Artemia* sp; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – dicromato de potássio; EETg - Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FAcTg - Fração acetato de etila de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*.



As CL_{50} mostraram graus diferentes de toxicidade para cada amostra, sendo mais tóxico o extrato etanólico com CL_{50} de 67,85 $\mu\text{g/mL}$ e a menos tóxica a fração metanólica com CL_{50} de 103,37 $\mu\text{g/mL}$. Mesmo apresentando toxicidade para essa espécie, sendo 100% letal nas concentrações mais altas de 500 e 100 $\mu\text{g/mL}$, todas as amostras apresentaram, pelo menos, dez vezes menos toxicidade do que o controle positivo (dicromato de potássio), que apresentou CL_{50} de 5,8 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3.1).

3.5.3 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de mama MCF 7

Frente às células MCF- 7, EETg e FMTg apresentaram pouca ou nenhuma toxicidade em 6 h de exposição e um comportamento dose-dependente com 24 h de exposição chegando a inviabilizar entre 60 e 80% das células na maior concentração de 250 µg/mL (Gráfico 3.3).

Tabela 3.1: Concentração letal das amostras, em µg/mL, que é capaz de matar 50% dos náuplios de *Artemia* sp. (CL₅₀)

Amostra	CL ₅₀ (µg/mL)	Razão da CL ₅₀ das amostras/ CL ₅₀ do controle
EETg	67,85 ± 2,1	11,66
FMTg	103,37 ± 2,8	17,82
FACtG	74,64 ± 2,1	12,86
Controle		
K ₂ Cr ₂ O ₇	5,8 ± 0,9	-

K₂Cr₂O₇ – dicromato de potássio; EETg - Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FACtG - Fração acetato de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*.

O ácido gálico apresentou toxicidade dose-dependente já em 6 h de exposição, e o resultado se manteve persistente, com poucas variações para cada concentração, após 24 h de exposição. Essa foi a amostra que desencadeou a maior citotoxicidade, chegando a reduzir a viabilidade celular a aproximadamente 20%, na concentração mais alta de 60 µg/mL.

O ácido cafeico e a quercetina não apresentaram toxicidade para essa linhagem, mesmo nas concentrações mais altas testadas (150 e 80 µg/mL, respectivamente) nos dois tempos de exposição.

3.5.4 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de colón retal Caco 2

Frente a células Caco 2, as amostras EETg e FMTg apresentaram um perfil semelhante ao encontrado frente às células MCF 7, com pouca ou nenhuma toxicidade em 6 h de exposição e um comportamento dose-dependente com 24 h de exposição, inviabilizando entre 40 e 60% das células na maior concentração de 250 µg/mL (Gráfico 3.4).

O ácido gálico apresentou toxicidade dose-dependente já em 6 h de exposição, e o resultado se manteve persistente, com poucas variações para cada concentração, após 24 h de exposição. Assim como para MCF 7, essa foi a amostra que apresentou a maior citotoxicidade chegando a reduzir a viabilidade celular a aproximadamente 20% na concentração mais alta de 60 µg/mL.

A quercetina apresentou indícios de toxicidade nas concentrações mais altas testadas (60 e 80 µg/mL), nos dois tempos de exposição, mas essa atividade não chegou a inviabilizar mais do que 20% das células.

Devido à baixa toxicidade apresentada pelas amostras, frente às duas linhagens celulares, apenas a CL₅₀ do ácido gálico ficou dentro da faixa de concentrações testadas no ensaio, todas as demais foram obtidas por estipulação estatística (Tabela 3.2). A linhagem de células Caco 2 se mostrou mais sensível às amostras nos dois tempos de exposição quando comparada à linhagem MCF 7, também nos dois tempos de exposição.

Tabela 3.2: Concentração letal das amostras, em µg/mL, que é capaz de matar 50% das células carcinogênicas (CL₅₀)

Amostra	MCF 7		Caco 2	
	24 h	6 h	24 h	6h
EETg	482,2 ± 2,43	3.513,0 ± 3,09	309,2 ± 2,14	3.762,0 ± 2,96
FMTg	664,8 ± 2,57	1.792,0 ± 3,04	562,9 ± 2,39	ND
AG	47,15 ± 1,24	64,5 ± 1,33	38,32 ± 0,89	41,1 ± 0,95
QU	2.516,0 ± 3,92	ND	372,2 ± 2,44	545,1 ± 3,03
AC	3.277,0 ± 3,91	7.500,0 ± 4,81	ND	ND

ND – Não Detectado; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; AG – ácido gálico; QU – quercetina; AC – ácido cafeico.

3.5.5 Citotoxicidade em linhagens de células carcinogênicas de colón retal Caco 2 diferenciadas.

O EETg também apresentou pouca citotoxicidade, nas concentrações testadas, frente às linhagem de células Caco 2 com células diferenciadas, mesmo apresentando tendência dose-dependente, não houve uma grande diferença entre a menor e a maior concentração, sendo que esta não conseguiu reduzir a viabilidade celular em mais do que 20%. Diferentemente dos ensaios de viabilidade anteriores, EETg apresentou indícios de citotoxicidade já em 6 h de exposição com resultado persistente depois de 24 h de avaliação. A quercetina apresentou um perfil comportamental semelhante ao apresentado pelo EETg (Gráfico 3.5).

Assim como para células MCF 7 e Caco 2 indiferenciadas, o ácido gálico foi o composto que apresentou maior citotoxicidade, reduzindo a viabilidade celular para 60 e 70%. O ácido cafeico apresentou claro padrão dose-dependente, mas não conseguiu inviabilizar mais do que 20% das células, mesmo na concentração mais alta de 150 µg/mL, indicando baixa toxicidade.

O Ácido cafeico frente à linhagem de células MCF 7 e o ácido gálico frente à Caco 2 indiferenciadas apresentaram resultados para 6 h de exposição que foram persistentes e ligeiramente mais fortes para 24 h de exposição. Contudo, frente a células Caco 2 diferenciadas, a citotoxicidade foi menor quando se aumentou o tempo de exposição (Gráfico 3.5).

Gráfico 3.3: Viabilidade de células MCF 7 expostas às amostras; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; AG – ácido gálico; QU – quercetina; AC – ácido cafeico; DMSO – Dimetil sulfoxido (Concentração final < 0,05%); DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium.

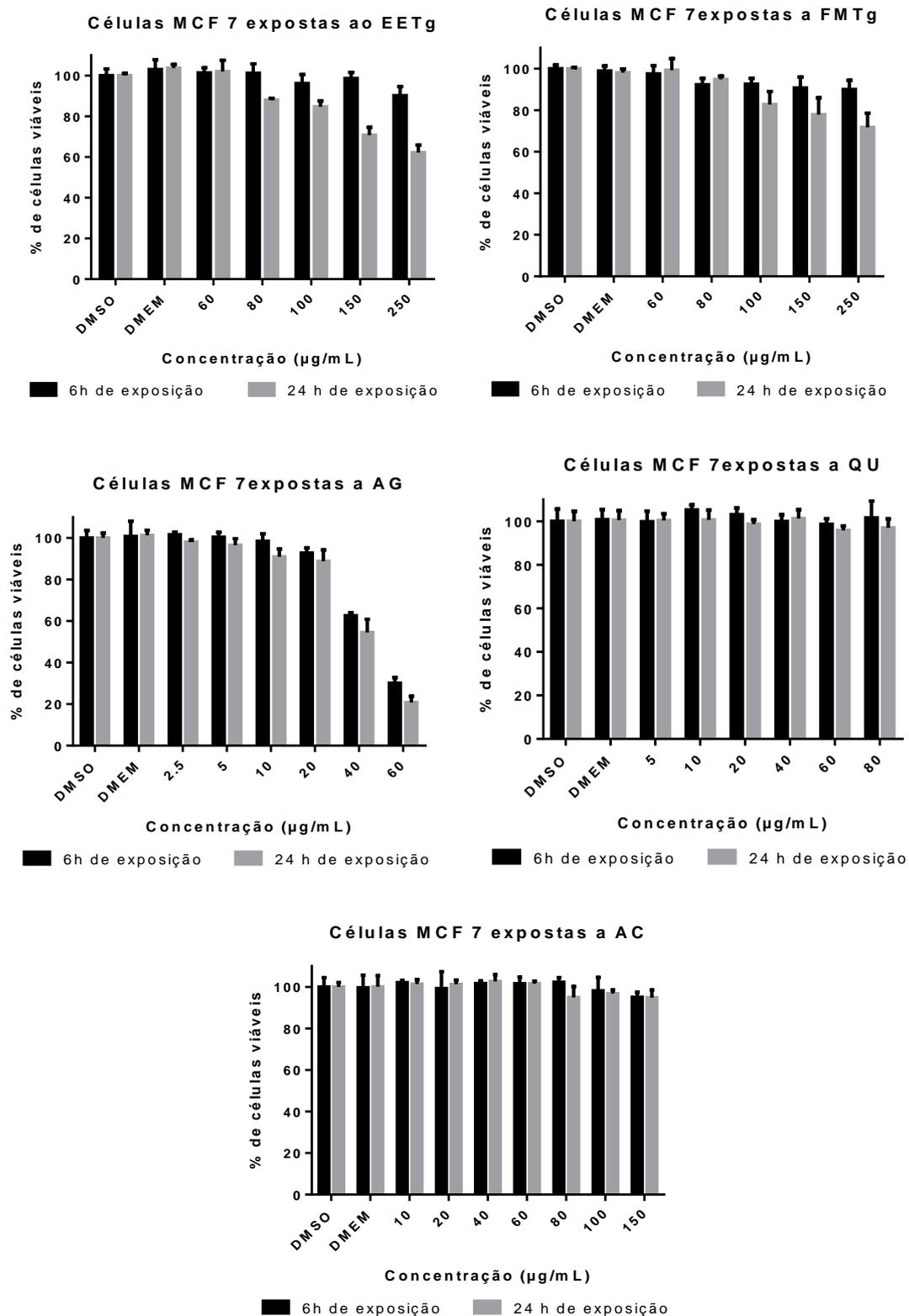


Gráfico 3.4: Viabilidade de células Caco 2 expostas às amostras; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; AG – ácido gálico; QU – quercetina; DMSO – Dimetil sulfóxido (Concentração final < 0,05%); DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium.

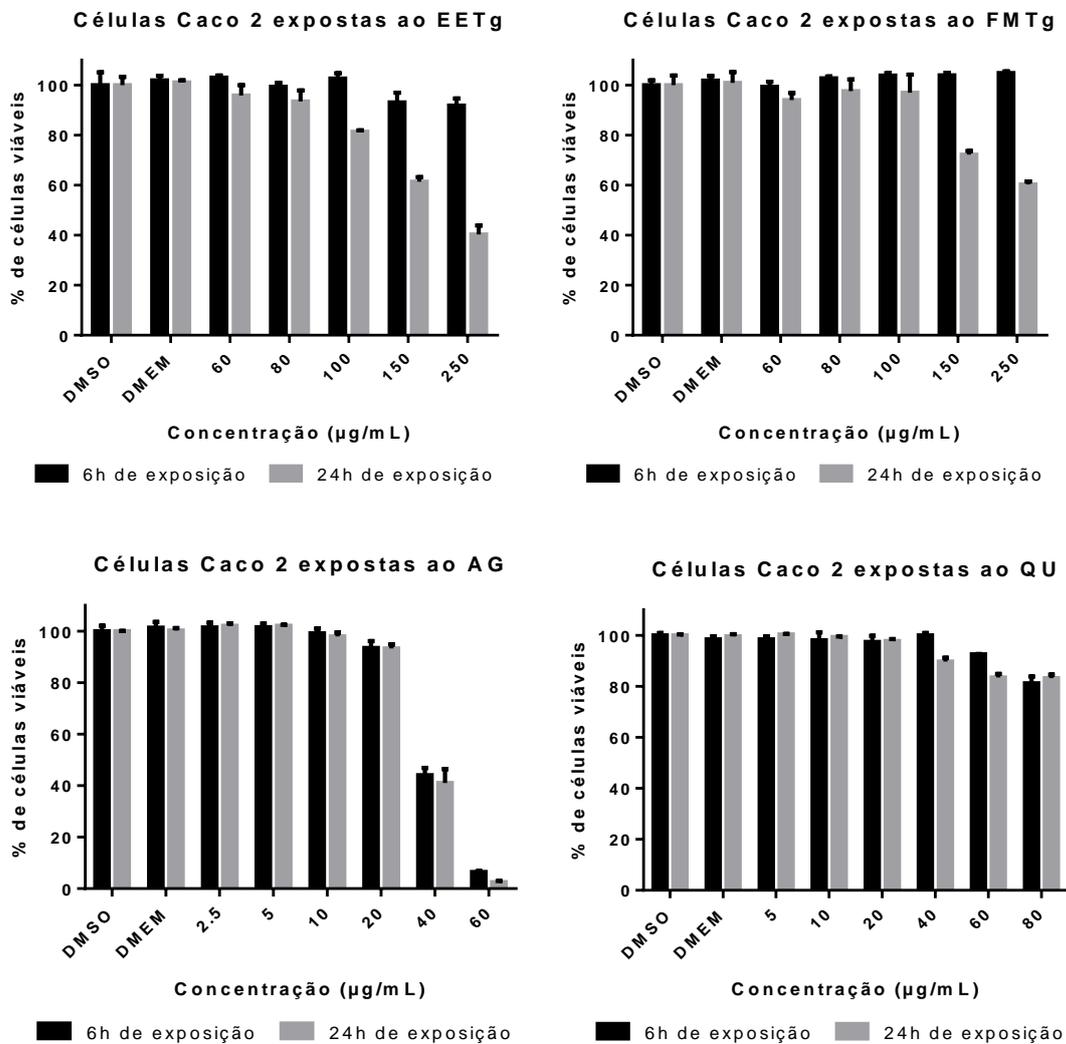
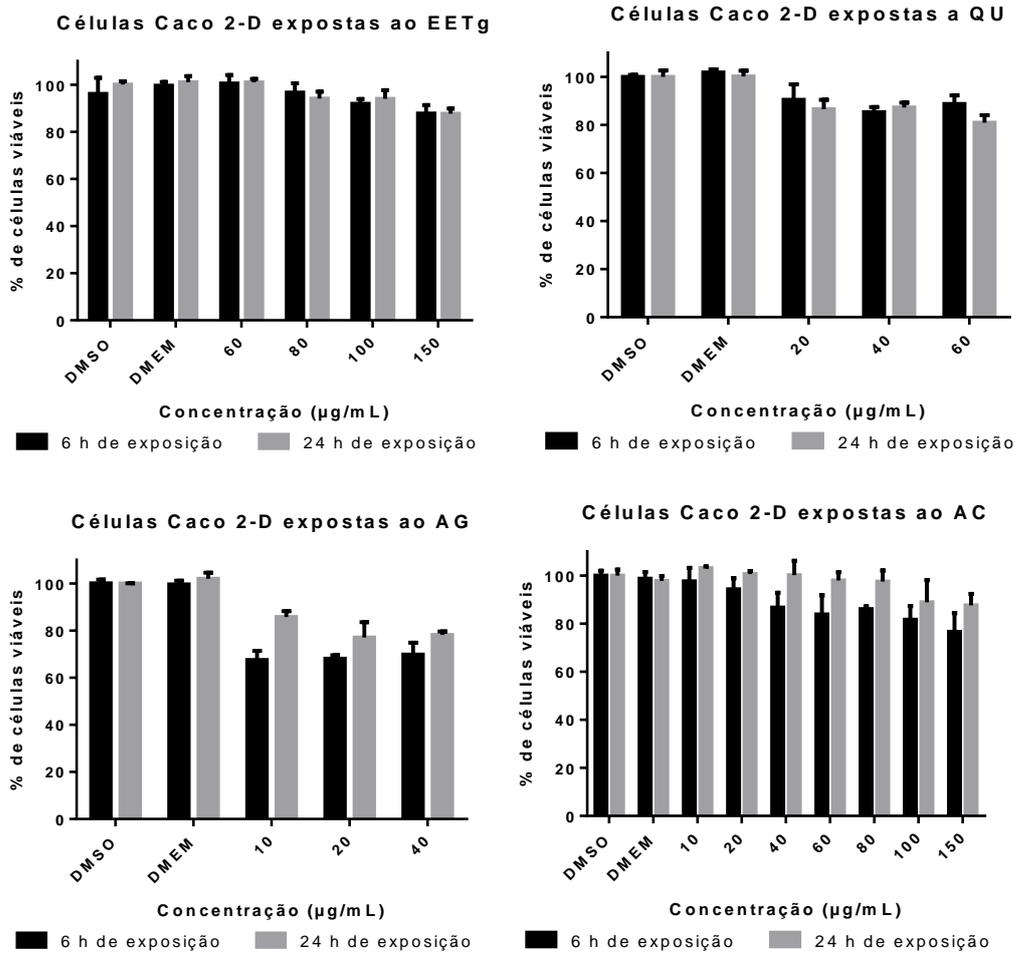


Gráfico 3.5: Viabilidade de células Caco 2 diferenciadas (Caco 2-D), expostas às amostras; EETg – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; FMTg – Fração metanólica de *T. gardneriana*; AG – ácido gálico; AC – ácido cafeico; QU – quercetina; DMSO – Dimetil sulfóxido (Concentração final < 0,05%); DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium.



3.5.6 Purificação do RNA das células MCF 7

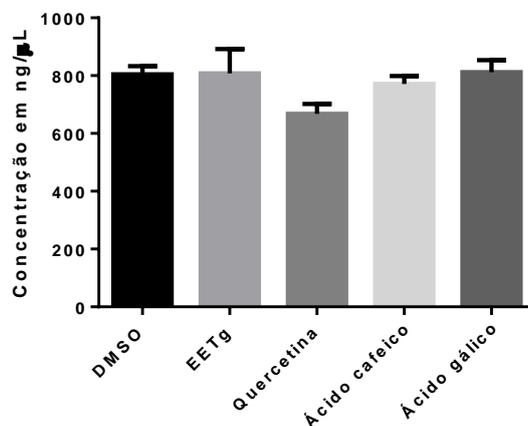
O processo de isolamento de RNA, proveniente de células MCF 7 expostas por 6 h às amostras, conseguiu obter soluções com rendimento médio entre 660 e 900 ng/ μ L (Gráfico 3.6, tabela 3.3). O grau de pureza foi classificado como ótimo para a realização dos microarranjos de DNA, mostrando que o processo de isolamento e purificação foi eficiente (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Concentração e grau de pureza do RNA isolado das células MCF 7 expostas às amostras

Amostra	ng/μL	260/280	260/230	Média \pm DP
Água	-0,01	-0,03	-0,32	-0,12
DMSO	787,33	2,05	2,22	804,59 \pm 28,49
	781,92	2,06	2,23	
	784,83	2,06	2,23	
	844,99	2,03	2,21	
	837,05	2,06	2,24	
Quercetina	791,46	2,09	2,26	667,92 \pm 34,42
	691,81	2,03	2,22	
	683,49	2,03	2,23	
Ácido Cafeico	628,46	2,05	2,22	771,21 \pm 27,16
	752,84	2,12	2,27	
	758,38	2,04	2,22	
EETg	802,41	2,05	2,24	808,14 \pm 34,26
	893,3	2,04	2,23	
	862,73	2,06	2,25	
	763,84	2,05	2,21	
Ácido gálico	712,7	2,05	2,2	811,98 \pm 41,73
	789,41	2	2,19	
	860,14	2,01	2,18	
	786,4	2	2,19	

EETg - Extrato etanólico de *T. gardneriana*; DP - Desvio padrão; DMSO – dimetil sulfóxido

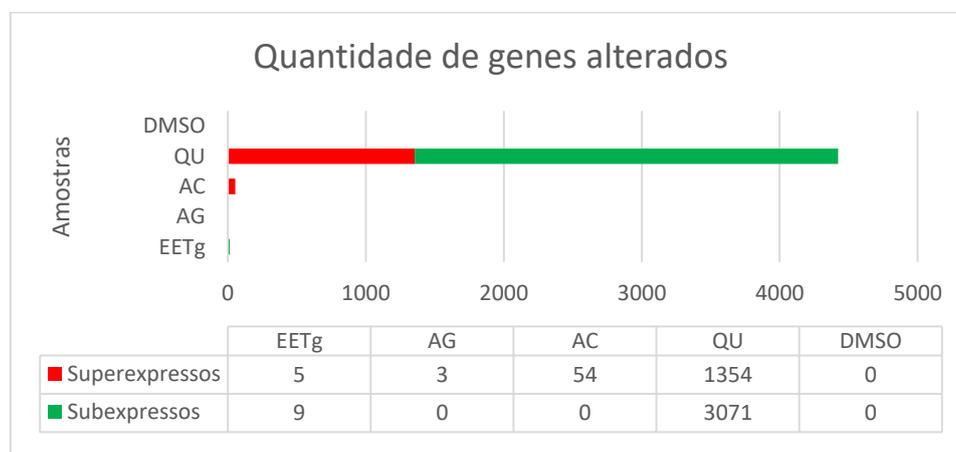
Gráfico 3.6: Rendimento do RNA isolado de células MCF 7 expostas durante 6 h às amostras; EETG – Extrato etanólico de *T. gardneriana*; DMSO – Dimetil sulfóxido.



3.5.7 Alterações na expressão gênica

Foram avaliados um total de 62.893 de genes, após o processo de normalização aplicando-se um filtro para o q-value < 0.05, mostrando que o EETg alterou 14 genes do total. O ácido gálico alterou 3 genes. O ácido cafeico alterou 54 genes. A quercetina foi a substância que induziu o maior número de alterações gênicas, um montante de 4.425 genes. O DMSO não alterou significativamente nenhum gene.

Figura 3.1: Representação gráfica da quantidade de genes alterados por cada amostra. DMSO: dimetil sulfóxido; QU: quercetina; AC: ácido cafeico; AG: ácido gálico; EETg: extrato etanólico de *T. gardneriana*



3.5.8 Mapas de expressão gênica

Os mapas de expressão mostram os genes que foram alterados quando comparados ao controle com DMSO, sendo que os subexpressos aparecem na cor verde e os superexpressos em vermelho. Quanto maior a intensidade da cor, maior é a alteração na expressão do gene em questão. Caso não haja alteração na expressão, a cor apresentada será mais próxima do preto. Devido ao grande número de genes alterados pela quercetina, em relação às outras amostras, os mapas de expressão gênica com todos os compostos apresentavam poucas informações devido à perda de definição, ou seja, fez com que EETg e os outros controles fenólicos como os ácidos gálico e cafeico apresentassem um perfil semelhante ao controle negativo com DMSO (Figura 3.3). Foram construídos mapas de expressão gênica com e sem a quercetina para melhor visualizar o perfil do EETg, ácidos gálico e cafeico (Figura 3.2). Além disso, foram criados mapas de expressão gênica com os genes subexpressos e superexpressos pela quercetina separadamente (Figura 3.4 e 3.5).

Os genes que foram superexpressos encontrados no mapa de expressão gênica sem a quercetina (Figura 3.2) estão relacionados com o metabolismo de drogas, proteção contra o estresse oxidativo, codificação de proteínas do choque térmico e de subunidades da GTPase. O ácido cafeico proporcionou um aumento mais evidente desses genes. Quanto à subexpressão, os genes alterados têm relações com processos de resposta ao vírus, como resposta celular antiviral, degradação do RNA viral, inibição da replicação viral.

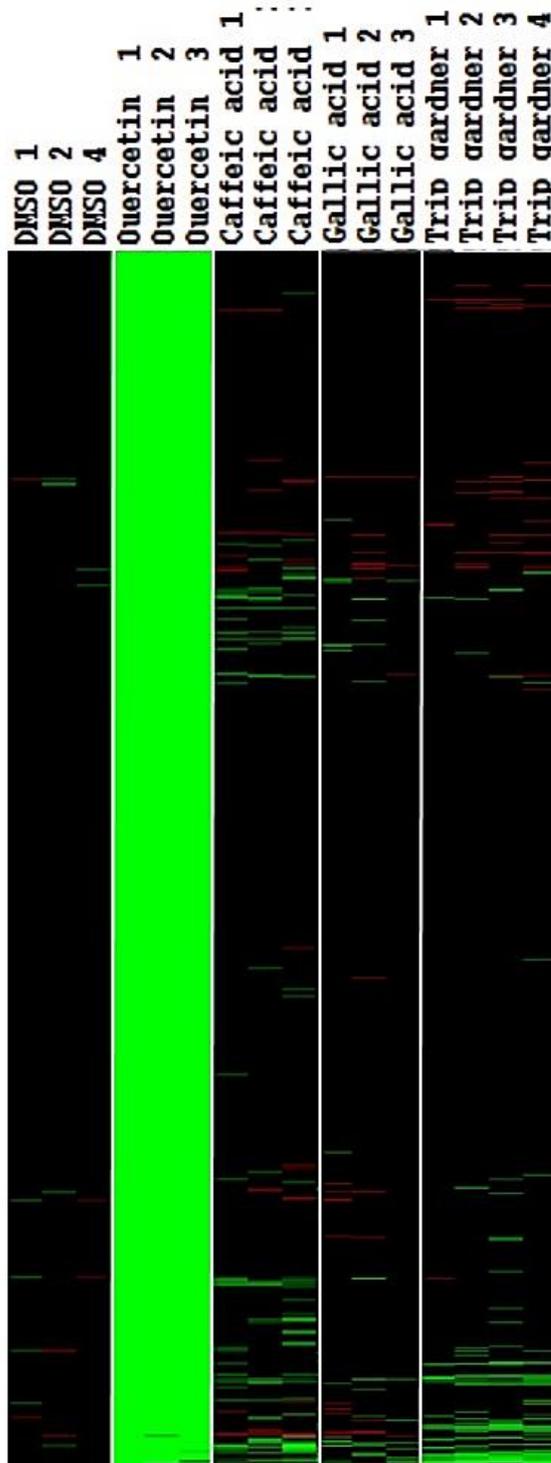
Em relação ao mapa de expressão gênica, incluindo a quercetina, as vias alteradas pelos genes presentes foram relatadas, segundo o encontrado pelo *Consensus* (Figura 3.4), estando os genes relacionados com dois mecanismos principais. O primeiro abrange genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeos como replicação do DNA e RNA, reparação do DNA e sinalização de danos ao DNA. O segundo mecanismo está relacionado à regulação do ciclo celular, como mitose, regulação da divisão, crescimento, diferenciação e senescência celular. Além disso, genes relacionados ao metabolismo do glicogênio, do colesterol e do estrogênio também foram alterados.

Quanto ao mapa de expressão gênica mostrando os genes superexpressos das amostras, incluindo a quercetina (Figura 3.5), os genes estão relacionados com duas vias principais, a primeira via com relações diretas com o câncer, como vias integradas ao

Figura 3.3: Mapa de expressão gênica mostrando a expressão diferenciada de células MCF 7 após 6 H de exposição a todas as amostras; DMSO – dimetil sulfoxido; *caffeic acid* – ácido cafeico; *gallic acid* – ácido gálico; Trip Gardner – Extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; em verde genes subexpressos; em vermelho genes superexpressos; preto, sem alterações na expressão gênica.



Figura 3.4: *Mapa de expressão gênica* mostrando genes de células MCF 7 subexpressos quando expostas por 6 H às amostras; DMSO – dimetil sulfoxido; *caffeic acid* – ácido cafeico; *gallic acid* – ácido gálico; Trip Gardner – Extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; em verde genes subexpressos; em vermelho genes superexpressos; preto quando não há alteração na expressão gênica.



Genes subexpressos:

A) metabolismo de nucleotídeos

- Iniciação da replicação do DNA;
- Transcrição da RNA polimerase;
- Sinalização de danos ao DNA;
- Reparação do DNA;

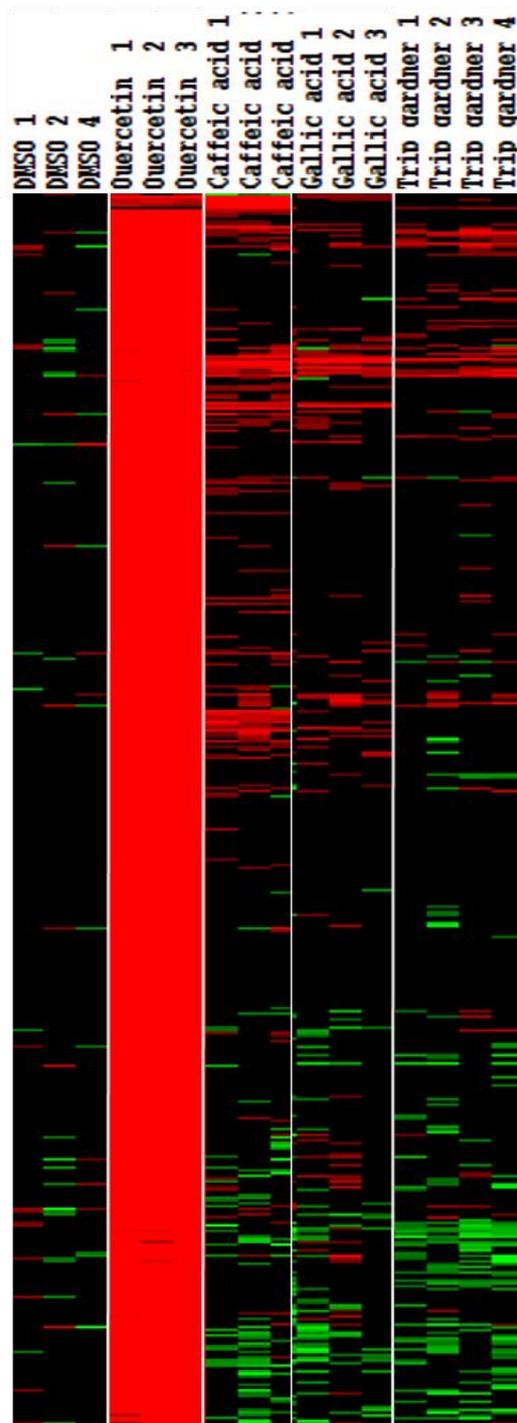
B) Ciclo celular

- Mitose;
- Senescência celular;
- Regulação de proteínas envolvidas na fase G;
- Divisão e crescimento celular;
- Diferenciação celular;

C) Outros mecanismos

- Metabolismo do glicogênio;
- Metabolismo do estrogênio;
- Metabolismo do colesterol;

Figura 3.5: Mapa de expressão gênica mostrando genes de células MCF 7 superexpressos quando expostas às amostras; DMSO – dimetil sulfóxido; *caffeic acid* – ácido cafeico; *gallic acid* – ácido gálico; Trip Gardner – Extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; em verde genes subexpressos; em vermelho genes superexpressos; pret, sem alteração na expressão gênica.



Genes subexpressos:

A) Câncer

- Vias integradas ao câncer;
- Apoptose relacionada ao câncer de ovário;
- Câncer de bexiga;
- Senescência induzida por oncogênese;

B) Estresse

- Resposta celular ao estresse;
- Estresse oxidativo;
- Apoptose;

C) Outros mecanismos

- Metabolismo de fármacos;
- Ritmo circadiano;
- Adipogêneses;
- Receptores de vitamina D;

3.5.10 Vias metabólicas diferencialmente expressas

Utilizando filtro para selecionar apenas os genes que tiveram sua expressão aumentada ou reduzida em pelo menos, uma vez e meia em relação ao controle, e um segundo filtro para identificar apenas as vias mais alteradas pôde-se observar que o EETg não proporcionou superexpressão de nenhum gene, o ácido cafeico e o ácido gálico não causaram subexpressão de nenhum gene, enquanto a quercetina proporcionou tanto subquanto superexpressão de genes. O número de vias alteradas não apresentou relação direta com o número de genes alterados (Tabela 3.4).

A rede de interações gerada pelo *Consensus*, entre as vias bioquímicas reguladas por genes que foram subexpressos pelo EETg e quercetina, e superexpressos pelo ácido gálico, ácido cafeico e quercetina, em células de adenocarcinoma de mama – MCF 7, após 6 h de exposição, está disposta nas figuras 3,6 a 3,10.

O EETg subexpressou 8 genes e alterou, significativamente, sete vias metabólicas ($p < 0,05$), todas relacionadas com vírus, incluindo mecanismo antiviral, mecanismo antiviral induzida por interferon, sarampo, Hepatite C e influenza. Só foram analisados dois genes para o ácido gálico, o CYP1A1 e CYP1B1. No entanto, esses são dois genes chave que participam de vias diferentes, incluindo vias do metabolismo do triptofano, lipídios, ácido araquidônico e esteroides. O ácido cafeico superexpressou 24 genes que participam vias semelhantes às encontradas para o ácido gálico: vias do estrogênio, metabolismo do triptofano, lipídios, ácido araquidônico, leucotrienos e esteroides. A quercetina superexpressou 734 genes envolvidos e subexpressou 2.307 genes envolvidos em principalmente em vias de divisão e proliferação celular.

Os genes das vias que foram mais alteradas para cada amostra foram avaliados em dois bancos de dados: o National Center for Biotechnology Information – NCBI e o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – KEGG. As informações constam no Apêndice I, e mostra o nome completo para cada gene, os sinônimos, em quais amostras ele foi alterado, uma descrição de sua função e as vias com as quais cada gene interage.

Figura 3.6: Rede de interações gerada pelo *Consensus*, entre as vias bioquímicas reguladas por genes que foram subexpressos pelo extrato etanólico de *Triplaris gardneriana* em células de adenocarcinoma de mama - MCF -7, após 6 h de exposição.

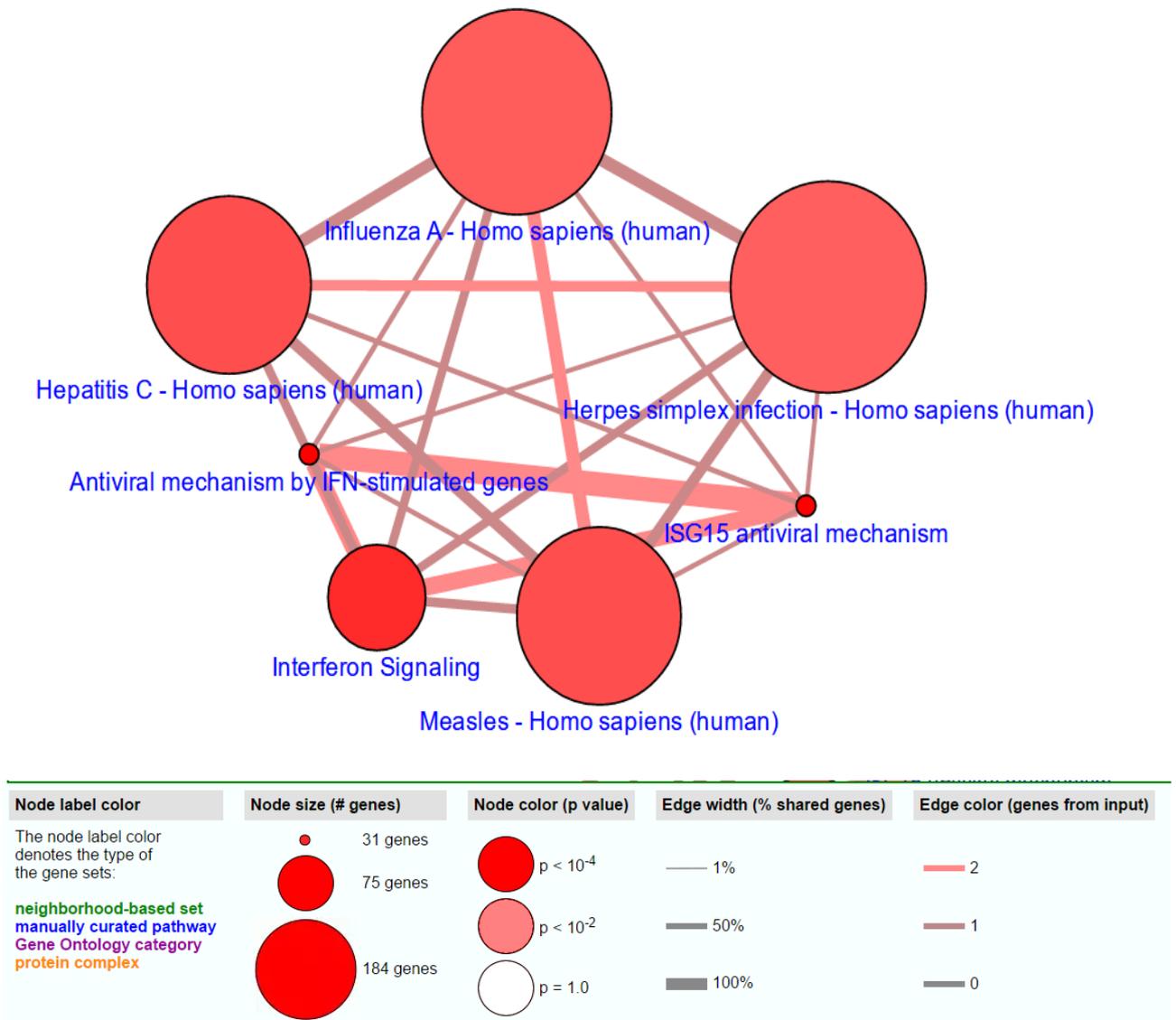


Figura 3.7: Rede de interações gerada pelo *Consensus*, das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram superexpressos pelo ácido gálico em células de adenocarcinoma de mama – MCF- 7, após 6 h de exposição.

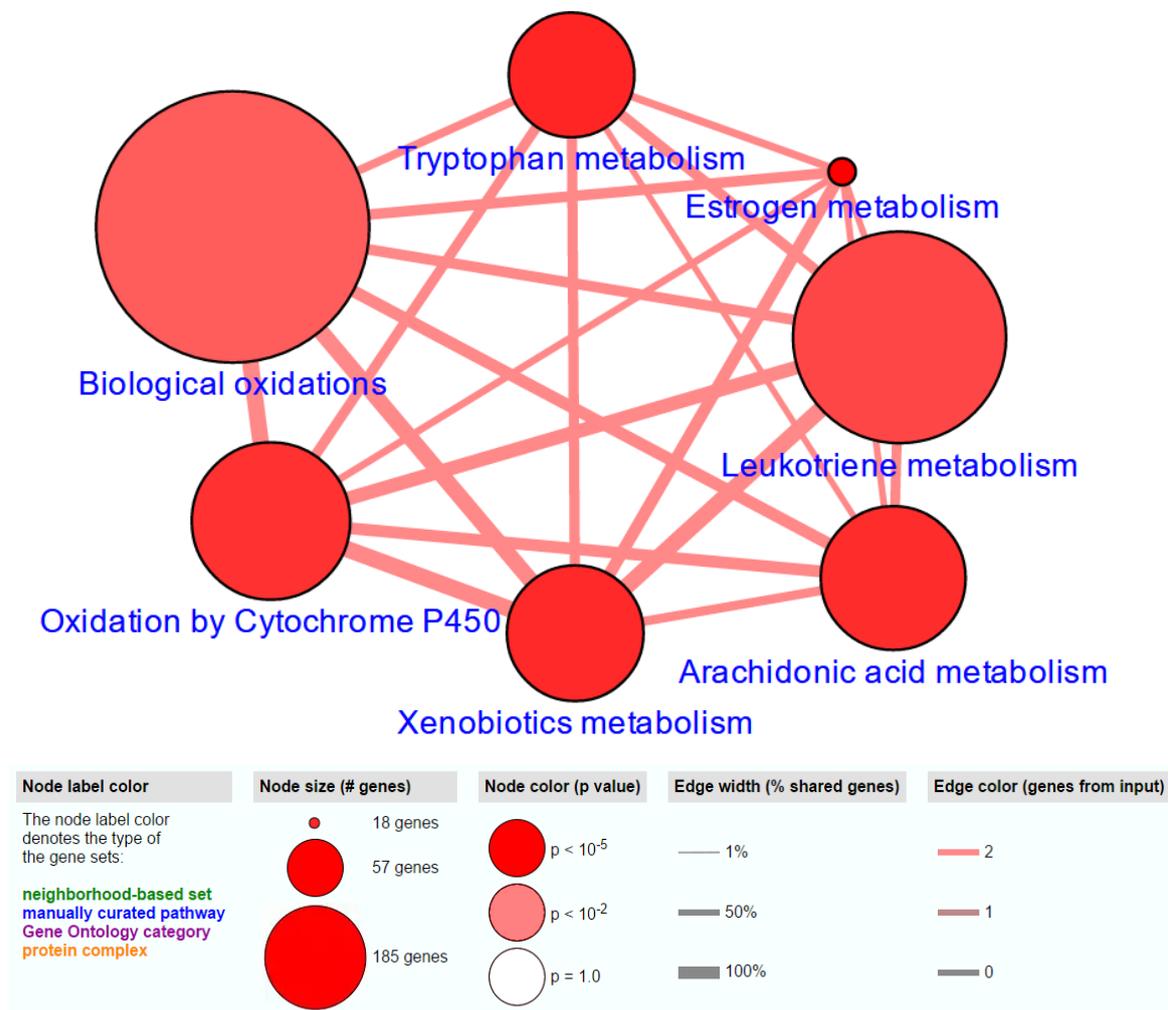
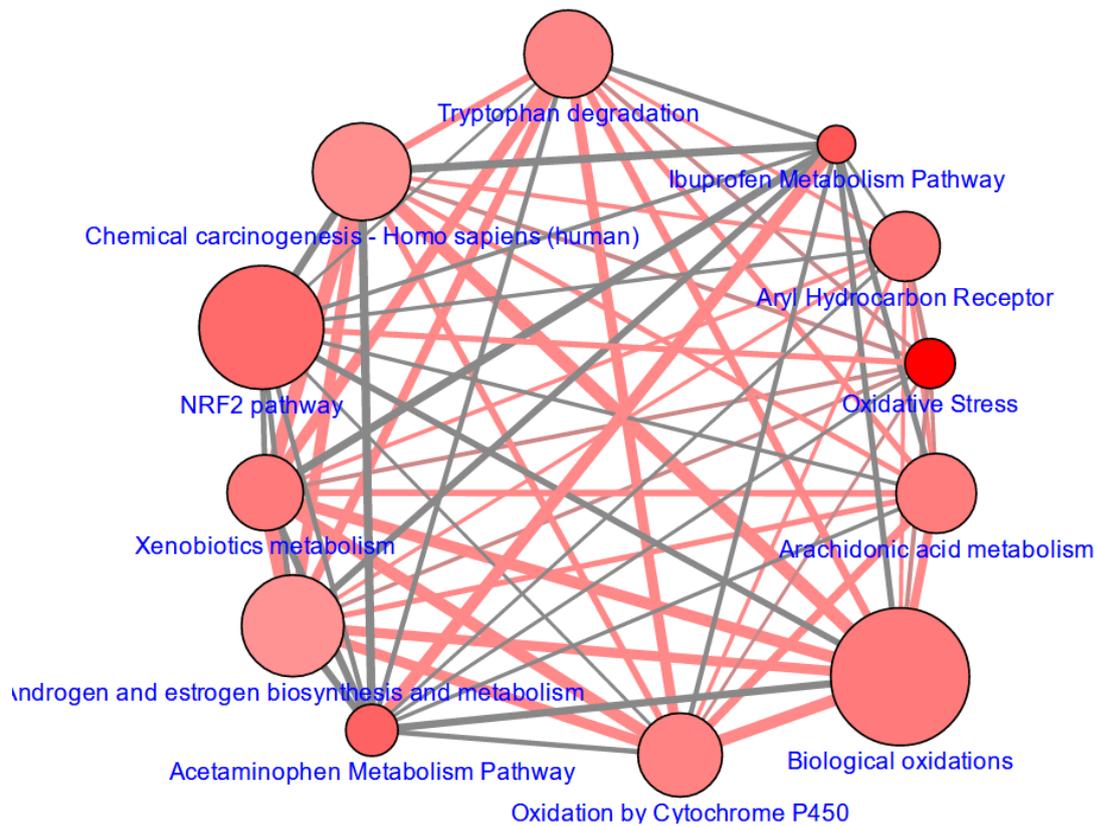


Figura 3.8: Rede de interações gerada pelo *Consensus*, das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram superexpressos pelo ácido cafeico, em células de adenocarcinoma de mama – MCF- 7, após 6 h de exposição.



Node label color	Node size (# genes)	Node color (p value)	Edge width (% shared genes)	Edge color (genes from input)
The node label color denotes the type of the gene sets:	● 16 genes	● $p < 10^{-4}$	— 1%	— 2
neighborhood-based set	● 104 genes	● $p < 10^{-2}$	— 50%	— 1
manually curated pathway	● 687 genes	○ $p = 1.0$	— 100%	— 0
Gene Ontology category				
protein complex				

Figura 3.9: Rede de interações gerada pelo *Consensus*, das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram subexpressos pela quercetina, em células de adenocarcinoma de mama – MCF- 7, após 6 h de exposição.

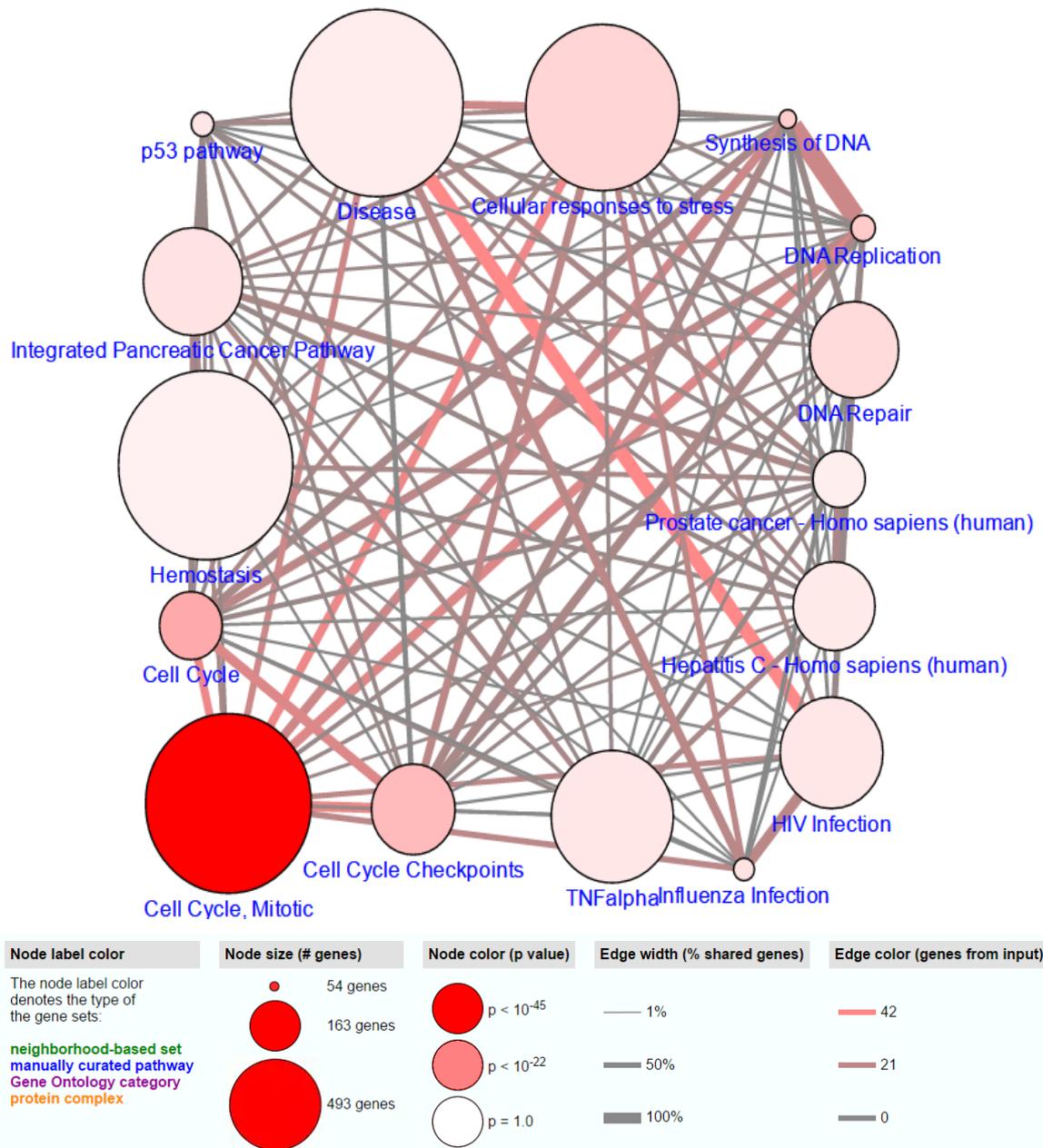
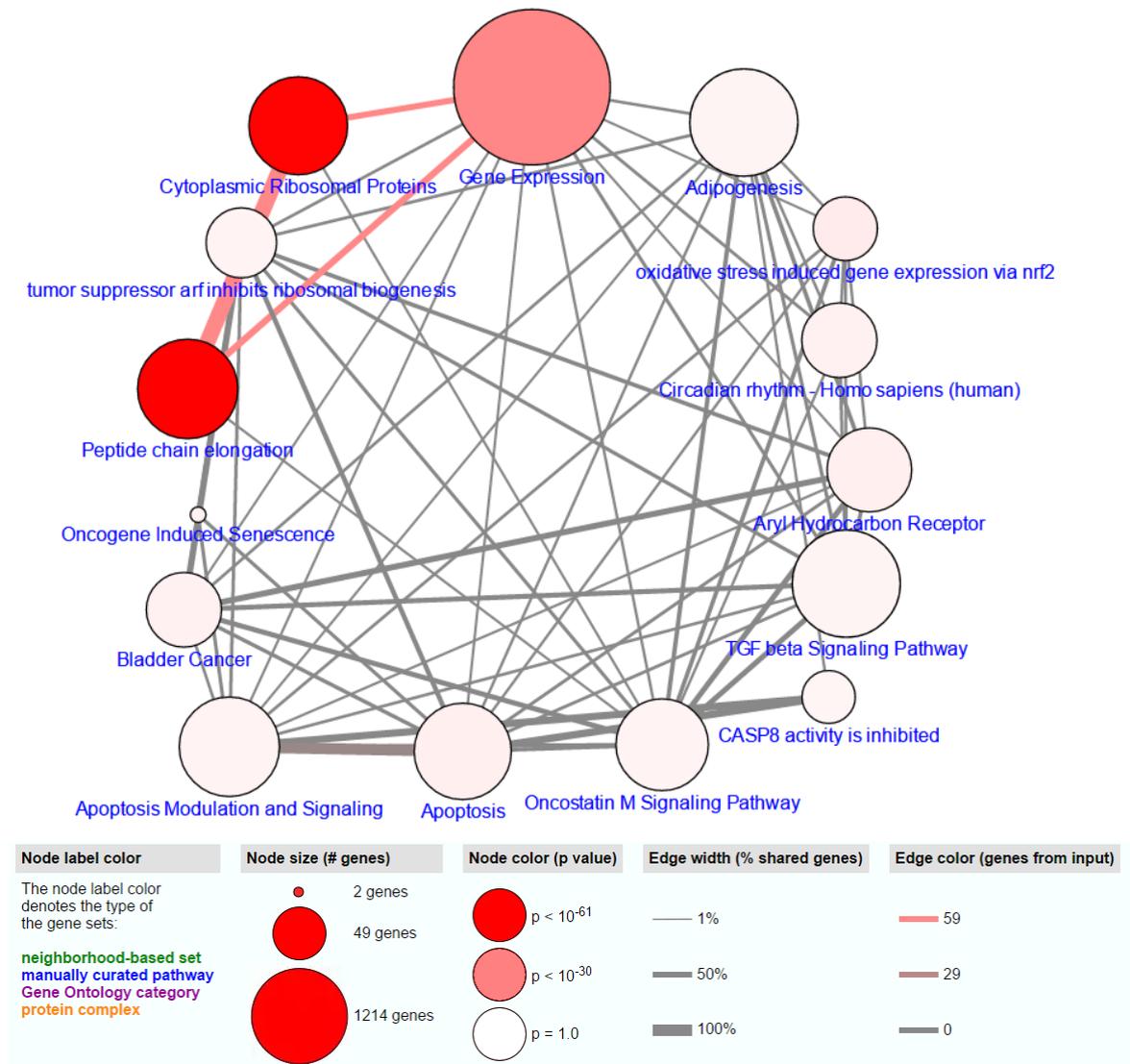


Figura 3.10: Rede de interações gerada pelo *Consensus*, das principais vias bioquímicas reguladas por genes que foram superexpressos pela quercetina, em células de adenocarcinoma de mama – MCF-7, após 6 h de exposição.



3.5.9 Funções biológicas alteradas e riscos apresentados pelos tratamentos

Foi aplicado um filtro, aos dados normalizados de cada amostra, para selecionar apenas os genes que tiveram sua expressão aumentada ou reduzida em pelo menos uma vez e meia em relação ao controle DMSO. Assim, o EETg não proporcionou superexpressão de nenhum gene. Da mesma forma, os ácidos cafeico e gálico não proporcionaram subexpressão em nenhum gene, enquanto a quercetina levou a alterações gênicas por sub- e superexpressão.

Foram organizadas tabelas com base nas informações geradas pelo software Ingenuity, a partir da análise dos dados de NGS normalizados referentes às células de adenocarcinoma de mama MCF 7, quando expostas por 6 h a cada amostra (tabelas 3.4 e 3.5). Essas tabelas mostram as doenças relacionadas com os genes alterados por cada amostra, bem como o potencial toxicológico que cada uma pode acarretar.

Tabela 3.4: Informações sobre doenças que podem estar relacionadas aos genes alterados pelas amostras. Dados gerados através do Ingenuity (Qiagen®), a partir da análise dos dados de NGS referentes às células de adenocarcinoma de mama (MCF- 7) quando expostas por 6 h às amostras.

Doenças / funções biológicas relacionadas aos genes alterados pelas amostras				
EETg subexpressos	Ácido gálico superexpressos	Ácido cafeico superexpressos	Quercetina superexpressos	Quercetina subexpressos
Doenças imunológicas	Transtorno generalizado do desenvolvimento	Transtorno generalizado do desenvolvimento	Câncer	Câncer
Doenças inflamatórias	Desordens do sistema endócrino	Desordens do sistema endócrino	Lesões e anormalidades do organismo	Lesões e anormalidades do organismo
Doenças neurológicas	Desordens hereditárias	Desordens hereditárias	Morfologia tumoral	Doenças gastrointestinais
Desordens musculares e esqueléticas	Lesões e anormalidades do organismo	Lesões e anormalidades do organismo	Doenças neurológicas	Doenças do sistema hepático
Resposta antimicrobiana	Doenças do sistema reprodutor	Doenças do sistema reprodutivo	Desordens musculares e esqueléticas	Doenças do sistema reprodutivo

Tabela 3.5: Informações sobre o potencial toxicológico que pode estar relacionado aos genes alterados pelas amostras. Dados gerados através do Ingenuity (Qiagen®), a partir da análise dos dados de NGS de células de adenocarcinoma de mama (MCF -7) quando expostas por 6 h às amostras.

Potencial toxicológico				
EETg subexpressos	Ácido gálico superexpressos	Ácido cafeico superexpressos	Quercetina superexpressos	Quercetina subexpressos
Hepatotoxicidade	Aumento no nível do hematócritos	Cardio e hepatotoxicidade	Aumento nos níveis de AST	Redução dos níveis de albumina
Hiperplasia/ Hiperploriferação do fígado	Hiperplasia/ Hiperploriferação do fígado	Nefrotoxicidade	Aumento nos níveis de LDH	Aumento nos níveis de células vermelhas
	Hipertrofia do fígado	Aumento no nível do hematócritos	Aumento nos níveis de hematócritos	Aumento nos níveis de hematócrito
	Hepatomegalia do fígado	Aumento nos níveis de LDH 1	Aumento nos níveis de células vermelhas	Aumento nos níveis de bilirrubina
	Falência renal	Aumento no nível de células vermelhas no sangue	Aumento nos níveis de albumina	Aumento nos níveis de ALT

3.5.11 Análises comparativa entre a assinatura de expressão gênica das amostras e aquelas de drogas conhecidas.

Após aplicação do filtro de significância, apenas o EETg e a quercetina apresentaram perfil de expressão gênica com genes sub- e superexpressos o que é pré-requisito para a análise do mapa conectivo. O perfil foi comparado com aqueles de 6.091 drogas, em três linhagens de células diferentes: MCF 7 HL60 e PC3. Os perfis foram ranqueados de acordo com uma pontuação, sendo o atribuído pontuação “1” para o mais parecido possível e “-1” para o mais distinto possível.

Os dez perfis mais semelhantes (10 primeiros), e os dez perfis mais distintos (10 últimos), além de informações sobre a função das drogas, concentrações testadas e as linhagens celulares das quais foram obtidos os perfis gênicos estão listados nas tabelas 3.6 para o EETG e 3.7 para a Quercetina.

Tabela 3.6: Mapa conectivo do perfil de expressão gênica do extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*

Ranque	Nome	Função	Dose	Linhagem celular	Pontuação*
10 Mais semelhantes					
1	NU-1025	Inibidor da polimerase	100 μ M	MCF7	1
2	Fensuximida	Anticonvulsante	21 μ M	HL60	0,971
3	Brometo de pancurônio	Relaxante muscular	5 μ M	MCF7	0,952
4, 8, 18	Tiostreptona	Antibiótico	2 μ M	PC3	0,933
5	Ciclosporina	Imunossupressor	3 μ M	MCF7	0,928
6	Sertaconazol	Antifúngico	8 μ M	HL60	0,918
7	Securinina	Estimulante do sistema nervoso central	18 μ M	PC3	0,908
8	Tiostreptona	Antibiótico	2 μ M	MCF7	0,903
9	Nocodazol	Antineoplásico	13 μ M	PC3	0,899
10	Fenoxibenzamina	Bloqueador alfa adrenérgico	12 μ M	PC3	0,892
10 Mais distintos					
6100	Suloctidil	Vasodilatador	12 μ M	HL60	-1
6099	LY-294002	Atividade antiviral	10 μ M	MCF7	-0,979
6098	Betazol	Agonista do receptor H2 da histamina.	27 μ M	HL60	-0,977
6097	Etoposideo	Inibidor da topoisomerase	7 μ M	HL60	-0,931
6096	(-) - Isoprenalina	Ativador dos receptores adrenérgicos	16 μ M	HL60	-0,929
6095	Mifepristona	Análogo de prostaglandina	9 μ M	MCF7	-0,918
6094	Oxedrina	Anti-hipertensivo	24 μ M	HL60	-0,897
6093	Sirolimus	Imunossupressor	100 nM	MCF7	-0,88
6092	Vortmanina	Atividade antiviral	10 nM	PC3	-0,856
6091	Tioridazina	Antipsicótico	10 μ M	HL60	-0,846

Pontuação*: Quanto mais próximo de “1”, mais semelhante será a assinatura gênica da droga com a assinatura gênica do EETG, e quanto mais próximo de “-1” mais distinta será a assinatura gênica da droga em relação a assinatura gênica do EETG.

Tabela 3.7: Mapa conectivo do perfil de expressão gênica da quercetina

Ranque	Nome	Função	Dose	Linhagem celular	Pontuação*
10 Mais semelhantes					
1, 15	Luteolina	Anticarcinogênico	14 μ M	MCF7	1
2	0175029-0000	-	1 μ M	MCF7	0,986
3, 42	Quercetina	Antiinflamatória, anticarcinogênica, antiviral e antioxidante	12 μ M	MCF7	0,965
4, 8	0179445-0000	-	10 μ M	MCF7	0,936
5, 6	Tioguanina	Anticarcinogênico (leucemia)	13 μ M	MCF7	0,936
7, 9, 10	Fenoxibenzamina	Bloqueador alfadrenérgico	12 μ M	MCF7	0,916
11	Colforsina	Vaso dilatador	50 μ M	MCF7	0,869
12, 20, 21	Irinotecan	Anticarcinogênico	100 μ M	MCF7	0,861
13	Harmina	Anticarcinogênico	16 μ M	MCF7	0,853
14	Crisina	Inibi a converção de testosterona em estrogênio	16 μ M	MCF7	0,848
10 Mais distintos					
6100	Vinburnina	Vasodilatador	14 μ M	MCF7	-1
6099	Prestwick-1103	-	20 μ M	HL60	-0,988
6098, 6084, 6055	Fulvestrant	Tratamento hormonal de mulheres pós-menopáusicas	10 nM	MCF7	-0,982
6097	Cinchonina	-	14 μ M	HL60	-0,946
6096	Bemegríde	Estimulante do sistema nervoso central	26 μ M	MCF7	-0,918
6095	α -ergocriptina	-	7 μ M	PC3	-0,913
6094	Cloreto de metilbenzetônio	Anti séptico	9 μ M	HL60	-0,911
6093	Netilmicina	Antibiótico	3 μ M	HL60	-0,906
6092	Lansoprazol	Inibidor da bomba de prótons	11 μ M	HL60	-0,904
6091	Acebutolol	Anti hipertensivo	11 μ M	MCF7	-0,89

Pontuação*: Quanto mais próximo de “1”, mais semelhante será a assinatura gênica da droga com a assinatura gênica da quercetina e quanto mais próximo de “-1” mais distinta será a assinatura gênica da droga em relação a assinatura gênica da quercetina.

3.5.12 Toxicidade aguda

Para todos os grupos não foi observada nenhuma alteração para os parâmetros monitorados, como alterações na pele e pêlos, olhos e mucosa, alterações na respiração, na circulação, no sistema nervoso central e autônomo, na atividade somatomotora e no comportamento. A curva de ganho de peso mostrou que todas as amostras apresentaram o mesmo perfil (Gráfico 3.7).

Segundo a análise de variância não houve diferença significativa entre a porcentagem de ganho de peso médio de cada grupo, o que considera os três grupos estatisticamente semelhantes (Tabela 3.8)

Gráfico 3.7: Ganho de peso médio, em gramas, para cada grupo durante o período de análise; EETG - extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; veículo contém a mesma concentração de etanol utilizada para dissolver as amostras.

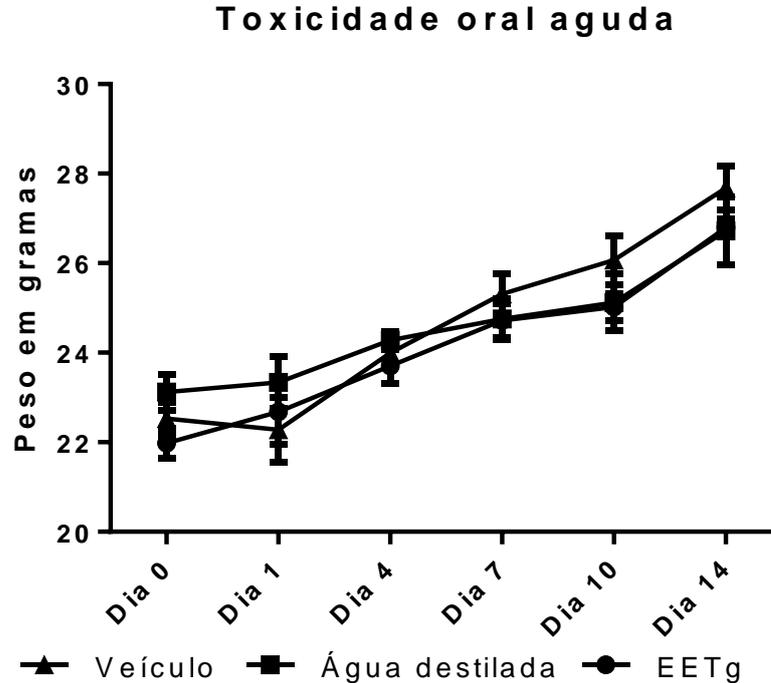


Tabela 3.8: Média do peso dos camundongos para cada grupo e em cada dia de avaliação.

Dia	Peso em gramas para cada tratamento					
	EETg	CV	Água	CV	Veículo	CV
0	21,98 ± 0,68	3,13	23,12 ± 0,80	3,46	22,52 ± 0,73	3,25
1	22,68 ± 1,42	6,3	23,34 ± 1,15	4,95	22,28 ± 1,44	6,46
4	23,70 ± 0,76	3,2	24,28 ± 0,37	1,56	23,99 ± 0,61	2,54
7	24,72 ± 0,75	3,02	24,75 ± 0,90	3,66	25,31 ± 0,88	3,47
10	25,02 ± 0,62	2,48	25,12 ± 1,26	5,03	26,07 ± 1,10	4,22
14	26,60 ± 0,09	0,33	26,72 ± 1,53	5,75	27,68 ± 0,96	3,48
Ganho de peso (%)	21,12 ± 3,4a	16,1	19,42 ± 1,77a	9,13	22,93 ± 3,97a	17,34

CV - Coeficiente de variância dado em porcentagem; EETg - Extrato etanólico de *Triplaris gardneriana*; valores seguidos pela mesma letra são estatisticamente semelhantes segundo a análise de variância ANOVA.

3.6 Discussão

A atividade hemolítica de extratos de origem vegetal apresenta, em geral, uma resposta do tipo dose-dependente, onde o grau de hemólise é dependente da concentração, e esse comportamento está geralmente associado à presença de saponinas, que são surfactantes e, por isso, conseguem desestabilizar a membrana das hemácias formando poros (BAUMANN *et al.*, 2000; VOUTQUENNE *et al.*, 2002). O EETG e o controle ácido gálico apresentaram um perfil bem específico e, não usual, que se repetiu em todos os tipos sanguíneos utilizados para análise, onde nas concentrações mais baixas, houve um progressivo aumento da capacidade hemolítica até que em determinada concentração, geralmente 62 µg/mL, a capacidade hemolítica decaía até chegar novamente a zero nas concentrações mais altas definindo uma trajetória em sino.

Este tipo de trajetória pode ser classificado como curva não monotônica e é comumente encontrada para substâncias químicas que exercem seus efeitos tóxicos primários via modificação de respostas hormonais (desreguladores endócrinos). Esse evento contradiz o conceito tradicional da toxicologia “dose-resposta” que indica que o efeito de um composto apenas se acentua com o aumento da concentração e ignora a ideia de que alguns compostos podem apresentar funções biológicas diferentes dependendo da concentração, e por vezes, essas atividades podem até mesmo ser antagônicas

Mecanismos específicos celulares/moleculares podem explicar as curvas dose-resposta não monotônicas como, por exemplo, a superexpressão de vários receptores em baixas concentrações, com subexpressão dos mesmos receptores em altas concentrações.

Uma segunda teoria, plausível para o extrato, é a integração de duas ou mais curvas dose-resposta monotônicas que ocorrem através de diferentes vias moleculares/celulares, onde o ponto final máximo de uma atividade coincide, mais ou menos, com o ponto inicial de outra atividade, mas de efeitos opostos. Em outras palavras, a partir de uma determinada concentração, algum composto que é capaz de impedir a atividade hemolítica consegue exercer sua função e, gradativamente, reduz o quadro geral de hemólise.

Outra explicação para as curvas dose-respostas não monotônicas é que simplesmente não entendemos toda a variedade de vias moleculares interconectadas que trabalham no intuito de produzir uma resposta observável, principalmente em uma mistura tão complexa de compostos (VANDENBERG *et al.*, 2009).

Os resultados para a análise de toxicidade, utilizando *Artemia* sp. e as linhagens MCF 7 e Caco 2 mostraram um padrão monotônico típico dose-dependente indicando ou que a faixa de concentrações utilizadas para estes ensaios foi pequena para possibilitar um comportamento não monotônico ou que esse comportamento não monotônico apresenta algum grau de especificidade frente as hemácias e conseqüentemente pôde ser identificado no ensaio de atividade hemolítica.

O ensaio da toxicidade frente a náuplios de *Artemia* sp mostra que o extrato e as frações, em uma ampla faixa de concentrações, possuem baixa toxicidade. Sahreen e colaboradores (2015) investigaram a citotoxicidade de *Rumex hastatus* D., também pertencente à família Polygonaceae, utilizando o modelo de *Artemia* e encontraram valores similares no extrato e frações, variando entre 60 a 1.000 µg/mL. Além de ser utilizado para investigar a ecotoxicidade, esse modelo também é usado para prever efeitos citotóxicos, e, de fato, nas duas linhagens celulares testadas a citotoxicidade foi muitas vezes inferior àquela do controle positivo.

Sobre a citotoxicidade nas duas linhagens de câncer, algumas características das amostras impediram a análise de uma faixa maior de concentrações, e, conseqüentemente, o efeito tóxico de doses maiores. O EETg em concentrações maiores do que 250 µg/mL precipitava o meio de cultura, provavelmente devido a habilidade dos flavonoides constituintes em formar complexos com as proteínas do meio de cultura. O mesmo efeito, de precipitação, foi observado para a quercetina, em concentrações maiores do que 80 µg/mL, este composto foi utilizado como controle, e foi identificado no EETg, via HPLC, como o flavonoide de maior concentração. Já os ácidos gálico e cafeico, por suas características intrínsecas, diminuam o pH do meio em concentrações maiores do que 60 e 150 µg/mL, respectivamente, de forma que não seria possível saber se a ação citotóxica, se ocorresse, era induzida pelos compostos ou causada pela alteração no pH.

Olaru e colaboradores (2015) realizaram um trabalho semelhante, analisando a toxicidade de sete espécies de *Fallopia* sp., também pertencentes à família Polygonaceae, utilizando o método de *Artemia* e empregando células MCF 7 e Caco 2. Para o ensaio de *Artemia*, essas espécies mostraram uma toxicidade menor do que a encontrada para o EETg e frações, com CL₅₀ variando entre 1.800 e 2.700 µg/mL, e para o ensaio com as duas linhagens celulares a toxicidade foi maior, chegando a inviabilizar 80% das células nas concentrações mais altas de 500 µg/mL, mas o perfil comportamental dose-dependente foi o mesmo.

Em relação às análises dos dados gerados pela genômica com o extrato etanólico e seus constituintes majoritários, a porcentagem de genes alterados em relação ao total foi bastante reduzida. O EETg alterou 14 genes, o que representa 0,022% do total, o ácido gálico alterou apenas 3 genes (0,004% do total), o ácido cafeico alterou 54 genes (0,085% do total) e a quercetina 4.425 genes, representando 7,035%.

A análise do *Consensus* para definir as vias metabólicas que foram significativamente alteradas nas células tratadas com as amostras mostrou que o EETg subexpressou genes que estão relacionados a vias de resposta antiviral e seria capaz, em teoria, de deixar as células mais susceptíveis a uma infecção viral, reduzindo sua capacidade de resposta. Os genes que apareceram nas vias mais alteradas pelo EETg foram o IFIT1, MX1 e o OAS1. Artigos relacionados aos três genes e às descrições de suas funções nas plataformas NCBI e KEGG confirmam a relação destes com a resposta aos vírus (Apêndice I). No entanto, a maioria dos trabalhos descreve como um aumento da expressão desses genes deixa as células mais resistentes aos vírus (SAIKIA; FENSTERL; SEN, 2010), mas não relatam a possibilidade do efeito contrário. A rede de conexão gerada pelo *Consensus*, a partir dos genes subexpressos alterados pelo EETg (Figura 3.6), mostra, de forma mais clara, as vias de resposta viral e como estas vias interagem entre si. Todos os genes que foram subexpressos pelo EETg, e que estão envolvidos nessas vias de resposta viral, também foram subexpressos pela quercetina que é o flavonoide de maior concentração no EETg (Capítulo II, Tabela 2.3), devido a isso as mesmas vias tiveram uma redução na expressão dos genes que as regulam, podendo haver uma correlação entre a presença da quercetina no EETG e a sua capacidade de regular esses genes.

Os ácidos gálico e cafeico ativaram vias que estão relacionadas com o metabolismo de drogas e outros xebobióticos, metabolismo do ácido araquidônico, oxidação pelo citocromo P450, além de ativar vias de resposta ao estresse oxidativo (Figura 3.7 e 3.8), que pode ser um dos mecanismos de ação dessas amostras que possuem atividade antioxidante comprovada, como apresentado no capítulo II. O ácido cafeico já foi apontado como sendo capaz de induzir a senescência e de inibir o ciclo celular de células de câncer cervical, além de efeito inibitório sobre a Hepatite C, efeito também encontrado para o ácido gálico (DONG *et al.*, 2011; HSU *et al.*, 2013; TANIDA *et al.*, 2015; GOVEA-SALAS *et al.*, 2016).

A quercetina parece alterar, seletivamente, genes e vias de resposta contra células cancerígenas (Figuras 3.9 e 3.10), aumentando a expressão de genes relacionados a vias de proliferação celular, divisão celular, diversas fases da divisão, e apoptose. Ao mesmo tempo, reduz a expressão de genes relacionados a vias do metabolismo de lipídeos, de glicogênio, e de

reparos ao DNA e RNA. Esses efeitos, trabalhando em conjunto, levam a longo prazo à morte celular e redução de divisões, efeito desejado para uma droga anticâncer. Esse potencial não foi evidenciado frente às duas linhagens testadas, MCF 7 e Caco- 2, provavelmente devido ao curto tempo de exposição. Diferentes pesquisadores apontam para esse potencial da quercetina, demonstrando, por exemplo, que este composto age induzindo apoptose dependente de caspases em células de câncer de mama BT-474 (SEO, 2016), e apoptose em células de câncer de pâncreas (LEE, 2013; LEE, 2016).

A análise comparativa entre a assinatura da expressão gênica das amostras (conjunto de alterações na expressão de uma linhagem celular em resposta a compostos exógenos) e aquelas de drogas conhecidas revelou que o mapa conectivo do EETg possui uma assinatura de expressão gênica similar com o apresentado por drogas de várias classes. Isso provavelmente acontece em decorrência do pequeno número de genes que foi alterado e, portanto, pode ter compatibilidade com mais de um mecanismo ao mesmo tempo. Entre as assinaturas mais semelhantes estão as de drogas com atividade antimicrobiana, como a tiostreptona e sertaconazol, as de estimulante do sistema nervoso central, como a securinina, imunossupressor como a ciclosporina e as de drogas relaxantes musculares como o brometo de pancurônio.

Em relação às drogas que apresentaram assinaturas gênicas mais distintas possíveis do EETg também foram encontradas várias classes diferentes, com destaque para duas drogas antivirais LY-294002 e vortamina. Esta informação entra em acordo com as demais análises, principalmente com as do *Consensus* a qual aponta que o EETg teria atividade proviral, uma vez que subexpressou genes envolvidos em mecanismos de resposta a infecções virais, sendo virtualmente, o oposto de drogas dessa classe.

Para a quercetina, os mapas conectivos de algumas das drogas que possuem a assinatura gênica mais semelhante, pertencem ao mesmo grupo químico dos flavonoides, como a luteolina e a crisina, e a assinatura foi compatível com informações presentes no próprio banco de dados sobre a quercetina frente à MCF 7. Ainda sobre as drogas mais parecidas, 5 dos dez primeiros colocados apresentam indicação ou são realmente utilizados no tratamento do câncer, o que reforça a indicação da quercetina como uma droga com esse potencial. Entre as drogas com assinatura menos semelhante a da quercetina, as classes foram mais variadas, incluindo antibiótico, vasodilatador e estimulante do sistema nervoso central, que são atividades que realmente não são relatadas para quercetina.

As informações geradas para as amostras, por meio da plataforma virtual *Ingenuity*, sobre os possíveis riscos desencadeados pelas alterações gênicas em células MCF 7 foram coerentes com as demais plataformas de dados, mapa de expressão gênica, *Consensus* e *cmap*, mostrando que é possível comparar os dados para obter-se um direcionamento sobre a ação das drogas nas células. O EETg, segundo esta plataforma, seria capaz de influenciar na sinalização do interferon e no metabolismo de pequenas moléculas, como havia sido encontrado pelo mapa de expressão gênica. Algumas das doenças com as quais o EETg teria alguma interação, também são aquelas para as quais são utilizadas as drogas com a assinatura gênica semelhante, segundo o *cmap* (Tabelas 3.5 e 3.9), por exemplo, doenças imunológicas (ciclosporina – imunossupressor), resposta antimicrobiana (tiosstreptona – antibiótico) e desordem muscular esquelética (brometo de pancurônio – relaxante muscular).

O EETg e os ácidos gálico e cafeico apresentaram muitos pontos em comum, segundo a plataforma *Ingenuity*, como o metabolismo de lipídeos e a bioquímica de pequenas moléculas. Para a quercetina, os resultados também apontaram a relação deste composto com o câncer, tanto por parte dos genes superexpressos, quanto por aqueles subexpressos, mostrando que em ambos os casos as alterações gênicas direcionam-se ao controle do ciclo celular e proliferação de células cancerígenas como um todo. Todas as amostras apresentaram, segundo o *Ingenuity*, hepatotoxicidade e/ou alterações no sangue como potencial toxicológico, no entanto, o teste de toxicidade aguda em animais não demonstrou nenhuma alteração visual no fígado, rins ou coração.

Efetivamente, os resultados encontrados para toxicidade aguda com camundongos não identificaram quaisquer sinais de toxicidade. Camones et al. (2010) avaliaram a toxicidade oral aguda de *Triplaris americana* L., utilizando ratos Sprague Dawley na concentração limite de 2.000 mg/kg e, da mesma forma, não observaram nenhuma morte, assim como nenhum sintoma comportamental de toxicidade, nem qualquer alteração na curva de crescimento dos animais, considerando, assim, a amostra como segura para o uso.

3.7. Conclusões

O EETG, nos ensaios realizados, apresentou baixa toxicidade. A atividade hemolítica usando sangue humano tipo A, B e O e sangue de coelho mostrou que é possível trabalhar com o extrato em faixas de concentração com baixa capacidade hemolítica. A toxicidade frente

aos náupilos de *Artemia* sp, juntamente ao ensaio de citotoxicidade utilizando células MCF 7, Caco 2 indicam claramente que o EETG apresenta baixa toxicidade em células e organismos de pequeno porte. Os resultados das análises toxicogenômicas mostraram que o EETG alterou uma quantidade mínima de genes durante uma exposição de 6 h e que este tipo de análise é uma ferramenta confiável, reprodutível e eficaz para a análise multidirecional dos efeitos dos compostos sobre as células. Nenhuma toxicidade foi observada *in vivo* no teste de toxicidade aguda. Observando o panorama dos resultados de todos os ensaios de toxicidade realizados é possível inferir que a amostra é considerada de baixo risco de toxicidade.

Considerações finais

Com a finalidade de sumarizar e, ao mesmo tempo, ponderar sobre os principais resultados encontrados ao longo dos capítulos anteriores, em que foram avaliadas a atividade antioxidante e a toxicidade do extrato etanólico das sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd. serão apresentadas algumas considerações finais a seguir.

No capítulo II foi realizada uma prospecção para identificar compostos que haviam sido concentrados no extrato etanólico e suas frações. Foi possível a identificação de doze compostos fenólicos, sendo que dois destes, a quercetina e a rutina, já haviam sido identificados anteriormente para a espécie e outros dez que não haviam sido apontados antes e que agora podem ser usadas para identificação quimiotaxonômica de *T. gardneriana* Wedd. A identificação de qual tipo de solvente possui maior afinidade com esses compostos e qual fração consegue obter melhor concentração possibilita futuros trabalhos que tenham o intuito de isolar esse tipo de composto desta espécie vegetal.

Os compostos fenólicos identificados, certamente são os responsáveis pela ação antioxidante abordada ainda no capítulo II. Em relação a esta atividade biológica, não foi possível identificar um mecanismo específico de ação, uma vez que foram apresentados ótimos resultados para todos os ensaios realizados. Provavelmente, por se tratar de uma mistura complexa de compostos, o EETg apresentou esse comportamento antioxidante multidirecional, onde não é possível, por hora, apontar qual composto está tendo ação predominante.

Trabalhar com uma mistura não é essencialmente um ponto negativo, como pôde ser demonstrado no ensaio antioxidante utilizando células MCF 7, onde os compostos isolados (ácidos cafeico e gálico, presentes no EETg segundo a CLAE) conseguiram impedir o estresse oxidativo induzido por TBHP, mas não apresentaram a mesma capacidade quando o estresse oxidativo foi induzido por menadiona, ao passo que o EETG conseguiu impedir o estresse em ambas as situações.

Mesmo apresentando uma alta capacidade antioxidante, com potencial farmacológico, o EETG poderia apresentar alguma toxicidade, no entanto, os ensaios realizados no capítulo III mostraram que este não parece ser o caso. A atividade hemolítica usando sangue humano tipo A, B e O e sangue de coelho mostrou que em baixas e altas concentrações o extrato possui baixa ou nenhuma capacidade hemolítica. Em relação à toxicidade frente aos náuplios de *Artemia* sp, o EETg e frações apresentaram uma toxicidade muito inferior ao demonstrado pelo controle

positivo, o que sugere que esses compostos possuem um baixo risco ecotóxico e citotóxico, fato que foi confirmado através do ensaio de citotoxicidade utilizando células MCF 7 e Caco-2, que também evidenciaram baixa toxicidade nas concentrações testadas.

Os resultados das análises toxicogenômicas mostraram que o EETg conseguiu alterar em células MCF 7 alguns genes depois de uma exposição de 6 h, no entanto a quantidade de genes foi muito pequena em relação ao total e em relação aos controles que foram utilizados, em especial quando comparamos a quercetina que além de alterar os mesmos genes alterados pelo EETg, alterou uma gama muito maior de outros genes. As análises de bioinformática revelaram muitas informações a partir dos dados gerados, em especial para o EETg, as informações apontaram que este extrato alterou genes responsáveis pela resposta das células aos vírus e que um dos possíveis potenciais tóxicos que o extrato poderia apresentar seria a hepatotoxicidade, no entanto, nenhuma alteração desse ou de qualquer outro tipo foi observada no teste de toxicidade aguda.

Ainda em relação aos resultados gerados pela toxicogenômica, a assinatura gênica apresentada pelo EETg mostrou similaridades com drogas antimicrobianas, potencial este que já foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo e por outros autores para *T. gardneriana*. Estudar o mecanismo de ação dessas drogas pode ajudar também a elucidar o mecanismo de ação desse extrato.

Outros ensaios complementares podem ser utilizados para melhor identificar os mecanismos de ação antioxidante e aprofundar o conhecimento sobre a química e possível toxicidade de *T. gardneriana* Wedd., porém os resultados já encontrados evidenciam que esse extrato é uma fonte de diversos compostos fenólicos com ótima atividade antioxidante, e não é esperado qualquer risco relevante associado ao seu consumo.

3.7 Referências

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, AMARAL, M. E.; MORAES, M. M. O., Ensaios clínicos de Medicamentos no Brasil, disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/artigos/ensaios.htm>; Acessado em 28/05/2016

BAUMANN, E.; STOYA, G.; VÖLKNER, A.; RICHTER, W.; LEMKE, C.; LINSS, W.. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. **Acta Histochemica**, v. 102, n. 1, p. 21-35, 2000.

BERNHEIMER, A. W., Assay of hemolytic toxins. **Methods in enzymology**, v. 165, p. 213-217, 1988.

DONG, A.; FANG, Y.; ZHANG, L.; XIE, J.; WU, X.; ZHANG, L.; LIAN, X.; CHEN, Y.; LUO, J.; LIU, M., Caffeic Acid 3,4-Dihydroxy-Phenethyl Ester Induces Cancer Cell Senescence by Suppressing Twist Expression, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n. 1, p. 238-247, 2011.

ERNST, E., Herbal medicines: balancing benefits and risks. **Novartis Found. Symp.** v. 282, p. 154–167, 2007.

GEORGE, P., Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v 01 (06), p. 40-44, 2011.

GOVEA-SALAS, M.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; LOZANO-SEPÚLVEDA, S. A.; AGUILAR-GONZALEZ, C. N.; ZUGASTI-CRUZ, A.; SALAS-VILLALOBOS, T. B.; MORLETT-CHÁVEZ, J. A., Gallic acid decreases hepatitis C virus expression through its antioxidant capacity, **Experimental And Therapeutic Medicine**, v. 11, p. 619-624, 2016.

GUTTULA, S.V.; ALLAM, A.; GUMPENY, R. S., Analyzing Microarray Data of Alzheimer's Using Cluster Analysis to Identify the Biomarker Genes. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, 2012.

HSU, T. H.; CHU, C. C.; HUNG, M. W.; LEE, H. J.; HSU, H. J.; CHANG, T. C., Caffeic acid phenethyl ester induces E2F-1-mediated growth inhibition and cell-cycle arrest in human cervical cancer cells. **Federation of European Biochemical Societies Journal**. v. 280, n. 11, p. 2581-2593, 2013.

IFEOMA, O; OLUWAKANYINSOLA S. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities – Chapter 4 of *New Insights into Toxicity and Drug Testing*, book edited by Sivakumar Gowder, ISBN 978-953-51-0946-4, Published: January 23, 2013.

LEE, H. J.; LEE, H. B.; JUNG, G. O.; TAEK, O. H. J.; PARK, D. E., Effect of quercetin on apoptosis of PANC-1 cells, **Journal of the Korean Surgical Society**, v. 85, n. 6, p. 249-260, 2013.

LEE, J.; LEE, J.; KIM, S. J.; KIM, J. H., Quercetin-3-O-glucoside suppresses pancreatic cancer cell migration induced by tumor-deteriorated growth factors in vitro. **Oncology Reports**. v. 35, n. 4, p. 2473-2479, 2016.

MERKER, M. P.; LEVINE, L. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and stimulates arachidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 24, n. 5, p. 451–465, jan. 1986.

MOSIHUZZAMAN, M. Herbal medicine in healthcare—an overview. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 6, p. 807-812, 2012.

NASRI, H.; SHIRZAD, H., Toxicity and safety of medicinal plants, **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 21-22, 2013.

OECD [Organisation for Economic Co-operation and Development]. 2001. Guideline 425: Acute oral toxicity—Modified up and down procedure. Paris: OECD

OLARU, O. T.; VENABLES, L.; VENTER, M.; NITULESCUI, G. M.; MARGINA, D.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A. M., Anticancer potential of selected *Fallopia* Adans species. **Oncology Letters**, v. 10, n. 3, p. 1323-1332, 2015.

Patwardhan, B.; Mashelkar, R. A., Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? **Drug discovery Today**, v. 14, n. 15, p. 804-811, 2009.

ROBINSON, M. D.; Mc CARTHY, D. J.; SMYTH, G. K., edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

SAHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, R. L.; HADDA, T. B.; Evaluation of phytochemical content, antimicrobial, cytotoxic and antitumor activities of extract from *Rumex hastatus* D. Don roots. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 211, 2015.

SAIKIA, P.; FENSTERL, V.; SEN, G. C., The inhibitory action of P56 on select functions of E1 mediates interferon's effect on human papillomavirus DNA replication. **Journal of virology**, v. 84, n. 24, p. 13036-13039, 2010.

SEO, H. S.; KU, J. M.; CHOI, H. S.; CHOI, Y. K.; WOO, J. K.; KIM, M.; KIM, I.; NA, C. H.; HUR, H.; JANG, B. H.; SHIN, Y. C.; KO, S. G., Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 36, n. 1, p. 31-42, 2016.

TANIDA, I.; SHIRASAGO, Y.; SUZUKI, R.; ABE, R.; WAKITA, T.; HANADA, K.; BFUKASAWA, M., Inhibitory Effects of Caffeic Acid, a Coffee-Related Organic Acid, on the Propagation of Hepatitis C Virus. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 4, p. 268-275, 2015.

VANDENBERG, L. N.; MAFFINI, M. V.; SONNESCHEIN, C.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M., Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. **Endocrinology Reviews**, v. 30, p. 607-624, 2009.

VOUTQUENNE, L.; GUINOT, P.; FROISSARD, A.; THOISON, O.; LITAUDON, M.; LAVAUD, C., Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullia austro-caledonica*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 7, p. 825-835, 2005.

TONG, W.; FANG, H.; MENDRICK, D.; Toxicogenomics and Cell-Based Assays for Toxicology. **Interdisciplinary Bio Central**, v. 1, n. 1, p. 10, 2009.

Apêndice I

**INFORMAÇÕES SOBRE GENES ALTERADOS EM CÉLULAS
MCF 7 NA PRESENÇA DE COMPOSTOS FENOLICOS E
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS**

Sumário

ÁCIDO GÁLICO – SUPEREXPRESSOS.....	4
CYP1A1	4
CYP1B1	6
<i>Triplaris gardneriana</i> Wedd – SUBEXPRESSOS	7
IFIT1	7
MX1	8
OAS1	9
ÀCIDO CAFEICO – SUPEREXPRESSOS.....	10
HSPA5	10
HYOU1	12
HMOX1	13
QUERCETINA – SUPEREXPRESSOS.....	14
CCNT1	14
CDK9	15
CDKN2A	16
ETS2	18
SLC2A1	19
SLC2A3	21
AKR1C2	22
AKR1C3	23
CDKN1A	24
CDKN1B	27
CDKN2B	29
BBC3	30
BACH1	31
QUERCETINA - SUBEXPRESSOS	32
CCNB1	32
CCNB2	34
PLK1	36
FZR1	37
CDC20	38
CDC25	39
CDK1	40
FBX05	42

POLE	43
POLE2	45
POLA1	46
POLA2	47
PRIM1	48
PRIM2	49
CENPF	50
CTNNB1	51
IRF3	54
EP300	56

ÁCIDO GÁLICO – SUPEREXPRESSOS

CYP1A1

Presente também: Ácido gálico-UP e quercetina-UP

Nome oficial: *cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*

Sinônimos: AHH; AHRR; CP11; CYP1; CYP1A1; P1-450; P450-C; P450DX

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene, CYP1A1, codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450. As proteínas do citocromo P450 monooxigenases catalisam muitas reações envolvidas no metabolismo de drogas e síntese de colesterol, esteróides e outros lípidos. Esta proteína se localiza no retículo endoplasmático e a sua expressão é induzida por alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), alguns dos quais são encontradas na fumaça do cigarro. O substrato endógeno da enzima é desconhecido; No entanto, é capaz de metabolizar alguns HPA a intermediários carcinogêneos. O gene tem sido associado com o risco de câncer de pulmão. Um membro da família relacionada, CYP1A2, está localizada a aproximadamente 25 kb de distância do CYP1A1 no cromossomo 15. splicing alternativo resulta em múltiplas transcrição variantes que codificam isoformas distintas.

Artigos mostram relação com câncer, inclusive mostrando que o aumento da sua expressão está relacionado com o aumento da incidência de câncer de mama (Association of CYP1A1 A4889G and T6235C polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in Brazilian women. Oliveira CB, et al. Clinics (Sao Paulo), 2015 Oct. PMID 26598080, Free PMC Article).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: sete entradas correspondem a pesquisa com CYP1A1

Entrada	Nome	Descrição
hsa05204	Químicos carcinogênicos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Estimou-se que a exposição a carcinogénios químicos ambientais podem contribuir significativa ...
hsa00980	Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00830	Metabolismo do retinol - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

hsa00140	Biossíntese do hormônio esteróide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios esteróides derivadas do colesterol são uma classe de compostos biologicamente ativos em vertebrado ...
hsa01100	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa04913	Esteroidogêneses ovarianos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os esteróides ovarianos, 17-beta-estradiol (E2) e progesterona (P4), são críticas para o normal...
hsa00380	Metabolismo do triptofano - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

CYP1B1

PRESENTE TAMBÉM: Ácido cafeico - UP; quercetina - UP

NOME OFICIAL: *cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1*

Sinônimos: CP1B; GLC3A; CYP1B1; P4501B1

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450. As proteínas do citocromo P450 monooxigenases catalisam muitas reações envolvidas no metabolismo de drogas e síntese de colesterol, esteróides e outros lípidos. A enzima codificada por este gene se localiza no retículo endoplasmático e metaboliza pró-carcinógenos tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e 17-beta-estradiol. Mutações neste gene estão associadas com glaucoma congênito primário; Por conseguinte, pensa-se que a enzima também metaboliza uma molécula de sinalização envolvidos no desenvolvimento do olho, possivelmente, um esteróide.

Artigos relacionados: Mostram que o aumento da expressão desse gene está relacionado com o aumento na proliferação de células cancerígenas (MCF7) e aumento as produção de ROS intracelular. (Genistein Induces Cytochrome **P450 1B1** Gene Expression and Cell Proliferation in Humano Breast Cancer MCF-7 Cells.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: seis entradas correspondem a pesquisa com CYP1B1

Entrada	Nome	Descrição
hsa00980	Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa05204	Químicos carcinogênicos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Estimou-se que a exposição a carcinogénios químicos ambientais podem contribuir significativa ...
hsa04913	Esteroidogêneses ovarianos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os esteróides ovarianos, 17-beta-estradiol (E2) e progesterona (P4), são críticas para o normal...
hsa05206	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
hsa00140	Biossíntese do hormônio esteróide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios esteróides derivadas do colesterol são uma classe de compostos biologicamente ativos em vertebrado ...
hsa00380	Metabolismo do triptofano - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

Triplaris gardneriana Wedd – SUBEXPRESSOS

IFIT1

Presente também: Licania rigida – down; Quercetina - down

Nome oficial: *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1*

Sinônimos: C56; P56; G10P1; IFI56; ISG56; IFI-56; IFIT-1; IFNAI1; RNM561; IFI-56K

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica uma proteína contendo repetições de tetratricopeptide que foi originalmente identificada sendo induzida por tratamento com o interferon. A proteína codificada pode inibir a replicação viral e o processo de iniciação da tradução. Este gene está localizado em um cluster no cromossomo 10 com cinco outros genes estreitamente relacionados. Há um pseudogene para este gene no cromossoma 13. Foram observados variantes de transcritos de splicing alternativo que codificam isoformas múltiplas.

Artigos relacionados mostram que um aumento na expressão desse gene é capaz de produzir proteínas com atividade antiviral (The inhibitory action of P56 on select functions of E1 mediates interferon's effect on humano papillomavirus DNA replication. Saikia P, et al. J Virol, 2010 Dec. PMID 20926571.).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: duas entradas correspondem a pesquisa com **IFIT1**

Entrada	Nome	Descrição
hsa05160	Hepatite C - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus da hepatite C (VHC) é uma causa importante de doenças do fígado crónica. O VHC emprega várias estratégias ...
hsa05168	Herpes infecção simples - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da herpes simplex (VSH) são muito comuns em todo o mundo, com a prevalência de HSV-1...

MX1**Presente também:** Quercetina - down**Nome oficial:** MX dynamin like GTPase 1**Sinônimos:** MX; MxA; IFI78; IFI-78K

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica uma proteína que metabolizam o trifosfato de guanosina (GTP) que participa na resposta celular antiviral. A proteína codificada é induzida pelo interferon tipo I e tipo II e antagoniza o processo de replicação de vários vírus diferentes de ARN e ADN. Há um gene relacionado localizado no cromossoma 21, e existem vários pseudogenes localizados em um cluster no cromossoma 4. Splicings alternativos resultam em múltiplos transcritos vaiantes.

Artigos relacionados: Mostram que a proteína produzida a partir desse gene é uma resposta a presença de vírus no organismo (Blood MxA protein as a marker for respiratory virus infections in young children.Toivonen L, et al. J Clin Virol, 2015 Jan. PMID 25542463)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: duas entradas correspondem a pesquisa com **MX1**

Entrada	Nome	Descrição
hsa05162	Sarampo - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus do sarampo (VS) é altamente contagioso e leva a morte infantil em todo o mundo. Humanos são a unic...
hsa05164	Influenza A - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A gripe é uma doença respiratória contagiosa causada pela infecção pelo vírus da Influenza A...

OAS1

Presente também: Quercetina - down

Nome oficial: 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1

Sinônimos: OIAS; IFI-4; OIASI; E18/E16

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene é induzido por interferons e codifica uma proteína que sintetiza o 2', 5'-oligoadenilatos (2-5As). Esta proteína ativa RNase L latente, o que resulta na degradação do RNA viral e a inibição da replicação viral. Splicings alternativos resultam em múltiplas transcrições variantes com diferentes atividades enzimáticas. Polimorfismos neste gene têm sido associados com a susceptibilidade à infecção viral e diabetes mellitus tipo 1. Este gene está localizado em um grupo de genes relacionados no cromossoma 12.

Artigos relacionados: Avaliam a relação entre polimorfismos do gene OAS1 e susceptibilidade a hepatite C crônica, com análise de fusão alta resolução.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro entradas correspondem a pesquisa com **oas1**

Entrada	Nome	Descrição
hsa05164	Influenza A - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A gripe é uma doença respiratória contagiosa causada pela infecção pelo vírus da Influenza A...
hsa05160	Hepatite C - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus da hepatite C (VHC) é uma causa importante de doenças crônicas do fígado. O VHC empregam várias estratégias...
hsa05162	Sarampo - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus do sarampo (VS) é altamente contagioso e leva a morte infantil em todo o mundo. Humanos são a unic...
hsa05168	Herpes simplex infecção - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da herpes simplex (VSH) são muito comuns em todo o mundo, com a prevalência de HSV-1...

ÀCIDO CAFEICO – SUPEREXPRESSOS

Os genes das vias que apresentaram maiores alterações na presença do ácido cafeico (15 – 66,7% de alteração na via) já foram apresentados anteriormente, são eles o CYP1A1 e o CYP1B1. Outros genes que foram alterados e aparecem em diferentes vias foram: HSPA5; HYOU1, HMOX1. Segue abaixo suas descrições.

HSPA5

Presente também: Sem outra ocorrência

Nome oficial: *heat shock protein family A (Hsp70) member 5*

Sinônimos: BIP; MIF2; GRP78; HEL-S-89n

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A proteína codificada por este gene é um membro da família de proteínas de choque térmico (HSP70). Ele está localizado no lúmen do retículo endoplasmático (RE), e está envolvido na dobragem e montagem de proteínas no RE. Uma vez que esta proteína interage com muitas proteínas do RE, pode desempenhar um papel fundamental no controle do transporte de proteínas através da célula.

Artigos relacionados: sugerem entre outras coisas que o aumento na expressão desse gene esta relacionado com tumores pancreáticos e que este gene pode ser usado como marcador para resposta do câncer de colón retal à quimioterapia (Expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) determines colorectal cancer response to chemotherapy; Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Neuroendocrine Tumors is Linked to Clinicopathological Parameters and Possible Epigenetic Regulations).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: cinco entradas correspondem a pesquisa com **HSPA5**

Entrada	Nome	Descrição
hsa03060	Exportação de proteínas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A exportação de proteínas é o transporte ativo de proteínas a partir do citoplasma para o exterior da célula ...
hsa04141	Processamento de proteínas no retículo endoplasmático - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O retículo endoplasmático (RE) é uma organela subcelular onde as proteínas são dobradas com a ajuda de ...
hsa04612	Processamento e apresentação de antígenos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

hsa04918	Síntese de hormônios da tireóide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) são essenciais para o desenvolvimento normal, cresc...
hsa05020	Doenças causadas por prions - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Doenças provocadas por prions, também denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET), são um grupo de...

HYOU1

Presente também: Sem outra ocorrência

Nome oficial: *hypoxia up-regulated 1*

Sinônimos: Cab140; Grp170; Orp150; CBP-140; AI415631

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Sem descrição

Artigos relacionados: alguns artigos relacionam alterações nesse gene com problemas no processamento de proteínas (Molecular chaperoning by glucose-regulated protein 170 in the extracellular milieu promotes macrophage-mediated pathogen sensing and innate immunity).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: uma entrada corresponde a pesquisa com **HYOU1**

Entrada	Nome	Descrição
hsa04141	Processamento de proteínas no retículo endoplasmático - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O retículo endoplasmático (RE) é uma organela subcelular onde as proteínas são dobradas com a ajuda de ...

HMOX1

Presente também: Quercetina - up

Nome oficial: heme oxygenase 1

Sinônimos: HO-1; HSP32; HMOX1D; bK286B10

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A heme oxigenase, uma enzima essencial no catabolismo do heme, cliva o heme para formar a biliverdina, que é subsequentemente convertido para a bilirrubina pela biliverdina-redutase, e monóxido de carbono. A atividade da heme-oxigenase é induzida pelo seu substrato heme e por várias substâncias não-heme. Heme oxigenase ocorre como 2 isoenzimas, um heme oxigenase-induzível 1 e heme oxigenase-2 constitutiva. HMOX1 e HMOX2 pertencem à família heme oxigenase.

Artigos relacionados: Alterações nesse gene causam alterações na heme oxigenase e por consequência problemas com polimorfismo albuminúria além de estar relacionado com diabetes e risco de câncer (Association Between Heme Oxygenase-1 Promoter Polymorphisms and the Development of Albuminuria in Type 2 Diabetes: A Case-Control Study. Lee EY, et al. *Medicine (Baltimore)*, 2015 Oct. PMID 26512585; Association of heme oxygenase-1 polymorphisms with cancer risk: A systematic review and meta-analysis. Luo H, et al. *J BUON*, 2015 Jul-Aug. PMID 26416069).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro entradas correspondes a pesquisa com **HMOX1**

Entrada	Nome	Descrição
hsa05206	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
hsa04066	Via de sinalização do HIF-1 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A HIF-1 é um factor de transcrição que funciona como um regulador mestre de ...
hsa00860	Metabolismo da porfirina e clorofila - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa04978	Absorção de minerais - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os minerais são um dos cinco grupos fundamentais de nutrientes necessários para sustentar a vida. Dos minerais ...

QUERCETINA – SUPEREXPRESSOS

Foram selecionados genes de vias que apresentavam mais de 40% de alteração na presença da quercetina, com exceção dos genes que já foram anteriormente descritos seguem abaixo as instruções sobre os demais.

CCNT1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin T1*

Sinônimos: CCNT; CYCT1; HIVE1

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um membro da subfamília ciclina C altamente conservado. A proteína codificada é firmemente associada com ciclina quinase dependente 9, e é uma subunidade principal do fator de transcrição alongamento positivo b (p-TEFb). Em Humanos, existem várias formas de transcrição positiva do fator de alongamento b, que pode incluir um de várias ciclinas diferentes juntamente com quinase dependente de ciclina 9. O complexo contendo ciclina atua como um cofator do vírus da imunodeficiência humano tipo 1 (HIV-1) proteína Tat, e é necessário para a ativação completa da transcrição viral. Também estão envolvidos no desencadear de transcrição alongamento através de fosforilação do domínio carboxi-terminal da subunidade maior de RNA polimerase II. A sub-expressão desse gene está implicado no crescimento do tumor. Splicings alternativos resultam em múltiplas transcritos variantes.

Artigos relacionados: a grande maioria dos artigos aborda a relação desse gene com o HIV (HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. Hoque M, et al. J Mol Biol, 2011 Jul 29. PMID 21763496); (Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. Chiang K, et al. J Virol, 2012 Mar. PMID 22205749)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: uma entrada correspondes a pesquisa com CCNT1

Entrada	Nome	Descrição
hsa05202	Misregulation transcricional no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

CDK9

Presente também: Sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin-dependent kinase 9*

Sinônimos: TAK; C-2k; CTK1; CDC2L4; PITALRE

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A proteína codificada por este gene é um membro da família da ciclina dependente da proteína cinase (CDK). membros da família de CDK são muito semelhantes aos produtos de genes de *S. cerevisiae* CDC28, *cdc2* e *S. pombe*. São conhecidas como importantes reguladores do ciclo celular. Esta cinase foi encontrado para ser um componente do complexo multiproteico TAK / P-TEFb. Esta proteína forma um complexo com, e é regulada pela proteína reguladora de ciclina K. HIV-1 Tat subunidade ciclina T ou foi capaz de interagir com esta proteína e ciclina T, o que sugere um possível envolvimento desta proteína na SIDA.

Artigos relacionados: Modulação de mRNAs; regulação da proliferação celular, apoptose. ([Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor.](#) Albert TK, *et al.* Br J Pharmacol, 2014 Jan. PMID 24102143)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: uma entrada corresponde a pesquisa com **CDK9**

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa05202</u>	Misregulation transcricional no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

CDKN2A

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2^a*

Sinônimos: ARF; MLM; P14; P16; P19; CMM2; INK4; MTS1; TP16; CDK4I; CDKN2; INK4A; MTS-1; P14ARF; P19ARF; P16INK4; P16INK4A; P16-INK4A

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene gera diversos transcritos variantes que diferem em seus primeiros exons. Pelo menos três splicings alternativos codificam proteínas distintas têm sido relatados, dois dos quais codificam isoformas estruturalmente relacionados conhecidos por funcionar como inibidores de quinase CDK4. A transcrição restante especifica uma proteína que é estruturalmente relacionada com os produtos das outras variantes. Funciona como um estabilizador da proteína supressora de tumor p53, uma vez que podem interagir com, e retêm, a E3 ligase de ubiquitina-proteína MDM2, uma proteína responsável pela degradação da p53. Apesar das diferenças estruturais e funcionais, as isoformas inibidoras de CDK partilham uma funcionalidade comum no controle do ciclo celular G1. Este gene é frequentemente mutado ou eliminado em uma ampla variedade de tumores, e é conhecido por ser um importante gene supressor de tumor.

Artigos relacionados: Alterações nesse gene estão relacionadas com o HPV e o aumento do risco de alguns tipos de câncer. ([Expression of p16/Ki-67 in ASC-US/LSIL or Normal Cytology with Presence of Oncogenic HPV DNA.](#) Solares C, *et al.* Anticancer Res, 2015 Nov. PMID 26504065).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: doze entradas correspondem a pesquisa com **CDKN2A**

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa05219</u>	Câncer de bexiga - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O urotélio cobre a superfície luminal de quase todo o trato urinário, que se estende a partir da s ...
<u>hsa04110</u>	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
<u>hsa05200</u>	Vias do câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

<u>hsa05214</u>	Glioma - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os gliomas são os mais comuns dos tumores cerebrais primários e são responsáveis por mais de 40% de toda a central, ...
<u>hsa05218</u>	Melanoma - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Melanoma é uma forma de câncer de pele que tem um prognóstico ruim e que está em ascensão na popu...
<u>hsa05220</u>	leucemia mielóide crônica - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Leucemia mielóide crônica (LMC) tem origem em uma célula-tronco hematopoiéticas pluripotentes do osso ...
<u>hsa05206</u>	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
<u>hsa04115</u>	Via de sinalização do p53 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Ativação do p53 é induzida por um número de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, o stress oxidativo e ...
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...
<u>hsa05203</u>	Carcinogênese viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...
<u>hsa05212</u>	Câncer pancreático - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Adenocarcinoma infiltrado ductal é o tumor maligno mais comum do pâncreas. Quando a maior parte Investig ...
<u>hsa05223</u>	Câncer de pulmão - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres nos países industrializados. Não-...

ETS2

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *ETS proto-oncogene 2, transcription factor*

Sinônimos: ETS2IT1

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um fator de transcrição que regula genes envolvidos no desenvolvimento e apoptose. A proteína codificada é também um proto-oncogene e já foi evidenciado o seu envolvimento na regulação da telomerase. Um pseudogene deste gene está localizado no cromossoma X. Splicings alternativos resultam em múltiplas transcrições variantes.

Artigos relacionados: Mostram a atividade transcricional relacionada a esse gene ([Structural insights into the autoregulation and cooperativity of the humano transcription factor Ets-2.](#)Newman JA, *et al.* J Biol Chem, 2015 Mar 27. PMID 25670864, **Free PMC Article**)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro entradas correspondem a pesquisa com **CDKN2A**

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa04014</u>	Via de sinalização da Ras - <i>Homo sapiens</i> (humano)	As proteínas Ras são GTPases que funcionam como interruptores moleculares para vias de sinalização que regulam a c...
<u>hsa04320</u>	Formação do eixo dorsoventral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...

SLC2A1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: solute carrier family 2 member 1

Sinônimos: CSE; PED; DYT9; GLUT; DYT17; DYT18; EIG12; GLUT1; HTLV; GLUT-1; SDCHCN; GLUT1DS

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um grande transportador de glicose na barreira sangue-cérebro de mamíferos. A proteína codificada é encontrada principalmente na membrana celular e na superfície da célula, onde podem também funcionar como um receptor para o vírus da leucemia de células T humano (HTLV) I e II. Mutações neste gene têm sido encontradas numa família com discinesia induzida por esforço paroxística.

Artigos relacionados: Mostram a relação do aumento da expressão desse gene com o aumento na concentração da proteína transportadora de glicose (Glucose transporter isoform-1 receptor-positive infantile capillary hemangiomas: case report and literature review. Brissette A, *et al.* Can J Ophthalmol, 2014 Dec. PMID 25433755)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEGG: Onze entradas correspondem a pesquisa com **SLC2A1**

Entrada	Nome	Descrição
hsa05230	Metabolismo central do carbono no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A transformação maligna de células requer adaptações específicas do metabolismo celular para apoiar gr ...
hsa04066	Via de sinalização do HIF-1 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A hipóxia induzida pelo fator 1 (HIF-1) é um fator de transcrição que funciona como um regulador mestre de ...
hsa05211	Célula de carcinoma renal - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Células de câncer renais (RCC) são responsáveis por ~ 3% das neoplasias malignas humanas e sua incidência parece estar aumentando ...
hsa04911	Secreção de insulina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Células beta pancreáticas são células endócrinas especializadas...

<u>hsa04919</u>	Via de sinalização de hormônio da tireoide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios da tireoide (THs) são importantes reguladores de crescimento, desenvolvimento e metabolismo. A ação...
<u>hsa04920</u>	Via de sinalização da adipocitocina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O aumento no volume e o número de adipócitos esta positivamente correlacionado com a produção de leptina e negativamente...
<u>hsa04922</u>	Via de sinalização do glucagon - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O glucagon é convencionalmente considerado como um hormônio contra-reguladora de insulina e desempenha um crítico ...
<u>hsa04931</u>	Resistência a insulina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A resistência a insulina é uma condição onde células adquirem resistência aos efeitos da insulina. Isso é frequenti...
<u>hsa04976</u>	Secreção biliar- <i>Homo sapiens</i> (humano)	Bile é uma secreção vital, essencial para a digestão e absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis i ...
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...
<u>hsa05200</u>	Vias do câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

SLC2A3

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *solute carrier family 2 member 3*

Sinônimos: GLUT3

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: sem descrição

Artigos relacionados: Trabalhos relacionados ao transporte da glucose

Placental glucose transporter 3 (GLUT3) is up-regulated in humano pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction.Janzen C, *et al.* Placenta, 2013 Nov. PMID 24011442,

Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters.Deng D, *et al.* Nature, 2015 Oct 15. PMID 26176916

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: nenhum resultado encontrado

AKR1C2

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *aldo-keto reductase family 1, member C2*

Sinônimos: DD; DD2; TDD; BABP; DD-2; DDH2; HBAB; HAKRD; MCDR2; SRXY8; DD/BABP; AKR1C-pseudo

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um membro da superfamília das aldo/ceto-redutase, que consiste em mais do que 40 enzimas e proteínas conhecidas. Estas enzimas catalisam a conversão de aldeídos e cetonas para os seus álcoois correspondentes usando o NADH e/ou NADPH como cofactor. As enzimas exibem especificidades sobrepostas, mas distintas para o substrato. Esta enzima se liga ao ácido biliar com elevada afinidade, e mostra mínima atividade desidrogenase 3-alfa-hidroxiesteróide. Este gene partilha alta similaridade de sua sequência com três outros membros de genes e está agrupado com esses três genes no cromossomo 10p15-p14. Três transcritos variantes deste gene codificam duas isoformas diferentes.

Artigos relacionados: mostram atividades que se conectam com a descrição dada pelo NCBI

(Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Apr 15;302(8):E941-9. doi: 10.1152/ajpendo.00069.2011. Epub 2012 Jan 24. Glucocorticoid-induced androgen inactivation by aldo-keto reductase 1C2 promotes adipogenesis in humano preadipocytes.)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: dois resultados foram relacionados a esse gene

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa00140</u>	Biosíntese de esteóides - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios esteróides, derivados do colesterol, são uma classe de compostos biologicamente ativos em vertebrado ...
<u>hsa05204</u>	Carcinogênese química - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Estimou-se que a exposição a carcinogénios químicos ambientais podem contribuir significativa ...

AKR1C3

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *aldo-keto reductase family 1, member C3*

Sinônimos: DD3; DDX; PGFS; HAKRB; HAKRe; HA1753; HSD17B5; hluPGFS

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um membro da superfamília das aldo/ceto-redutase, que consiste em mais do que 40 enzimas e proteínas conhecidas. Estas enzimas catalisam a conversão de aldeídos e cetonas para os seus álcoois correspondentes usando o NADH e/ou NADPH como cofactor. As enzimas exibem especificidades sobrepostas, mas distintas para o substrato. Esta enzima catalisa a redução da prostaglandina (PG) D2, PGH2 e fenantrenoquinona (PQ), e a oxidação de 9alpha, 11beta-PGF2 para a PGD2. Desempenha um papel importante na patogênese de doenças alérgicas, como asma, e também pode ter um papel no controle do crescimento e/ou diferenciação celular. Este gene partilha alta similaridade de sua sequência com três outros membros de genes e está agrupado com esses três genes no cromossomo 10p15-p14. Três transcritos variantes deste gene codificam duas isoformas diferentes.

Artigos relacionados: O aumento da expressão desse gene induz a resistência de células cancerígenas frente radiação ionizante através da modulação do estresse oxidativo impedindo maiores danos que são gerados pelos radicais livres decorrentes da radiação. ([Elevated expression of AKR1C3 increases resistance of cancer cells to ionizing radiation via modulation of oxidative stress.](#)Xiong W, *et al.* PLoS One, 2014.)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: Quatro resultados foram relacionados a esse gene

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa00140</u>	Biosíntese de esteóides - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios esteróides, derivados do colesterol, são uma classe de compostos biologicamente ativos em vertebrado ...
<u>hsa04913</u>	Esteroidogênese ovariana - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os esteróides ovarianos, 17-beta-estradiol (E2) e progesterona (P4), são críticos...
<u>hsa00590</u>	Metabolismo do ácido aracdômico - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
<u>hsa01100</u>	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

CDKN1A

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*

Sinônimos: P21; CIP1; SDI1; WAF1; CAP20; CDKN1; MDA-6; p21CIP1

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um potente inibidor de ciclina dependente de quinase. A proteína codificada se liga a e inibe a atividade de ciclina-ciclina dependente de quinase 2 ou ciclina dependente de quinase 4, e portanto, funciona como um regulador da progressão do ciclo celular em G1. A expressão deste gene é controlada rigidamente pela proteína supressora de tumores p53, por meio do qual esta proteína medeia a detenção do ciclo celular fase G1 dependente de p53 em resposta a uma variedade de estímulos de estresse. Esta proteína pode interagir com antígeno nuclear de proliferação celular, um fator acessório da DNA polimerase, e desempenha um papel regulador na replicação do DNA, fase S e reparação de danos do DNA. Esta proteína foi relatado por ser especificamente clivadas por caspases-CASP3, e conduz uma forte ativação de quinase 2 dependente de ciclina, e pode ser um instrumento para a execução da apoptose via à ativação de caspases. Os ratos que não têm este gene tem a capacidade de regenerar tecidos danificados ou faltando. Vários splicings alternativos foram encontrados para este gene.

Artigos relacionados: um artigo relaciona o aumento da expressão desse gene com a ativação de vias relacionadas a apoptose e atividade antioxidante

The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Humano HaCaT Keratinocytes. Chen A, *et al.* Med Sci Monit Basic Res, 2015 Apr 30. PMID 25925725

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: vinte resultados foram relacionados a esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa05161	Hepatite B - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da hepatite B (HBV) é um vírus envelopado e contém uma cadeia dupla parcialmente de relaxada...
hsa05200	Vias no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa05202	Misregulação transcricional no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

<u>hsa05203</u>	Viral carcinogenesis - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre os vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas....
<u>hsa05205</u>	Proteoglicanos em câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Muitos proteoglicanos (PGs) no microambiente do tumor tem se mostrado macromoléculas chave que ...
<u>hsa05206</u>	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
<u>hsa04012</u>	Via de sinalização do ErbB - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A ErbB família de receptores tirosina-quinase....
<u>hsa04066</u>	Via de sinalização do HIF-1 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A hipóxia induzida pelo fator 1 (HIF-1) é um fator de transcrição que funciona como um regulador mestre de ...
<u>hsa04068</u>	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
<u>hsa04110</u>	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
<u>hsa04115</u>	Via de sinalização do p53 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Ativação do p53 é induzida por um número de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, o stress oxidativo e ...
<u>hsa04151</u>	Via de sinalização do PI3K-Akt - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A via de sinalização do phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)-Akt é ativada por muitos tipos de células...
<u>hsa04630</u>	Via de sinalização Jak-STAT - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A via de transdução e ativação de transcrição Janus quinase (JAK/STAT) é uma...

<u>hsa04921</u>	Via de sinalização da oxitocina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A oxitocina (OT) é um nonapéptideo sintetizado pelos neurónios magnocelulares localizados na supra-óp...
<u>hsa05160</u>	Hepatite C - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus da hepatite C (VHC) é uma causa importante de doenças do fígado crónica. O VHC emprega várias estratégias ...
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...
<u>hsa05169</u>	Infecção por vírus de Epstein-Barr - <i>Homo sapiens</i> (humano)	vírus de Epstein-Barr (EBV) é um herpesvirus humano ubíquo que está associada com a oncogénese. EBV ...
<u>hsa05214</u>	Glioma - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os gliomas são os mais comuns dos tumores cerebrais primários e são responsáveis por mais de 40% de toda a central, ...
<u>hsa05215</u>	Câncer de próstata - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de próstata constitui um importante problema de saúde nos países ocidentais. Ele é o mais frequentemente de...
<u>hsa05218</u>	Melanoma - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Melanoma is a form of skin cancer that has a poor prognosis and which is on the rise in Western popu...

CDKN1B

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B

Sinônimos: KIP1; MEN4; CDKN4; MEN1B; P27KIP1

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, que partilha uma semelhança limitada com um inibidor de CDK CDKN1A / p21. A proteína codificada se liga e impede a ativação dos complexos CDK4-ciclina D ou ciclina E-CDK2, e assim controla a progressão do ciclo celular em G1. A degradação desta proteína, que é desencadeada pela sua fosforilação dependente de CDK e subsequentemente ubiquitinação por complexos SCF. É necessário para a transição da quiescência celular para o estado proliferativo. Mutações nesse gene estão

Artigos relacionados mostram relações desse gene com vários tipos de câncer (Genetic Association Between CDKN1B rs2066827 Polymorphism and Susceptibility to Cancer. Lu Y, et al. Medicine (Baltimore), 2015 Nov. PMID 26579796, Free PMC Article).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: dezesseis resultados foram relacionados a esse gene

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa05206</u>	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
<u>hsa05202</u>	Misregulation transcricional no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
<u>hsa05215</u>	Câncer de próstata - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de próstata constitui um importante problema de saúde nos países ocidentais. Ele é o mais frequentemente de...
<u>hsa04151</u>	Via de sinalização do PI3K-Akt - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A via de sinalização do phosphatidylinositol 3' -kinase(PI3K)-Akt é ativada por muitos tipos de células...
<u>hsa05200</u>	Vias do câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

<u>hsa04012</u>	Via de sinalização do ErbB - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A ErbB família de receptorestirosina-quinase...
<u>hsa04066</u>	Via de sinalização do HIF-1 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A hipóxia induzida pelo fator 1 (HIF-1) é um fator de transcrição que funciona como um regulador mestre de ...
<u>hsa04068</u>	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
<u>hsa04110</u>	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
<u>hsa04933</u>	Via de sinalização AGE-RAGE em complicações diabéticas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Produtos finais de glicação avançada (AGEs) são um grupo complexo de compostos produzidos através da...
<u>hsa05161</u>	Hepatite B - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da hepatite B (HBV) é um vírus envelopado e contém uma cadeia dupla parcialmente de relaxada...
<u>hsa05162</u>	Sarampo - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus do sarampo (VS) é altamente contagioso e leva a morte infantil em todo o mundo. Humanos são a unic...
<u>hsa05169</u>	Infecção por vírus de Epstein-Barr - <i>Homo sapiens</i> (humano)	vírus de Epstein-Barr (EBV) é um herpesvirus humano ubíquo que está associada com a oncogénese. EBV ...
<u>hsa05203</u>	Carcinogénese viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...
<u>hsa05220</u>	leucemia mielóide crónica - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Leucemia mielóide crónica (LMC) tem origem em uma célula-tronco hematopoiéticas pluripotentes do osso ...
<u>hsa05222</u>	Câncer de pulmão - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres nos países industrializados. Não...

CDKN2B

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*

Sinônimos: P15; MTS2; TP15; CDK4I; INK4B; p15INK4b

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene encontra-se adjacente ao gene supressor de tumor CDKN2A, numa região que é frequentemente mutado e suprimido em uma ampla variedade de tumores. Este gene codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, que forma um complexo com CDK4 ou CDK6, e evita a ativação das quinases CDK. A proteína codificada tem como função regulação do crescimento de células e controla a progressão do ciclo celular G1. A expressão deste gene foi fortemente induzida por TGF beta, o que sugere o seu papel na inibição do crescimento induzida por TGF beta. Dois splicings alternativos deste gene codificam proteínas.

Artigos relacionados: marcador de vários tipos de câncer.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: sete resultados foram relacionados a esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04068	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa04350	Vias de sinalização do TGF-beta - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os membros da família TGF-beta, que incluem, activinas e...
hsa05166	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...
hsa05200	Vias do câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa05203	Carcinogénesis viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...
hsa05222	Câncer de pulmão - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres nos países industrializados. Não-...

BBC3

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *BCL2 binding component 3*

Sinônimos: JFY1; PUMA; JFY-1

Descrição do NCBI sobre a função desse gene: Este gene codifica um membro de proteínas da família Bcl-2. Este membro da família pertence BH3-only, subclasse de pró-apoptóticos. A proteína coopera com proteínas ativadores diretos para induzir a permeabilização da membrana mitocondrial exterior e apoptose. Pode ligar-se a membros da família Bcl-2, anti-apoptóticos para induzir disfunção mitocondrial e ativação de caspases. Devido ao seu papel pro-apoptótico, este gene é um potencial alvo da droga para a terapia do câncer e para a lesões do tecido.

Artigos relacionados: regulador de apoptose (Exogenous p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) decreases growth of lung cancer A549 cells.Liu CJ, *et al.* Asian Pac J Cancer Prev, 2015. PMID 25684518)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: cinco resultados foram relacionados a esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04210	Apoptose - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A apoptose é um processo geneticamente programados para a eliminação das células danificadas ou redundantes por um ...
hsa04115	Via de sinalização do p53 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Ativação do p53 é induzida por um número de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, o stress oxidativo e ...
hsa04390	Hippo via de sinalização - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Sinalização Hippo é uma via de sinalização evolutivamente conservada que controla tamanho do órgão de moscas ...
hsa05016	Doença de Huntington's - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A doença de Huntington (DH) é uma doença autossômica dominante neurodegenerativa que afeta principalmente m ...
hsa05162	Sarampo - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus do sarampo (VS) é altamente contagioso e leva a morte infantil em todo o mundo. Humanos são a unic...

BACH1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1

Sinônimos: BACH-1; BTBD24

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um fator de transcrição que pertence ao tipo de *cap'n'collar*. A proteína codificada contém amplos domínios. Estes domínios BTB / POZ facilitam interações proteína-proteína e formação de homo- e/ou hetero-oligómeros. Quando esta proteína codificada forma um heterodímero com MafK, ela funciona como um repressor de elemento de reconhecimento Maf (MARE) e a transcrição é reprimida. Várias splicings alternativos foram identificados para este gene.

Artigos relacionados: senescência celular e alzaimer

[Bach1 overexpression in Down syndrome correlates with the alteration of the HO-1/BVR-a system: insights for transition to Alzheimer's disease.](#)Di Domenico F, *et al.* J Alzheimers Dis, 2015. PMID 25391381,

[\[Regulation of cellular senescence by Bach1\].](#)Igarashi K, *et al.* Nihon Rinsho, 2009 Jul. PMID 19591297

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: nenhum resultado relacionado com esse gene

QUERCETINA - SUBEXPRESSOS

Foram selecionados genes de vias que apresentavam mais 100% de alteração na presença da quercetina, com exceção dos genes que já foram anteriormente descritos seguem abaixo as instruções sobre os demais.

CCNB1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin B1*

Sinônimos: CCNB

Descrição do NCBI sobre a função desse gene A proteína codificada por este gene é uma proteína reguladora envolvida em mitose. Os produtos do gene complexam com a p34 (cdc2), para formar o fator de promoção da maturação (MPF). Dois transcritos alternativos foram encontrados, um transcrito constitutivamente expresso e um transcrição regulado pelo ciclo celular, que é expresso predominantemente durante a fase G2/M. Os diferentes transcritos resultam da utilização de locais de iniciação de transcrição alternativo.

Artigos relacionados: mostram trabalhos relacionados ao ciclo celular e como sua subexpressão pode causar morte celular.

(Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase. Müllers E, et al. Cell Cycle, 2014. PMID 25486360.

Cyclin B1 overexpression induces cell death independent of mitotic arrest. Eichhorn JM, et al. PLoS One, 2014. PMID 25415322)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: cinco resultados relacionados com esse gene:

Entrada	Nome	Descrição
hsa04068	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...

<u>hsa04114</u>	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...
<u>hsa04115</u>	Via de sinalização do p53 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Ativação do p53 é induzida por um número de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, o stress oxidativo e ...
<u>hsa04914</u>	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Oócitos de <i>Xenopus</i> são naturalmente detido em G2 da meiose I. A exposição a qualquer insulina/IGF-1 ou o s ...

CCNB2

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cyclin B2*

Sinônimos: HsT17299

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A ciclina B2 é um membro da família da ciclina, especificamente as ciclinas do tipo B. As ciclinas do tipo B, B1 e B2, associado com p34cdc2 e são componentes essenciais do mecanismo de regulação do ciclo celular. B1 e B2 diferem na sua localização subcelular. Ciclina B1 co-localiza nos microtúbulos, enquanto que a ciclina B2 está principalmente associada com a região de Golgi. A ciclina B2 também se liga ao fator de crescimento transformante beta RII e, assim, a ciclina B2/cdc2 pode desempenhar um papel-chave na transformação do fator de crescimento e controle do ciclo celular beta-mediada.

Artigos relacionados: Mostram relações com alguns tipos de genes e com a regulação do ciclo celular.

(The kinetics of G2 and M transitions regulated by B cyclins. Huang Y, et al. PLoS One, 2013. PMID 24324638, Free PMC Article)

(Elevated cyclin B2 expression in invasive breast carcinoma is associated with unfavorable clinical outcome. Shubbar E, et al. BMC Cancer, 2013 Jan 2. PMID 23282137, [Free PMC Article](#))

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: seis resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04068	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa04114	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...

<u>hsa04115</u>	Via de sinalização do p53 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Ativação do p53 é induzida por um número de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, o stress oxidativo e ...
<u>hsa04914</u>	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Oócitos de <i>Xenopus</i> são naturalmente detido em G2 da meiose I. A exposição a qualquer insulina/IGF-1 ou o s ...
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...

PLK1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *polo like kinase 1*

Sinônimos: PLK; STPK13

Descrição do NCBI sobre a função desse gene A proteína serina/tirosina quinase codificada por este gene pertence à subfamília CDC5/Polo. Ele é altamente expressa durante a mitose e níveis elevados encontram-se em muitos tipos diferentes de câncer. O esgotamento dessa proteína em células de câncer reduz significativamente a proliferação celular e induz a apoptose. Por isso, é um alvo para terapia de câncer.

Artigos relacionados: Mostram relações com a proliferação celular

(Mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Polo-like kinase 1.)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04114	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa04068	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
hsa04914	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Oócitos de <i>Xenopus</i> são naturalmente detido em G2 da meiose I. A exposição a qualquer insulina/IGF-1 ou o s ...

FZR1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *fizzy/cell division cycle 20 related 1*

Sinônimos: FZR; CDH1; FZR2; HCDH; HCDH1; CDC20C

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: sem descrição

Artigos relacionados: Trabalhos que mostram a influência desse gene na divisão celular.

(Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. Colombo SL, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010 Nov 2. PMID 20921411, Free PMC Article

Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. Sorensen CS, et al. Mol Cell Biol, 2000 Oct. PMID 11003657, Free PMC Article)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: três resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa04120	Ubiquitina proteólise mediada - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Proteína de ubiquitinação desempenha um papel importante em processos celulares de eucariotos. Principalmente funções ...
hsa04914	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Oócitos de <i>Xenopus</i> são naturalmente detido em G2 da meiose I. A exposição a qualquer insulina/IGF-1 ou o s ...

CDC20

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cell division cycle 20*

Sinônimos: CDC20A; p55CDC; bA276H19.3

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: CDC20 parece atuar como uma proteína reguladora, interagindo com várias outras proteínas em vários pontos do ciclo celular. Isso é necessário para dois processos dependentes de microtúbulos, movimento nuclear antes da anáfase e separação de cromossomas.

Artigos relacionados: Trabalhos que mostram a influência desse gene em alguns tipos de câncer. (Increased CDC20 expression is associated with development and progression of hepatocellular carcinoma. Li J, et al. Int J Oncol, 2014 Oct. PMID 25069850)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: três resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04114	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...
hsa04120	Ubiquitina proteólise mediada - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Proteína de ubiquitinação desempenha um papel importante em processos celulares de eucariotos. Principalmente funções ...
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa05166	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...
hsa05203	Carcinogénesis viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...

CDC25

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *cell division cycle 25*

Sinônimos: sal2

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Indutor da fase M.

Artigos relacionados: Trabalhos que mostram a influência desse gene na divisão celular (A yeast mitotic activator sensitises the shoot apical meristem to become floral in day-neutral tobacco. Vojvodová P, et al. Planta, 2013 Oct. PMID 23897296).

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: cinco resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa04914	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	... Uma p42 (MAPK) ativador] e a via da cinase / CDC25 polo-like como responsável pela ativação de H ...
hsa04114	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Oócitos de <i>Xenopus</i> são naturalmente detido em G2 da meiose I. A exposição a qualquer insulina/IGF-1 ou o s ...
hsa05206	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
hsa04010	MAPK signaling pathway - <i>Homo sapiens</i> (humano)	The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a highly conserved module that is involved in...

CDK1**Presente também:** sem outra ocorrência**Nome oficial:** *cyclin-dependent kinase 1***Sinônimos:** CDC2; CDC28A; P34CDC2

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A proteína codificada por este gene é um membro da família da serina/tirosina quinase. Esta proteína é uma subunidade catalítica do complexo de proteína-quinase altamente conservado conhecido como fator de promoção da fase M (MPF), o que é essencial para transições de fase G1/S e G2/M do ciclo celular eucariótico. Ciclinas mitóticas associar de forma estável com esta proteína funcionam como subunidades reguladoras. A atividade de quinase desta proteína é controlada pela acumulação de ciclina e destruição durante o ciclo celular. A fosforilação e a desfosforilação desta proteína também desempenham papéis reguladores importantes no controle do ciclo celular. Splicings alternativos codificam diferentes isoformas.

Artigos relacionados: Trabalhos que mostram a influência desse gene na divisão celular**Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG:** nove resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04114	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...
hsa04110	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
hsa04914	Maturação de oócitos mediada por progesterona - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Oócitos de <i>Xenopus</i> são naturalmente detido em G2 da meiose I. A exposição a qualquer insulina/IGF-1 ou o s ...
hsa05203	Carcinogênese viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...
hsa04115	Via de sinalização do p53 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Ativação do p53 é induzida por um número de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, o stress oxidativo e ...

<u>hsa04540</u>	Junção Gap - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Junções Gap contem canais intercelulares que permitem a comunicação direta entre o citos...
<u>hsa05168</u>	Herpes infecção simples - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da herpes simplex (VSH) são muito comuns em todo o mundo, com a prevalência de HSV-1...
<u>hsa05169</u>	Infecção por vírus de Epstein-Barr - <i>Homo sapiens</i> (humano)	vírus de Epstein-Barr (EBV) é um herpesvirus humano ubíquo que está associada com a oncogénese. EBV ...
<u>hsa05202</u>	Misregulation transcricional no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-

FBXO5

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *F-box protein 5*

Sinônimos: EMI1; FBX5; Fbxo31

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um membro da família de proteínas F-box, que é caracterizada por um motivo de cerca de 40 aminoácidos, F-box. As proteínas F-box constituem uma das quatro subunidades do complexo SCFS ubiquitina-ligase proteína chamada (SKP1-Cullin-F-box), cuja função é de ubiquitinação dependente da fosforilação. As proteínas F-box são divididas em 3 classes: Fbws contendo WD-40 domínios, FBLs que contêm repetições ricas em leucina, e os Fbxs contendo diferentes módulos de interação proteína-proteína ou não há motivos reconhecíveis. Esta proteína é semelhante a *xenopus early mitotic inhibitor-1 (Emi1)*, que é um regulador mitótico que interage com CDC20 e inibe a promoção da anáfase. Splicings alternativos codificam diferentes isoformas.

Artigos relacionados: Trabalhos que mostram a influência desse gene na divisão celular

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: um resultado relacionado com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04114	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...

POLE

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *polymerase (DNA) epsilon, catalytic subunit*

Sinônimos: FILS; POLE1; CRCS12

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica a subunidade catalítica epsilon da DNA polimerase. A enzima está envolvida na reparação do DNA e a replicação do DNA cromossômico. As mutações neste gene têm sido associadas com câncer colorretal e dismorfismo facial, imunodeficiência, e baixa estatura.

Artigos relacionados: Trabalhos que mostram a influência desse gene na divisão celular e com alguns tipos de câncer (Polymerase ϵ (POLE) ultra-mutated tumors induce robust tumor-specific CD4+ T cell responses in endometrial cancer patients. Bellone S, et al. Gynecol Oncol, 2015 Jul. PMID 25931171)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: nove resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04114	Meiose do oócito - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Durante a meiose, uma única rodada de replicação do DNA é seguido por duas rodadas de segregação cromossômica...
hsa05131	Shigellosis - <i>Homo sapiens</i> (humano)	...ctors. VirG induces actin polymerization at one pole of the bacteria, allowing the bacteria to sprea...
hsa01100	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00230	Metabolismo da purina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00240	Metabolismo da pirimidina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa03410	Reparação por excisão de base - <i>Homo sapiens</i> (humano)	reparação por excisão de base é a via de reparação do dano ao DNA predominante para o processamento de pequeno...

<u>hsa03030</u>	Replicação do DNA - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Uma rede complexa de proteínas que interagem e enzimas é necessária para a replicação do ADN. Geralmente, DN...
<u>hsa03420</u>	Reparação de excisão por nucleotídeos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Reparação de excisão de nucleotídeos (NER) é um mecanismo para reconhecer e reparar danos no DNA volumosos causada por c ...
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...

POLE2

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *polymerase (DNA) epsilon 2, accessory subunit*

Sinônimos: DPE2

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Sem descrição

Artigos relacionados: Associam esse gene com alguns tipos de câncer, em especial câncer de colo retal (Mutations/polymorphisms in the 55 kDa subunit of DNA polymerase epsilon in human colorectal cancer. Zhou Q, et al. Cancer Genomics Proteomics, 2009 Nov-Dec. PMID 20065316)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: sete resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa01100	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00230	Metabolismo da purina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00240	Metabolismo da pirimidina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa03410	Reparação por excisão de base - <i>Homo sapiens</i> (humano)	reparação por excisão de base é a via de reparação do dano ao DNA predominante para o processamento de pequeno...
hsa03030	Replicação do DNA - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Uma rede complexa de proteínas que interagem e enzimas é necessária para a replicação do ADN. Geralmente, DN...
hsa03420	Reparação de excisão por nucleotídeos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Reparação de excisão de nucleotídeos (NER) é um mecanismo para reconhecer e reparar danos no DNA volumosos causada por c ...
hsa05166	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...

POLA1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: polymerase (DNA) epsilon, catalytic subunit

Sinônimos: FILS; POLE1; CRCS12

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica a subunidade catalítica epsilon da DNA polimerase. A enzima está envolvido na reparação do DNA e a replicação do DNA cromossômico. As mutações neste gene têm sido associadas com câncer colorctal e dismorfismo facial, imunodeficiência, e baixa estatura.

Artigos relacionados: Mostram sua função primária como codificadora da DNA polimerase.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa01100	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00230	Metabolismo da purina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00240	Metabolismo da pirimidina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa03030	Replicação do DNA - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Uma rede complexa de proteínas que interagem e enzimas é necessária para a replicação do ADN. Geralmente, DN...

POLA2

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: polymerase (DNA) alpha 2, accessory subunit

Sinônimos: sem sinonímia

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: sem descrição

Artigos relacionados: Mostram sua função primária como codificadora da DNA polimerase.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
<u>hsa01100</u>	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
<u>hsa00230</u>	Metabolismo da purina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
<u>hsa00240</u>	Metabolismo da pirimidina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
<u>hsa03030</u>	Replicação do DNA - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Uma rede complexa de proteínas que interagem e enzimas é necessária para a replicação do ADN. Geralmente, DN...

PRIM1

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *primase (DNA) subunit 1*

Sinônimos: p49

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A replicação de DNA em células eucarióticas é efetuada por um mecanismo de replicação cromossômico complexo, em que dois componentes são chave a alfa DNA-polimerase e primases. Primase, que é um heterodímero com uma subunidade pequena e uma subunidade grande e sintetiza pequenos iniciadores de RNA para os fragmentos de Okazaki durante a replicação descontínua do DNA. A proteína codificada por este gene é pequena, 49 kDa.

Artigos relacionados: Mostram a relação desse gene com a DNA polimerase.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa01100	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00230	Metabolismo da purina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00240	Metabolismo da pirimidina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa03030	Replicação do DNA - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Uma rede complexa de proteínas que interagem e enzimas é necessária para a replicação do ADN. Geralmente, DN...

PRIM2

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *primase (DNA) subunit 2*

Sinônimos: p58; PRIM2A

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica a subunidade de 58 kDa da DNA primase, uma enzima que desempenha um papel fundamental na replicação do DNA. A proteína codificada forma um heterodímero com uma subunidade de 49 kDa. Este heterodímero funciona como uma RNA-polimerase guiada por DNA para sintetizar pequenos iniciadores de RNA que são utilizados para criar fragmentos de Okazaki na replicação descontínua do DNA. O splicing alternativo deste gene resulta em múltiplas transcritos variantes. Este gene possui um pseudogene relacionado, que também está presente no cromossoma 6.

Artigos relacionados: Mostram a relação desse gene com a replicação do DNA.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: quatro resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa01100	Vias metabólicas - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00230	Metabolismo da purina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa00240	Metabolismo da pirimidina - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa03030	Replicação do DNA - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Uma rede complexa de proteínas que interagem e enzimas é necessária para a replicação do ADN. Geralmente, DN...

CENPF

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *centromere protein F*

Sinônimos: CENF; hcp-1; CILD31; STROMS; PRO1779

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica uma proteína que se associa com o complexo centrômero-centrômero. A proteína é um componente da matriz nuclear durante a fase G2 da interfase. No final de G2 a proteína se associa com a cinetocore e mantém essa associação através do início da anáfase. A localização desta proteína sugere que ela pode desempenhar um papel na segregação cromossomal durante a mitose. Pensa-se que pode formar homodímeros ou heterodímeros. Os auto-anticorpos contra esta proteína foram encontrados em pacientes com câncer ou na rejeição de enxertos.

Artigos relacionados: Mostram a relação desse gene com a mitose e sua relação com o centrômero.

(Mitosin and pHH3 predict poorer survival in astrocytomas WHO grades II and III. Varughese RK, et al. J Clin Pathol, 2016 Jan. PMID 26188054

Centromere protein F includes two sites that couple efficiently to depolymerizing microtubules. Volkov VA, et al. J Cell Biol, 2015 Jun 22. PMID 26101217, Free PMC Article)

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: sem resultados relacionados com esse gene

CTNNB1**Presente também:** sem outra ocorrência**Nome oficial:** *catenin beta 1***Sinônimos:** CTNNB; MRD19; armadillo

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: A proteína codificada por este gene faz parte de um complexo de proteínas que constituem junções aderentes (AJs). AJs são necessárias para a criação e manutenção de camadas de células epiteliais através do controle do crescimento celular e adesão entre as células. A proteína codificada também ancora o citoesqueleto de actina e pode ser responsável pela transmissão do sinal de inibição de contato que faz com que as células parem de se dividir uma vez que a folha epitelial é completada. Finalmente, esta proteína liga-se ao produto do gene de APC, que é mutado na polipose adenomatosa do cólon. Mutações nesse gene são uma causa de câncer colorretal (CRC), pilomatrixoma (PTR), meduloblastoma (MDB) e cancro do ovário. Três variantes de transcritos que codificam a mesma proteína foram encontrados para este gene.

Artigos relacionados: Mostram a relação desse gene com a desenvolvimento de tecidos e com alguns tipos de câncer.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: vinte resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa04520	Junções aderentes - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Junções aderentes tipo célula-célula (AJ), são o tipo mais comum de adesões intercelulares, são importantes f ...
hsa05200	Vias do câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	-
hsa05205	Proteoglicanos em câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Muitos proteoglicanos (PGs) no microambiente do tumor tem se mostrado macromoléculas chave que ...
hsa05213	Câncer endometrial - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Cancro do endométrio (CE) é a neoplasia maligna ginecológica mais comum ...
hsa04015	Via de sinalização do Rap1 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Rap1 é uma pequena GTPase que controla diversos processos, tais como a adesão celular, junção célula-célula...
hsa04550	Vias de sinalização que regulam a pluripotência das	As células estaminais pluripotentes (PSCs) são células básicas, com uma

	células estaminais- <i>Homo sapiens</i> (humano)	capacidade de auto-renovação indefinida e o poten ...
hsa04670	Migração transendotelial de leucócitos - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A migração de leucócitos do sangue para os tecidos é vital para a vigilância imunitária e inflamação. ...
hsa04919	Via de sinalização de hormônio da tireoide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios da tireoide (THs) são importantes reguladores de crescimento, desenvolvimento e metabolismo. A ação...
hsa05210	Câncer cólon retal - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer colorretal (CCR) é a segunda maior causa de mortes relacionadas ao câncer nos países ocidentais. C...
hsa04310	Via de sinalização do Wnt - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Proteínas Wnt são necessários para os processos de desenvolvimento de base, tais como ce ...
hsa04390	Hippo via de sinalização - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Sinalização Hippo é uma via de sinalização evolutivamente conservada que controla tamanho do órgão de moscas ...
hsa04510	Adesão focal - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Adesões de células-matriz desempenham um papel essencial em processos biológicos importantes, incluindo a motilidade celular ...
hsa04530	Junções firmes - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Tight junctions</i> epitelial (TJS) são compostas por pelo menos três tipos de - occl proteína transmembranar ...
hsa04916	Melanogenesis - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A melanina é um pigmento cutâneo que desempenha um papel crítico na camuflagem, o mimetismo, comunicação social e pr ...
hsa05100	Invasão bacteriana de células epiteliais - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Muitas bactérias patogênicas podem invadir células fagocíticas e não fagocíticas e colonizar-los intracelu ...

<u>hsa05130</u>	Infecção patogênica de <i>Escherichia coli</i> - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC) e <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) estão intimamente relacionados patogênico ...
<u>hsa05166</u>	Infecção pelo HTLV-I - <i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> (HTLV-1) é um retrovírus patogénico que está associado com adultos...
<u>hsa05215</u>	Câncer de próstata - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de próstata constitui um importante problema de saúde nos países ocidentais. Ele é o mais frequentemente de...
<u>hsa05216</u>	Câncer de tireoide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de tireóide é a neoplasia maligna endócrina mais comum e representa a maioria dos endócrino ca ...
<u>hsa05217</u>	Carcinoma basocelular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O câncer de pele é o câncer mais comum em caucasianos e carcinomas basocelulares (CBC) conta f ...

IRF3

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *interferon regulatory factor 3*

Sinônimos: IIAE7

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica um membro da família do fator de transcrição reguladora interferon (IRF). A proteína codificada é encontrada numa forma citoplasmática inativa que após a serina/treonina fosforilação forma um complexo com CREBBP. Este complexo transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição dos interferons alfa e beta, bem como outros genes induzidos por interferon. Splicing alternativos codificam várias isoformas para este gene.

Artigos relacionados: regulação do metabolismo do interferon.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: onze resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa05164	Influenza A - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A gripe é uma doença respiratória contagiosa causada pela infecção pelo vírus da Influenza A...
hsa05161	Hepatite B - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da hepatite B (HBV) é um vírus envelopado e contém uma cadeia dupla parcialmente de relaxada...
hsa05203	Carcinogênese viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...
hsa04620	Via de sinalização do receptor Toll-like - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Famílias específicas de receptores de reconhecimento de padrões são responsáveis pela detecção de patógenos microbianos ...
hsa04623	via de detecção de DNA citosólica - <i>Homo sapiens</i> (humano)	famílias específicas de receptores de reconhecimento de padrões são responsáveis pela detecção do DNA estrangeiro de no ...
hsa05133	Coqueluche - <i>Homo sapiens</i> (humano)	coqueluche, também conhecida como tosse convulsa, é uma doença infecciosa aguda causada por uma bactéria ...

<u>hsa05160</u>	Hepatite C - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus da hepatite C (VHC) é uma causa importante de doenças do fígado crónica. O VHC emprega várias estratégias ...
<u>hsa05162</u>	Sarampo - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O vírus do sarampo (VS) é altamente contagioso e leva a morte infantil em todo o mundo. Humanos são a unic...
<u>hsa05168</u>	Herpes infecção simples - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da herpes simplex (VSH) são muito comuns em todo o mundo, com a prevalência de HSV-1...
<u>hsa05169</u>	Infecção por vírus de Epstein-Barr - <i>Homo sapiens</i> (humano)	vírus de Epstein-Barr (EBV) é um herpesvirus humano ubíquo que está associada com a oncogénese. EBV ...
<u>hsa04622</u>	Via de sinalização do receptor RIG-I-like - <i>Homo sapiens</i> (humano)	famílias específicas de receptores de reconhecimento de padrões são responsáveis pela detecção de patógenos virais e ...

EP300

Presente também: sem outra ocorrência

Nome oficial: *E1A binding protein p300*

Sinônimos: p300; KAT3B; RSTS2

Descrição do NCBI sobre a função deste gene: Este gene codifica a proteína co-ativadora da transcrição p300 celular adenovírus E1A-associado. Ele funciona como acetiltransferase de histona que regula a transcrição através de remodelação da cromatina e é importante nos processos de proliferação e diferenciação celular. Ele medeia a regulação de genes por cAMP-se e liga-se especificamente à proteína CREB fosforilada. Este gene também tem sido identificado como um co-ativador de HIF1A (hipoxia-inducible factor 1 alfa), e assim desempenha um papel na estimulação de genes induzidos por hipoxia tais como VEGF. Os defeitos neste gene são uma causa da síndrome de Rubinstein-Taybi, e podem também desempenhar um papel no câncer epitelial.

Artigos relacionados: mostram a relação desse gene com a síndrome de Rubinstein-Taybi.

Vias relacionadas a esse gene segundo o KEEG: vinte resultados relacionados com esse gene

Entrada	Nome	Descrição
hsa05203	Carcinogênese viral - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Há uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento de malignidades humanas. Sabemos agora ...
hsa05206	MicroRNAs no câncer - <i>Homo sapiens</i> (humano)	MicroRNA (miARN) é um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes de 21 - 23 nucleídeos de comprimento, ...
hsa05161	Hepatite B - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Vírus da hepatite B (HBV) é um vírus envelopado e contém uma cadeia dupla parcialmente relaxada...
hsa05211	Célula de carcinoma renal - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Células de câncer renal (RCC) são responsáveis por ~ 3% das neoplasias malignas humanas e sua incidência parece estar aumentando ...
hsa04024	Via de sinalização do cAMP - <i>Homo sapiens</i> (humano)	cAMP é um dos segundos mensageiros mais comuns e universais, e a sua formação é promovida por Ade ...

<u>hsa04066</u>	Via de sinalização do HIF-1 - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A hipóxia induzida pelo fator 1 (HIF-1) é um fator de transcrição que funciona como um regulador mestre de ...
<u>hsa04068</u>	Via de sinalização FoxO - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A família forkhead box O (FOXO) de factores de transcrição regula a expressão de genes em celu...
<u>hsa04110</u>	Ciclo celular - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Progressão do ciclo celular mitótico é realizado através de uma sequência reprodutível de eventos, réplica do ADN ...
<u>hsa04310</u>	Via de sinalização do Wnt - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Proteínas Wnt são necessários para os processos de desenvolvimento de base, tais como ce ...
<u>hsa04330</u>	Via de sinalização Notch - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A via de sinalização Notch é um mecanismo de sinalização intracelular altamente conservado po ...
<u>hsa04350</u>	Vias de sinalização do TGF-beta - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os membros da família TGF-beta, que incluem, activinas e...
<u>hsa04520</u>	Junções aderentes - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Junções aderentes tipo célula-célula (AJ), são o tipo mais comum de adesões intercelulares, são importantes f ...
<u>hsa04630</u>	Via de sinalização Jak-STAT - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A via de transdução e ativação de transcrição Janus quinase (JAK/STAT) é uma...
<u>hsa04720</u>	Potenciação de longa duração - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Potenciação do hipocampo a longo prazo (LTP), é um aumento de longa duração da eficácia sináptica, é o Molec ...
<u>hsa04916</u>	Melanogenesis - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A melanina é um pigmento cutâneo que desempenha um papel crítico na camuflagem, o mimetismo, comunicação social e pr ...
<u>hsa04919</u>	Via de sinalização de hormônio da tireoide - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Os hormônios da tireoide (THs) são importantes reguladores de crescimento, desenvolvimento e metabolismo. A ação...

<u>hsa04922</u>	Via de sinalização do glucagon - <i>Homo sapiens</i> (humano)	O glucagon é convencionalmente considerado como um hormônio contra-reguladora de insulina e desempenha um crítico ...
<u>hsa05016</u>	Doença de Huntington's - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A doença de Huntington (DH) é uma doença autossômica dominante neurodegenerativa que afeta principalmente m ...
<u>hsa05152</u>	Tuberculose - <i>Homo sapiens</i> (humano)	Tuberculose, ou TB, é uma doença infecciosa causada pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Um terço da ...
<u>hsa05164</u>	Influenza A - <i>Homo sapiens</i> (humano)	A gripe é uma doença respiratória contagiosa causada pela infecção pelo vírus da Influenza A...