

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DA PLANTA
ALIMENTÍCIA NÃO-CONVENCIONAL *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott EM
CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae***

NATHALIA SOARES CAMARGO

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DA PLANTA
ALIMENTÍCIA NÃO-CONVENCIONAL *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott EM
CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae***

NATHALIA SOARES CAMARGO

Sob Orientação do Professor
Dr. Cristiano Jorge Riger

Coorientação do Professor
Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica, RJ
Novembro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C173a Camargo, Nathalia Soares, 1994-
Avaliação do potencial antioxidante do extrato da
planta alimentícia não convencional *Xanthosoma
sagittifolium* l. Schott em células de *Saccharomyces
cerevisiae* / Nathalia Soares Camargo. - Rio de
Janeiro, 2023.
74 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.
Coorientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Atividade Antioxidante. 2. Planta Alimentícia
não-convencional . 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4.
Estresse Oxidativo. I. Riger, Cristiano Jorge , 1972
, orient. II. Chaves, Douglas Siqueira de Almeida,
1981-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

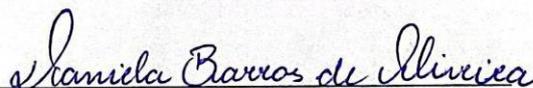
NATHALIA SOARES CAMARGO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/11/2023



Cristiano Jorge Riger Dr. UFRRJ
(Orientador)



Daniela Barros de Oliveira Dr^a. UENF



Daniela Cosentino Gomes Dr^a. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pelo maravilhoso dom da vida e por Sua bondade ao me permitir viver essa significativa e gratificante realização profissional.

Desejo agradecer ao meu orientador, Cristiano Riger, por sua orientação sábia, paciência e apoio constante ao longo deste processo. Sua experiência e auxílio foram inestimáveis, dedico o meu crescimento acadêmico e profissional às suas orientações.

Aos meus pais, Carlos César e Patricia, agradeço de coração pelo amor incondicional, incentivo e compreensão que me proporcionaram ao longo dos anos.

Agradeço por todo o apoio emocional e por sempre terem acreditado no meu potencial. Chegar até aqui não teria sido possível sem vocês, que abdicaram de muitos dos seus próprios sonhos para tornar os meus realidade.

Agradeço ao meu namorado William por estar ao meu lado na etapa final desta jornada. Seu apoio, amor e compreensão foram essenciais, sua presença trouxe conforto nos momentos de incerteza.

Aos amigos do LEOM, Aline, Dannel, Edlene, Jéssica, João, Rodrigo e Tamires que compartilharam suas experiências e conhecimentos, contribuindo para discussões significativas e proporcionando uma jornada muito mais leve. Agradeço de coração.

Ao meu coorientador Douglas Siqueira e LQBioN por todo apoio e colaboração.

Por fim, gostaria de estender meu reconhecimento à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por disponibilizar recursos e acesso a informações necessárias para minha pesquisa.

Este trabalho é o resultado de um esforço coletivo e, mais uma vez, agradeço a todos que desempenharam um papel em minha jornada acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CAMARGO, Nathalia Soares. **Avaliação do potencial antioxidante do extrato da planta alimentícia não convencional *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott em células de *Saccharomyces cerevisiae***. 2023. 74 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

RESUMO

Plantas alimentícias não convencionais (PANC) é o termo dado ao grupo de plantas que possui uma ou mais partes comestíveis, sendo nativas ou cultivadas e que não estão incluídas na alimentação cotidiana da população. Um exemplo é a *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott (taioba), para a qual estudos apontam uma série de potenciais atividades atribuídas à esta planta, como propriedades anti-inflamatórias, antidiabéticas e antioxidantes. A caracterização química da *X. sagittifolium* (L.) descreve a presença de flavonoides, compostos encontrados em plantas que desempenham funções essenciais em processos biológicos, incluindo o metabolismo redox, devido às suas propriedades antioxidantes. Quando introduzida na alimentação, pode auxiliar o organismo a manter a homeostase redox celular, contribuindo para evitar o quadro de estresse oxidativo, responsável por causar uma série de danos em estruturas celulares. No entanto, é importante inteirar-se mais profundamente sobre os compostos existentes nesta planta e analisar de forma mais detalhada a influência da sua atividade antioxidante utilizando um modelo biológico que leve em conta condições fisiológicas e interações metabólicas. Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade e o potencial antioxidante do extrato aquoso de *X. sagittifolium* em um modelo eucariótico utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, foram feitos ensaios de viabilidade celular, funcionalidade mitocondrial, peroxidação lipídica e níveis de oxidação intracelular. Duas cepas de *S. cerevisiae* foram usadas neste estudo, uma controle e uma deletada no gene *YAP1*, um fator de transcrição relacionado à defesas antioxidantes na levedura. O perfil químico do extrato aquoso de *X. sagittifolium* foi verificado por HPLC-DAD. É relevante destacar que, ao analisar diferentes concentrações do extrato em ambas as cepas utilizadas neste estudo, não foram observados citotoxicidade. Essa constatação, ao ser ampliada para uma investigação mais específica da funcionalidade mitocondrial, revelou que o extrato, não demonstrou ser tóxico. A análise do efeito do extrato na viabilidade celular antioxidante revelou que o pré-tratamento com o extrato na concentração de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ é capaz de proporcionar proteção para ambas as cepas frente ao agente estressor utilizado (H_2O_2) na concentração de $1,0 \text{ mM}$. Nos ensaios antioxidantes, para a cepa controle o extrato de *X. sagittifolium* foi capaz de promover proteção antioxidante para as células. No entanto, o mesmo não foi observado na cepa mutante, onde apenas nos ensaios de viabilidade antioxidante o extrato de *X. sagittifolium* foi capaz de mostrar proteção às células, enquanto nos demais ensaios antioxidantes a cepa revelou um maior grau de sensibilidade frente ao estresse oxidativo. O perfil químico do extrato indica a presença de flavonoides, correspondendo a 15 dos 17 picos obtidos pelo cromatograma. Neste estudo, foi indicado que o extrato demonstrou não ser tóxico nas concentrações testadas e exibiu propriedades antioxidantes. Essas propriedades antioxidantes podem ser atribuídas à presença de flavonoides no extrato, sugerindo que a taioba tem o potencial de ser uma fonte promissora de compostos com ação antioxidante.

Palavras-chave: Antioxidante; PANC; *Saccharomyces cerevisiae*.

CAMARGO, Nathalia Soares. **Evaluation of antioxidant potential of Unconventional Food Plant extract *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott at *Saccharomyces cerevisiae* cells.** 2023. 73 p. Dissertation (Master in Chemistry). Chemistry Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

ABSTRACT

Non-Conventional Edible Plants (PANC) is the term given to a group of plants that have one or more edible parts, whether native or cultivated, and are not included in the daily diet of the population. An example is *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott (taioba), for which studies indicate a series of potential activities attributed to this plant, such as anti-inflammatory, antidiabetic, and antioxidant properties. The chemical characterization of *X. sagittifolium* (L.) describes the presence of flavonoids, compounds found in plants that play essential roles in biological processes, including redox metabolism, due to their antioxidant properties. When introduced into the diet, it can help the body maintain cellular redox homeostasis, contributing to preventing oxidative stress, which can lead to various damages. However, it is important to delve deeper into the compounds present in this plant and analyze in more detail the influence of its antioxidant activity using a biological model that takes into account physiological conditions and metabolic interactions. Considering this, the objective of this study was to evaluate the toxicity and antioxidant potential of the aqueous extract of *X. sagittifolium* in a eukaryotic model using *Saccharomyces cerevisiae* cells. For this purpose, assays were conducted on cell viability, mitochondrial functionality, lipid peroxidation, and intracellular oxidation levels. Two strains of *S. cerevisiae* were used in this study, one being a control strain and the other deleted in the YAP1 gene, a transcription factor related to antioxidant defenses in yeast. The chemical profile of the aqueous extract of *X. sagittifolium* was verified by HPLC-DAD. It is noteworthy that, upon analyzing different concentrations of the extract in both strains used in this study, no cytotoxicity was observed. This finding, when expanded to a more specific investigation of mitochondrial functionality, revealed that the extract did not demonstrate toxicity. The analysis of the extract's effect on antioxidant cell viability revealed that pre-treatment with the extract at a concentration of 0.6 mg L⁻¹ can provide protection for both strains against the stressor agent used (H₂O₂) at a concentration of 1.0 mM. In antioxidant assays, for the control strain, the *X. sagittifolium* extract was able to promote antioxidant protection for cells. However, the same was not observed in the mutant strain, where only in antioxidant viability assays did the *X. sagittifolium* extract demonstrate protection, while in other antioxidant assays, the strain showed a higher degree of sensitivity to oxidative stress. The chemical profile of the extract indicates the presence of flavonoids, corresponding to 15 of the 17 peaks obtained in the chromatogram. In this study, it was indicated that the extract demonstrated non-toxicity at the tested concentrations and exhibited antioxidant properties. These antioxidant properties can be attributed to the presence of flavonoids in the extract, suggesting that taioba has the potential to be a promising source of compounds with antioxidant action.

Keywords: Antioxidant; PANC; *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Exemplos de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs): *Pereskia aculeata* (A), *Portulaca oleracea* (B), *Taraxacum officinale* (C) e *Xanthosoma sagittifolium* (D). 13
- Figura 2. Inflorescência do lírio da paz em formato de espádice envolta por espata 14
- Figura 3. Estruturas moleculares do ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico e ácido oleico **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 4. Estrutura básica de flavonoides e suas classificações 18
- Figura 5. Via metabólica de flavonoides 19
- Figura 6. Molécula de galangina em estruturas de ressonância de estabilização 21
- Figura 7. Estrutura de um flavonoide com alternativas para pontos de coordenação com metais. 22
- Figura 8. Esquematização da produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons 24
- Figura 9. Biomarcadores de estresse oxidativo 25
- Figura 10. Produção de espécies reativas de oxigênio na cadeia respiratória 27
- Figura 11. Células de *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741). 28
- Figura 12. Gráfico de proliferação celular em escala Log x Tempo em dias 30
- Figura 13. Reação de condensação de malonaldeído e ácido tiobarbitúrico a partir de peroxidação lipídica 37
- Figura 14. Perfil cromatográfico do extrato de folha de taioba por CLAE-DAD 39
- Figura 15. Espectro UV (A) correspondente ao pico 9 e estrutura molecular da isoorientina. Espectro UV (B) correspondente ao pico 10 e estrutura molecular da orientina. Espectro UV (C) correspondente ao pico 13 e estrutura molecular da isovitexina 41
- Figura 16. Esquema da conversão por oxirredução da resazurina para resorufina por agentes redutores gerados em células metabolicamente ativas 44
- Figura 17. Ensaio qualitativo com resazurina utilizando a cepa controle (BY4741). Linha A: Suspensões celulares contendo concentrações decrescentes do extrato aquoso de *X. sagittifolium*. Linha B: controle negativo (suspensão celular) e controle positivo (suspensão celular) e controle positivo (suspensão celular na presença de peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM) 44
- Figura 18. Ensaio qualitativo com resazurina utilizando a cepa mutante ($\Delta yap1$). Linha A: Suspensões celulares contendo concentrações decrescentes do extrato aquoso de *X. sagittifolium*. Linha B: controle negativo (suspensão celular) e controle positivo de toxicidade (suspensão celular na presença de peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM). 45

Figura 19. Gráficos do ensaio quantitativo de toxicidade por viabilidade celular x tratamento na cepa BY4741 em meio YPD (A) e meio YPGly (B). Exposição ao extrato de <i>X. sagittifolium</i> na concentração de 0,6 mg.mL ⁻¹ por 2 horas	47
Figura 20. Gráficos do ensaio quantitativo de toxicidade por viabilidade celular x tratamento na cepa BY4741 em meio YPD (A) e meio YPGly (B). Exposição ao extrato de <i>X. sagittifolium</i> na concentração de 0,6 mg mL ⁻¹ por 2 horas	48
Figura 21. Formação de espécies radiculares lipídicas e do malonaldeído (MDA).....	50
Figura 22. Gráfico da avaliação da peroxidação lipídica na cepa controle. Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato (0,6 mg.mL ⁻¹), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1h.....	50
Figura 23. Gráfico de avaliação da peroxidação lipídica na cepa mutante. Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato (0,6 mg mL ⁻¹), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1h.....	52
Figura 24. Gráfico da avaliação da oxidação intracelular na cepa BY4741. Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato (0,6 mg mL ⁻¹), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (15,0 mM) por 1h.....	54
Figura 25. Gráfico da avaliação da oxidação intracelular na cepa <i>Δyap1</i> . Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato (0,6 mg mL ⁻¹), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (15,0 mM) por 1h.....	54
Figura 26. Gráfico de viabilidade antioxidante celular da cepa BY4741. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H ₂ O ₂ (1,0 mM) por 1h após o pré-tratamento com o extrato (0,6 mg mL ⁻¹) por 2h	57
Figura 27. Gráfico de viabilidade celular antioxidante da cepa <i>Δyap1</i> . Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H ₂ O ₂ (1,0 mM) por 1h após o pré-tratamento com o extrato (0,6 mg mL ⁻¹) por 2h	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de gradiente utilizado para a realização da CLAE: fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detector de UV a 254 nm e 365 nm. Volume de injeção de 20 mL..... 33

Tabela 2. Descrição de cada pico encontrado de acordo com seu tempo de retenção e porcentagem; composto presente na amostra de acordo com padrões testados 40

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

CAT – Catalase

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Com detecção por Arranjo de Diodos

CTT1 – Catalase

CHS – Chalcona Sintase

CHI – Chalcona Isomerase

CoA – Coenzima A

DCF – Diclorofluorescena

DFR – Diidroflavonol-4-redutase

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EDTA – cido Etilenodiaminotetraacético

EROs – Espécies Reativas de Oxignio

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

FeIVO – Oxiferril

FNS I – Flavona Sintase I

FNS II – Flavona Sintase II

F3H – Flavanona-3-hidroxilase

F3'H – Flavonol 3'-hidroxilase

F3',5'H – Flavonol 3',5'-hidroxilase

FLS – Flavonol Sintase

GPx – Glutaciona Peroxidase

GSH – Glutaciona Reduzida

GSSG – Glutaciona Oxidada

GR – Glutaciona Redutase

H₂DCFDA – Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

IFS – Isoflavona Sintase

LDOX – Leucoantocianidina Dioxigenase

MDA – Malonaldeído

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato de Hidrogênio

NRF2 – Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2

PANC – Planta Alimentícia Não Convencional

PAL – Fenilalanina Amonialiase

SH – Sulfidril

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

TRX2 – Tiorredoxina

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UV – Ultravioleta

XO – Xantina Oxidase

Yap1 – Yeast Associated Protein 1

YPD – Yeast-Peptone-Dextrose

YPGly – Yeast-Peptone-Glycerol

8-OhdG – 8-hidróxidesoxiguanosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	PANC	12
1.1.1	Familia Araceae	14
1.1.2	<i>Xanthosoma sagittifolium</i> L. Schott	15
1.2	Antioxidantes	16
1.2.1	Flavonoides	17
1.3	Estresse oxidativo	22
1.4	Modelo biológico	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Material Vegetal	33
3.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	33
3.3	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.4	Meios de Cultura	34
3.5	Repique	34
3.6	Inóculo	34
3.7	Avaliação da Toxicidade do Extrato de <i>X. Sagittifolium</i> por Resazurina	35
3.8	Avaliação da Toxicidade do Extrato de <i>X. Sagittifolium</i> por Viabilidade Celular 35	
3.9	Pré-Tratamento com Extrato e Peróxido de Hidrogênio	36
3.10	Viabilidade Celular Antioxidante	36
3.11	Peroxidação da Membrana Lipídica	36
3.12	Disfunção Mitocondrial	37
3.13	Avaliação Do Ambiente Redox Intracelular	37
3.14	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	39
4.2	Teste Qualitativo da Toxicidade do Extrato de <i>X. sagittifolium</i> por Resazurina 43	
4.3	Avaliação Quantitativa da Toxicidade do Extrato de <i>X. sagittifolium</i> por Viabilidade Celular	46
4.4	Peroxidação da Membrana Lipídica	49
4.5	Avaliação do Ambiente Redox Intracelular	53
4.6	Avaliação da Viabilidade Celular Antioxidante	56
5	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 PANC (Planta alimentícia não-convencional)

Estudos apontam que o Brasil detém a maior biodiversidade do mundo, entre 5 e 20% de todas as espécies (POLESI *et al.*, 2017). Aproximadamente 1/3 das plantas existentes apresentam um potencial de consumo (ALTIERI & NICHOLLS, 2013), possuindo cerca de cinco mil espécies entre verduras, tubérculos, floríferas e frutíferas (KINUPP & LORENZI, 2014). A grande maioria dessas plantas são denominadas de plantas alimentícias não convencionais; essa nomenclatura foi dada em 2008 pelo Biólogo Valdely Ferreira Kinupp (KELEN *et al.*, 2015) para representar as plantas que apresentam uma ou mais partes comestíveis, desde raízes a caules e folhas, mas não estão presentes nos hábitos alimentares da população. Estas plantas podem ser típicas de determinada região, com crescimento espontâneo, onde algumas até podem ser cultivadas e consumidas por parte da população de regiões mais distantes dos grandes centros urbanos (PEDROSA *et al.*, 2012; KINUPP & LORENZI, 2014).

A diversificação do consumo de plantas destinadas à alimentação pelo homem passou por uma queda expressiva. Grande parte das plantas que chamamos hoje de PANCs eram consumidas por nossos antepassados, porém perdeu espaço na dieta da humanidade, promovendo o desconhecimento das propriedades alimentícias da grande maioria destas plantas (ALTIERI & NICHOLLS, 2013; KELEN *et al.*, 2015; FIORAVANTI, 2016; LIRA, 2018; BIONDO *et al.*, 2018). O avanço tecnológico e as transformações nos hábitos de vida do ser humano, abrangendo áreas como o comércio, a nutrição e a farmacologia, exerceram um profundo impacto nas práticas de consumo alimentar. Nas últimas décadas, a indústria alimentícia desempenha um papel significativo na definição da maneira como muitas pessoas se alimentam, consolidando um padrão em que apenas o que está comercialmente disponível é considerado alimento. Essa influência direta da indústria alimentícia moldou os hábitos e comportamentos alimentares de grande parte da população (KELEN *et al.*, 2015). No Brasil a produção agrícola padronizou cerca de 30 diferentes tipos de plantas para serem cultivadas para a comercialização, limitando a diversidade alimentar. Além disso, é importante observar que a adoção desses novos padrões alimentares tem sido vinculada a uma ampla gama de condições de saúde adversas, incluindo hipertensão, diabetes, excesso de peso e déficits nutricionais (KAC & VELASQUEZ, 2003).

A carência de informações, estudos e divulgação do potencial alimentício dessas plantas se dá pela falta de pesquisa sobre propriedades nutricionais, medicinais, biológicas e de cultivo e os estudos são direcionados a essas plantas relatam que elas apresentam teores elevados de íons de metais essenciais como ferro, potássio, cálcio e manganês. Além disso, contêm compostos com propriedades antioxidantes, tendo como exemplos carotenoides, flavonoides (compostos fenólicos), vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (tocoferol) (PINTO *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2015). Outra característica relevante é a elevada resistência destas plantas a mudanças climáticas, como ondas de calor ou excesso de chuvas (CHOMENKO *et al.*, 2016; TERRA & VIERA, 2019).

Devido à falta de conhecimento, grande parte da população rotula as PANCs como ervas daninhas, tratando-as como plantas invasoras, abstendo-se de explorar uma alimentação mais diversa, saudável e sustentável (COSTA, 2012; LIBERATO *et al.*, 2019). O cultivo dessas plantas pode ser de grande interesse, uma vez que apresentam potencial para melhorar a segurança alimentar e beneficiar a saúde nutricional de indivíduos em situação econômica vulnerável, contribuindo assim para o combate à fome (ALMEIDA & CORREIA, 2012; BRASIL, 2010; KINUPP & LORENZI, 2014).

Dentre as espécies mais conhecidas de PANC estão a ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) (Figura 1A), nativa de regiões tropicais da América Central e do Sul; a beldroega (*Portulaca oleracea*) (Figura 1B), encontrada em diversas partes do mundo, e principalmente consumida em saladas; o dente-de-leão (*Taraxacum officinale*) (Figura 1C), utilizado em várias preparações culinárias, incluindo saladas, sopas e chás; e a taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) (Figura 1D), mais consumida nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, pertencente à família Araceae (BRASIL, 2010).

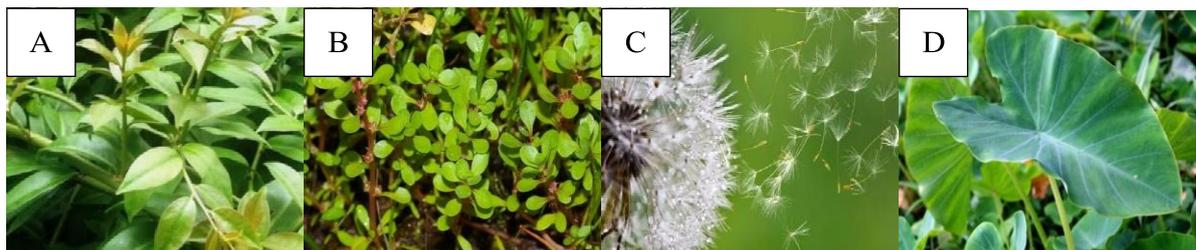


Figura 1. Exemplos de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs): *Pereskia aculeata* (A), *Portulaca oleracea* (B), *Taraxacum officinale* (C) e *Xanthosoma sagittifolium* (D).

FONTES: imagens disponíveis em: <https://localfarmers.com.br/produto/ora-pro-nobis-organica-molho/>; <https://www.tuasauade.com/beneficios-da-beldroega/>; <https://tuasauade.com.br/dente-de-leao/>; <https://www.harmonynutricao.com.br/produto/taioba/>.

1.1.1 Família Araceae

Araceae é uma família de plantas herbáceas pertencente ao grupo das monocotiledôneas, da ordem Alismatales. É uma das maiores e mais diversificadas famílias de plantas com flores (angiospermas), englobando 117 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies amplamente distribuídas, com grande parte desta distribuição concentrando-se nas regiões tropical, subtropical e temperada do Hemisfério Norte. Etimologicamente, o termo "Araceae" tem origem direta na expressão grega antiga "aron", cujo significado remete à colheita ou aos produtos provenientes do campo (COELHO *et al.*, 2022).

Uma de suas características marcante é a presença de uma estrutura denominada espádice, que é composta por flores pequenas, semelhantes a uma espiga, geralmente envolta por uma bráctea, folha modificada que se assemelha a uma pétala de flor, denominada espata (Figura 2). As plantas da família Araceae exibem diferentes formas morfológicas, podendo assumir formas rastejantes, trepadeiras ou epífitas. A maioria delas é encontrada em ambientes úmidos e sombreados, frequentando especialmente as florestas tropicais. Essas plantas exibem uma variação de tamanho considerável, variando desde espécies de pequeno porte até àquelas que se desenvolvem como arbustos (JUDD, 2009).



Figura 2. Inflorescência do lírio da paz em formato de espádice envolta por espata.

FONTE: disponível em: <https://casavogue.globo.com/arquitetura/paisagismo/noticia/2023/06/lirio-da-paz.ghtml>.

Várias espécies pertencentes à família Araceae são empregadas para fins decorativos, um exemplo são as plantas do gênero *Spathiphyllum*, popularmente chamados de "lírio-da-paz". Além disso, têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina popular, dentre os exemplos notáveis podemos mencionar a espécie *Xanthosoma auriculatum* Regel, cuja seiva é aplicada para tratar feridas. Os tubérculos de *Dracontium grayumianum* G. H. Zhu & Croat são empregados por grupos indígenas para controlar hemorragias durante o parto (PÉREZ *et al.*, 2005).

No Brasil, as espécies pertencentes à família Araceae, especificamente dos gêneros *Colocasia* Schott e *Xanthosoma* Schott, são cultivadas em várias regiões com finalidades

alimentares. Essas plantas revelam um potencial notável na indústria de alimentos, graças às suas características nutricionais distintas. Os tubérculos oriundos dessas plantas da família Araceae funcionam como excelentes repositórios de amido, armazenando concentrações substanciais desse componente, com teores médios oscilando entre 22% e 40%. Essa característica as posiciona como fontes significativas de carboidratos em diversas nações, destacando sua relevância na alimentação e na economia (PÉREZ *et al.*, 2005).

Estudos apontam para a presença de ácidos graxos, como ácido palmítico, linoleico e esteárico em algumas espécies pertencentes à família Araceae, tais como *Arum italicum* Miller (chicória brava), *Dracunculus vulgaris* Schott (dragão negro) (SAGALIK *et al.*, 2002a e 2002b) e *Arum palaestinum* Boiss (cala preta) (FARID *et al.*, 2015). Além disso, uma variedade de compostos, incluindo alcaloides, lectinas, ácidos graxos, cerebrosídeos e fenilpropanoides foram isolados e identificados em espécies do gênero *Pinellia*, pertencente à família Araceae (JI *et al.*, 2014). A literatura também indica a presença de flavonoides, como luteolina, isoorientina e isovitexina em outra planta desta família, a *Arum palaestinum* Boiss (FARID *et al.*, 2015).

Dentro desse conjunto de espécies da família Araceae, destacam-se o inhame ou taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), o mangarito (*Xanthosoma maffafa* Schott) e a taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). Enquanto os rizomas são a parte consumida no caso do taro e do mangarito, na taioba são as folhas, frequentemente refogadas ou escaldadas (FELTRAN, 2010). De acordo com o mesmo autor, todas essas plantas apresentam um teor significativo de minerais, além da presença de vitaminas e fibras.

1.1.2 *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott

A taioba demanda um manejo simples e de baixo custo, características típicas de PANC, sendo predominantemente cultivada pela agricultura familiar. Cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo consomem suas folhas ou rizomas (SEPÔLVEDA-NIETO *et al.*, 2017). Seu cultivo estende-se por várias regiões, incluindo as Américas Central e do Sul, Havaí, África Ocidental (Nigéria, Gana, Camarões e Togo) e Ásia Tropical (Malásia e Indonésia) (CASTRO, 2006). Nas regiões tropicais o cultivo ocorre ao longo do ano, enquanto nas regiões subtropicais fica restrito a períodos mais quentes (BRASIL, 2010). Em comparação com a produção de outras hortaliças folhosas, como couve e alface, a taioba apresenta melhor desempenho na produção durante o verão chuvoso (SEGANFREDO *et al.*, 2001). No Brasil, Minas Gerais e Rio de Janeiro são as regiões de maior consumo da taioba, onde o uso mais comum é na

alimentação sob a forma refogada (SEPÓLVEDA-NIETO *et al.*, 2017). Na África Ocidental já é mais comum o consumo do rizoma, de forma semelhante ao inhame (ELEAZU *et al.*, 2018).

Um fator anti-nutricional está presente entre os compostos da taioba, tratando-se de uma substância que integra uma variedade de alimentos vegetais, sendo capaz de prejudicar a utilização dos elementos nutritivos do alimento. Diante disso, o consumo da taioba se faz sempre após algum método de cozimento, já que cru apresenta uma toxidez devido a presença do oxalato de cálcio, que pode causar irritação de mucosa, coceira nos lábios e garganta (BRASIL, 2010). Os níveis de oxalato de cálcio presentes na taioba são aceitáveis e inferiores ao encontrado no espinafre (PINTO, 2001).

A análise dos valores nutricionais é de grande importância para entendermos suas propriedades, além de um incentivo para a população introduzir esse alimento em seu dia a dia (BRASIL, 2012). Porém, atualmente estudos com essas avaliações com a taioba são escassos. É sabido que a taioba apresenta quantidades notáveis de proteínas e ferro, assemelhando-se ao espinafre, sendo também considerada como boa fonte de vitamina C, aproximando-se da laranja, e com um alto teor de cálcio (PINTO, 2001). Além disso, já foi relatado em estudos que esta planta apresenta constituintes que atuam como antioxidantes (ARRUDA, 2004; NISHANTHINI *et al.*, 2012). Em vista disso, aprofundar o conhecimento referente às PANCs é extremamente válido para a maior difusão de seu consumo, já que podem conter componentes nutricionais relevantes para o organismo humano.

1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes têm um papel fundamental na redução de radicais livres, atuando como agentes protetores contra os potenciais efeitos prejudiciais provocados por essas espécies. A produção constante de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de diversos mecanismos de defesa antioxidante com o objetivo de controlar os níveis intracelulares dessas moléculas e prevenir danos celulares (SIES, 1993). Os antioxidantes desempenham um papel crucial na inibição e redução de danos causados pelos radicais livres nas células. Uma definição abrangente de antioxidante é a seguinte: "qualquer substância que, quando presente em concentrações baixas em comparação com o substrato suscetível à oxidação, é capaz de retardar ou inibir eficazmente a oxidação desse substrato" (HALLIWELL, *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, houve um notável aumento no interesse pelas fontes naturais de antioxidantes (SHEN *et al.*, 2022). Os flavonoides, substâncias naturalmente produzidas em diversas partes das plantas, destacam-se por sua marcante capacidade antioxidante. Essa vasta família de compostos pode ser dividida em várias classes com base em sua estrutura básica. Os flavonoides possuem a capacidade de regular a acumulação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em células, agindo como neutralizadores da ação dessas espécies. Como resultado, esses antioxidantes desempenham um papel fundamental na proteção das plantas contra o estresse e são altamente relevantes para a saúde humana, especialmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (WEN *et al.*, 2015).

Ademais, os flavonoides desfrutam de uma ampla gama de aplicações industriais, sendo utilizados na indústria alimentícia como conservantes, pigmentos e antioxidantes. Eles também encontram aplicação em setores como a indústria cosmética e farmacêutica, onde desempenham funções igualmente essenciais (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2014).

1.2.1 Flavonoides

Ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, carotenoides e tocoferóis são apontados como os principais responsáveis pela capacidade antioxidante dos vegetais e frutas. Essas substâncias são classificadas como compostos fenólicos e recebem grande atenção por inibirem danos oxidativos nas células (KARAKAYA *et al.*, 2019); e seus efeitos benéficos têm sido evidenciados frente várias patologias, incluindo condições cardiovasculares e aterosclerose, além de demonstrarem propriedades anti-inflamatórias e anti-envelhecimento (WILLIAMSON *et al.* 2018; GENTILE *et al.*, 2018; GUVEN *et al.*, 2019).

Existem duas classificações abrangentes para esses compostos: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides são compostos constituídos por dois anéis aromáticos que estão conectados por um heterociclo oxigenado. A sua classificação varia de acordo com o grau de hidrogenação e substituições, podendo ser categorizados como flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonas, flavanóis e chalconas (MOO-HUCHIN *et al.*, 2015). Já para os não flavonoides enquadram-se os ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e cumarinas (GRANATO *et al.*, 2013).

Os flavonoides são sintetizados pelas plantas como metabólitos secundários, e desempenham funções cruciais na resposta das plantas a diversos fatores, sejam eles biológicos ou abióticos, tais como o clima, o solo em que a vegetação se encontra, entre tantos outros. Esses compostos, por exemplo, estão envolvidos na pigmentação de frutos e flores, atraindo

animais para a polinização; e na proteção das plantas frente fatores de estresse como herbívoros, bactérias e fungos, e abióticos, incluindo a absorção de luz ultravioleta (UV). Os flavonoides são frequentemente armazenados nas células vegetais sob a forma de glicosídeos, concentrados nos vacúolos. Quanto à sua estrutura química, eles compartilham um esqueleto básico de três anéis (A, B e C) (Figura 3). A classificação desses compostos ocorre com base no grau de oxidação do heterociclo central, e modificações adicionais, como glicosilação e acilação; que podem ocorrer nos grupos metila e hidroxila dos outros dois anéis, resultando em diversas alterações dos glicosídeos flavonoides (TOHGE *et al.*, 2017).

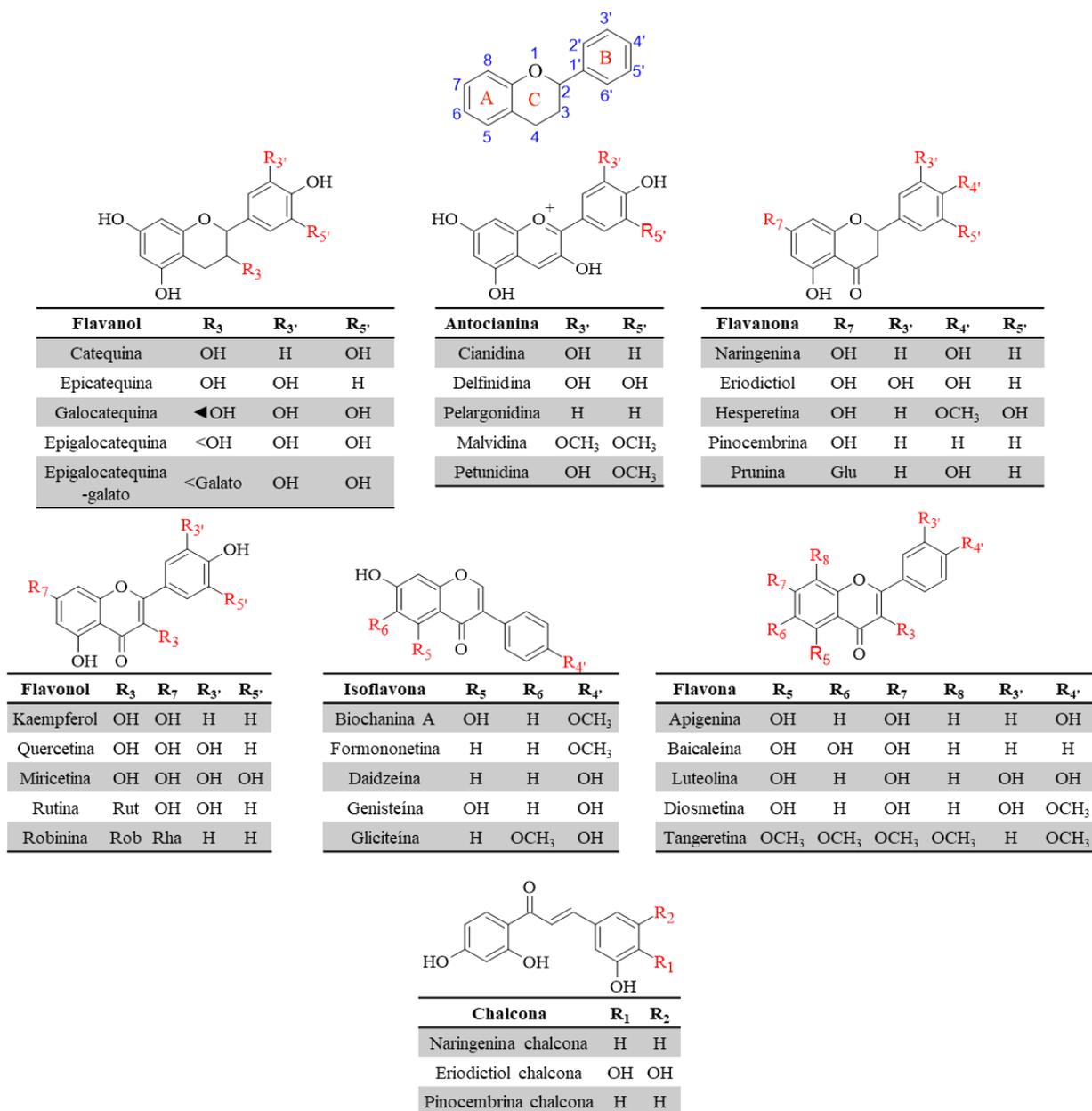


Figura 3. Estrutura básica de flavonoides e suas classificações.

A biossíntese de flavonoides ocorre com a utilização de duas vias metabólicas, a via do chiquimato (também conhecida como via do policetídeo) e a via do acetato. A via do chiquimato

desempenha um papel fundamental ao fornecer o substrato necessário para a síntese da cumarina-CoA, enquanto a via do acetato contribui fornecendo malonil-CoA, que são essenciais para a reação de alongamento em C2, catalisada pela enzima chalcona sintase (TOHGE *et al.*, 2017) (Figura 4. Via metabólica de flavonoides.).

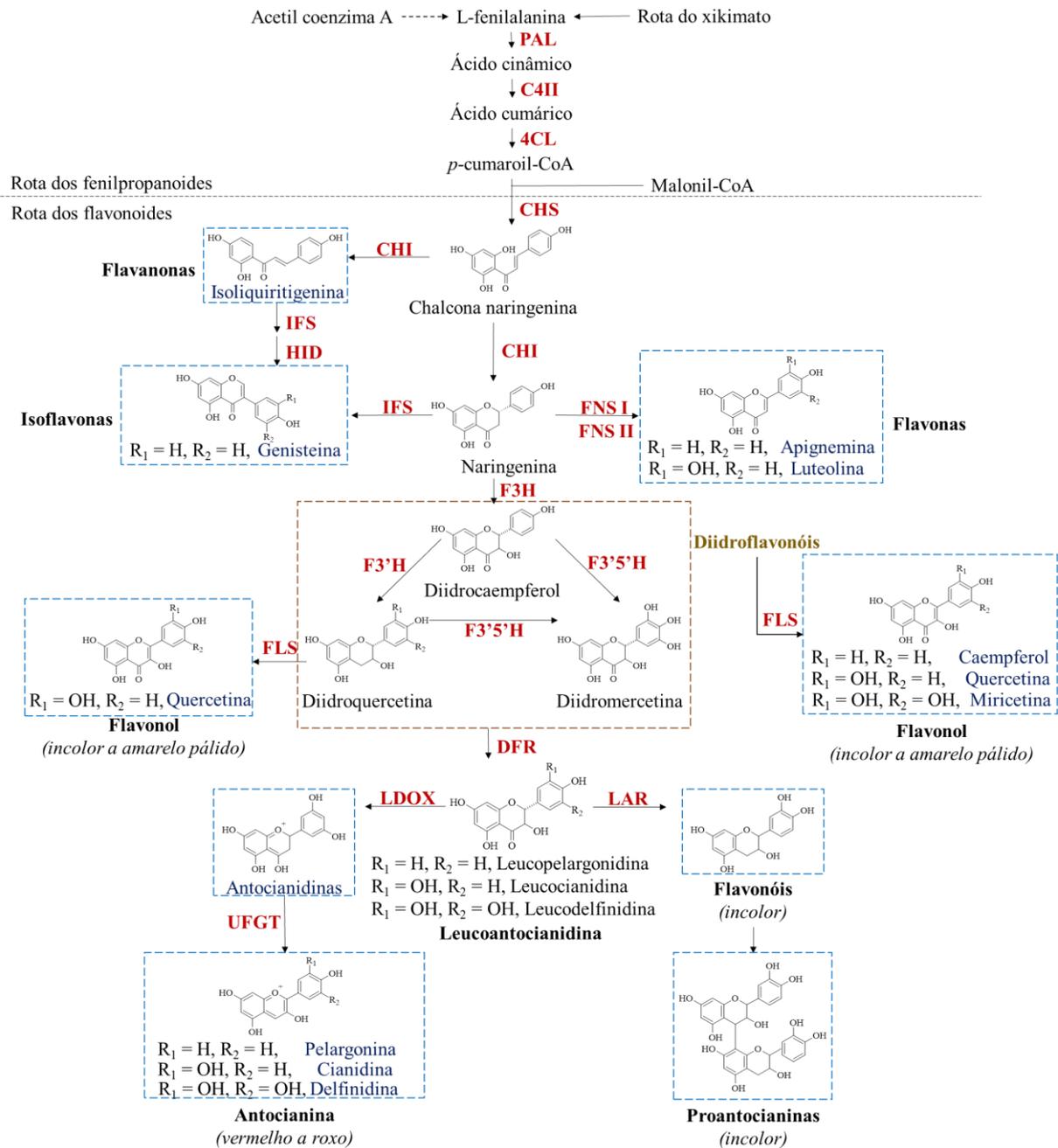


Figura 4. Via metabólica de flavonoides. FONTE: Adaptado de SHEN *et al.*, 2022.

O ponto de partida desse processo é a fenilalanina, um aminoácido que se origina da via do chiquimato. A fenilalanina é então convertida em ácido cinâmico por meio da reação catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL). Posteriormente, o ácido cinâmico passa

por hidroxilação na posição C4, catalisada pela enzima hidroxilase do ácido cinâmico (C4H), resultando na formação de ácido *para*-cumárico (KIM *et al.*, 2021). O ácido *p*-cumárico passa por uma reação de condensação sob a influência da cumarina-CoA ligase (4CL), gerando *p*-cumaroil-CoA. De maneira paralela, o malonil-CoA desempenha um papel crucial na produção de flavonoides e na extensão de ácidos graxos de cadeia longa (SANTÍN & MONCALIÁN, 2018). Uma vez que *p*-cumaroil-CoA e malonil-CoA tenham sido formados, eles sofrem reações de condensação e isomerização, que são catalisadas pela chalcona sintase (CHS). Essas reações culminam na produção da naringenina chalcona (YONEKURA-SAKAKIBARA *et al.* 2019). A naringenina chalcona, por sua vez, serve como precursor para a síntese de flavanonas, graças à atividade catalítica da enzima chalcona isomerase (CHI). Adicionalmente, a chalcona naringenina pode ser ciclizada e dar origem à naringenina, processo que pode ocorrer tanto sob a influência rápida do CHI, quanto espontaneamente sem a necessidade de enzimas (TOHGE *et al.*, 2017).

A naringenina desempenha um papel fundamental como precursor comum na síntese de flavonoides, servindo como ponto de partida para metabólitos intermediários e produtos, contribuindo assim para a notável semelhança estrutural que caracteriza a família dos flavonoides. Ela pode interagir com várias enzimas-chave envolvidas na síntese de flavonoides, por exemplo, reagindo com a flavona sintase I (FNS I) ou com a flavona sintase II (FNS II) para catalisar a formação de flavonas. Alternativamente, pode se ligar à isoflavona sintase (IFS), resultando na formação de isoflavonas. Além dessas interações, a naringenina possui a capacidade de se transformar em diidrocaempferol sob a influência da flavanona-3-hidroxilase (F3H), e posteriormente pode ser convertido em diidroquercetina e diidromiricetina por meio de reações com a flavonol 3'-hidroxilase (F3'H) e a flavonol 3',5'-hidroxilase (F3',5'H), respectivamente. Sob a ação da flavonol sintase (FLS), o diidroflavonol é precursor para a síntese de flavonóis, como kaempferol, quercetina e miricetina. Adicionalmente, o diidroflavonol pode ser convertido em leucoantocianidinas através da atividade catalítica da diidroflavonol-4-redutase (DFR). As antocianidinas podem então ser sintetizadas pela leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), e, por fim, essas antocianinas podem ser catalisadas pela uridina difosfato (UDP)-glicose flavonoide-3-O-glicosiltransferase (UFGT). As leucoantocianidinas também podem gerar flavonóis através da atividade da leucoantocianidina redutase (LAR), produzindo unidades de flavonol constituídas por oligômeros ou polímeros de proantocianinas. Além dessas etapas, diversos tipos de antocianinas e flavonóis podem passar por modificações adicionais, como acilação, metilação e glicosilação, resultando na síntese de flavonoides relativamente estáveis que podem se acumular nas plantas, contribuindo para a sua

diversidade e riqueza fenólica (RAUF *et al.*, 2019; KU *et al.*, 2020).

Das propriedades biológicas atribuídas aos flavonoides a atividade antioxidante é a mais amplamente estudada. A capacidade antioxidante dessas substâncias contribui para prevenir danos causados pelos radicais livres, agindo na eliminação de EROs e na ativação de enzimas antioxidantes (WILLIAMSON *et al.*, 2018). Alguns mecanismos para explicar a ação antioxidante observada nos compostos fenólicos foram propostos. Um deles é através da doação de hidrogênio para espécies radiculares, acarretando a formação de compostos mais estáveis. Os flavonoides e ácidos fenólicos possuem diferentes híbridos de ressonância em sua estrutura, o que os torna menos reativos (Figura 5).

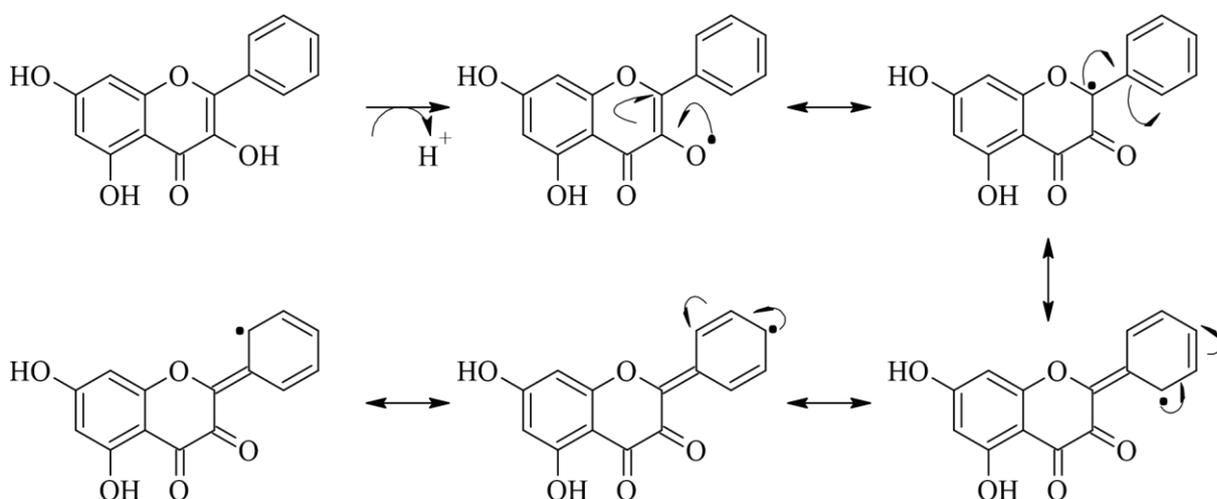


Figura 5. Molécula de galangina em estruturas de ressonância de estabilização.
FONTE: adaptado de GREGORIS & STEVANATO, 2010.

As propriedades estruturais essenciais dos flavonoides para uma eficaz neutralização de radicais livres abrangem a presença de uma configuração *orto*-di-hidroxila no anel B, o que permite a deslocalização de elétrons; uma ligação dupla na posição 2,3 em conjugação com um grupo funcional 4-oxo (cetona) no anel C, favorecendo a mobilidade dos elétrons do anel B; bem como grupos hidroxila nas posições 3 e 5, que facilitam a formação de ligações hidrogênio com o grupo oxo. Essas características estruturais direcionam a neutralização de EROs por meio da doação de átomos de hidrogênio. Dados da literatura apontam que o ensaio DPPH (2,2 - difenil-1-picril-hidrazil) na presença de flavonóis contendo grupos hidroxila nas posições *para* e *orto*-di-hidroxila no anel B demonstram, geralmente, uma maior eficácia na atividade antioxidante, sendo que essa eficácia diminui à medida que essas características estruturais são removidas (ZUO *et al.*, 2018). A atividade antioxidante dos flavonoides *in vitro* é substancialmente influenciada pela disposição dos grupos hidroxila, que exerce um impacto significativo na capacidade de neutralização de EROs. A configuração dos grupos hidroxila,

em particular um grupo *orto*-di-hidroxila no anel B, possibilita que os radicais flavonoides fenoxila participem na deslocalização de elétrons, resultando no deslocamento de um elétron no anel B, o que se traduz em atividade antioxidante. Essas configurações estruturais promovem uma maior capacidade antioxidante (SARIAN *et al.*, 2017).

Um segundo mecanismo proposto para demonstrar a ação antioxidante de compostos fenólicos é a capacidade de atuarem como quelantes de metais (Figura 7). As hidroxiflavonas têm a capacidade de formar complexos com cátions metálicos, resultando em propriedades quelantes que dependem do número e da posição dos grupos hidroxila (SAMSONOWICZ *et al.*, 2017). Especificamente, os flavonoides podem reduzir a toxicidade de íons metálicos redox-ativos, como Fe (II) ou Cu (II), ou agir como pró-oxidantes (ARIF *et al.*, 2018). É sabido que esses íons metálicos catalisam a produção de EROs (KADA *et al.*, 2017) através das reações de Fenton (LI *et al.*, 2014).

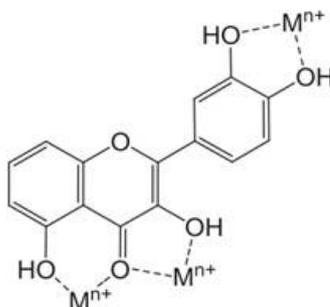


Figura 6. Estrutura de um flavonoide com alternativas para pontos de coordenação com metais.
FONTE: PROCHÁZKOVÁ, BOUŠOVÁ & WILHELMOVÁ, 2011.

Em plantas pertencentes à família Araceae, uma ampla variedade de substâncias fenólicas tem sido identificada. Essas substâncias demonstraram ter a capacidade de desempenhar papéis importantes, tais como ação antioxidante, propriedades anti-inflamatórias e, em alguns casos, até atividades antitumorais (BAIÃO *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2018;). No contexto específico dos extratos obtidos das folhas da taioba, também foram relatados compostos fenólicos, incluindo a presença de taninos (WADA *et al.*, 2019) e flavonoides (CAXITO, 2015).

Essas descobertas destacam a riqueza da família Araceae em termos de compostos fenólicos e ressaltam o potencial dessas substâncias para influenciar uma variedade de respostas biológicas benéficas. Portanto, essas plantas podem desempenhar um papel relevante na busca por compostos naturais com propriedades terapêuticas e nutricionais.

1.3 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo refere-se a um desequilíbrio celular onde a concentração de espécies oxidantes se encontra elevada, podendo ocasionar danos a sistemas biológicos (FORMAN *et al.*, 2021). Estudos apontam que o quadro de estresse oxidativo está associado a diversas doenças como câncer, doenças arteriais, diabetes e doenças neurodegenerativas (PISOSCHI *et al.*, 2021). Este quadro ocorre quando há uma elevação nos níveis de espécies reativas devido a uma série de fatores, como a diminuição na ação das enzimas antioxidantes, a ativação de fatores endógenos e a exposição há fatores exógenos, ocasionando um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. Como resultado de todo este processo ocorrem danos a membranas e biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos (BARBOSA *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-PASTOS & PUIG, 2020).

As espécies oxidantes apresentam uma elevada reatividade que é responsável pelo seu poder deletério (LI *et al.*, 2014). Estas espécies são divididas em EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs se subdividem em dois grupos: radicalares, apresentando elétrons desemparelhados em sua última camada, tendo como exemplos peroxila (ROO^{\bullet}), hidroxila (OH^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e alcoxila (RO^{\bullet}); e os não radicalares, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). As ERNs têm como exemplos óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (VICTOR, ROCHA & DE LA FUENTE, 2004; VAN DEN ENDE, PESHEV & DE GARA, 2011).

Em organismos aeróbicos e anaeróbicos, as EROs são naturalmente formadas pelo metabolismo e desempenham funções fisiológicas importantes. Estas espécies atuam como sinalizadoras em cascatas imune frente a patógenos, processos inflamatórios e na indução da divisão celular (VALKO *et al.*, 2007; IMLAY, 2013; DEMIDCHIK, 2014). Fontes externas, como radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, pesticidas e solventes industriais também podem contribuir para a formação de radicais livres (PODDA *et al.*, 2001).

As mitocôndrias representam a principal fonte interna de produção das EROs. Durante o processo de transporte de elétrons na cadeia respiratória, ocorre a redução do oxigênio molecular em duas moléculas de água. No entanto, uma pequena fração de elétrons "escapa" prematuramente, levando à conversão de aproximadamente 1 -2% do oxigênio molecular em radicais ânion superóxido. O radical superóxido exibe uma reatividade relativamente fraca, principalmente devido à sua incapacidade de atravessar a membrana lipídica. Ele é posteriormente convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido

dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio produzido pode reagir com íons de cobre ou ferro livres, ou com íons fracamente ligados. Esses íons podem ser reduzidos a Cu (I) ou Fe (II) por redutores fisiológicos, como glutatona ou ascorbato, e reagir com oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio, gerando radicais superóxido e hidroxila, respectivamente (Figura 7) (DRÖGE, 2002; VICTOR, ROCHA & DE LA FUENTE, 2004; HALLIWELL, 2006).

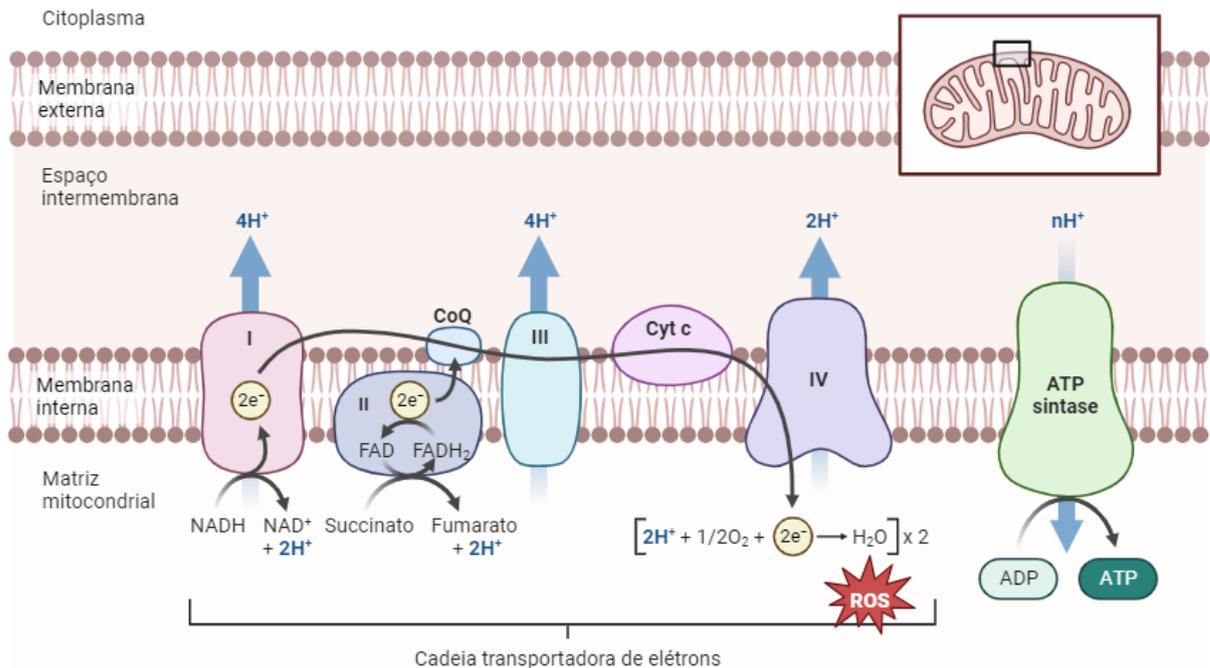


Figura 7. Esquematização da produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons.
FONTE: criado com BioRender.com

Além da mitocôndria, o radical ânion superóxido também pode ser gerado pela ação de enzimas oxidases, como a NAD(P)H oxidase (família NOX) e a xantina oxidase (XO). As enzimas da família NOX são encontradas em vários tipos celulares, como linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos e condrócitos. Quando ativadas, essas enzimas aceleram a respiração celular, aumentando o consumo de oxigênio, a utilização de glicose e a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) pela via das pentoses-fosfato, o que aumenta a probabilidade de formação de EROs. Por outro lado, a XO, encontrada no citosol, especialmente em condições de hipóxia, possui a capacidade de produzir diretamente superóxido e peróxido de hidrogênio, utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons (DRÖGE, 2002; RAY & SHAH, 2005).

Os danos causados ao DNA (Figura 8) em um quadro de estresse oxidativo ocasiona possíveis erros de replicação, a paralização ou indução de transcrições. Pode ocorrer a quebra de fitas duplas, modificações nas bases purínicas e pirimidínicas e nos açúcares ou ligações fosfodiéster. Durante todo esse processo ocorre a formação do composto 8-

hidróxidesoxiguanosina (8-OHdG), que é o principal marcador de dano oxidativo no DNA (COOKE *et al.*, 2003; DEMIDCHIK, 2014; IMLAY, 2013).

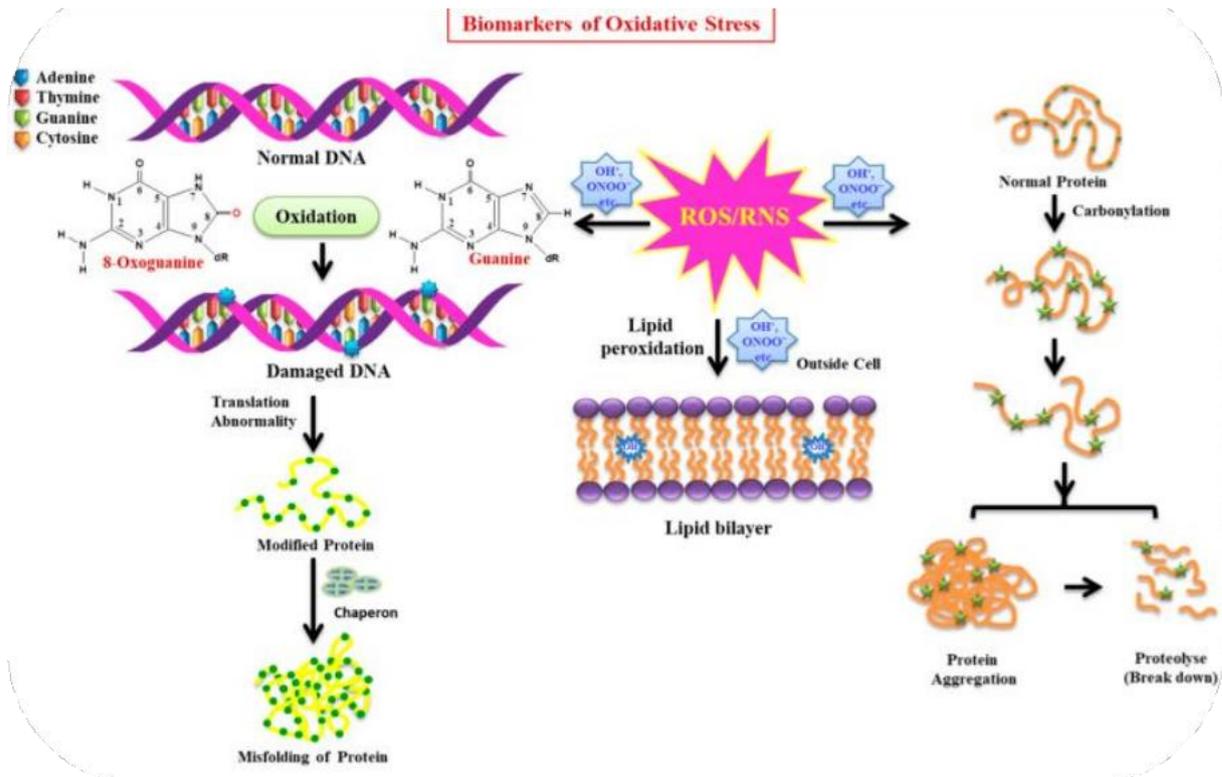
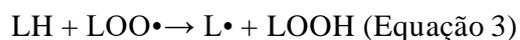
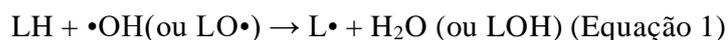


Figura 8. Biomarcadores de estresse oxidativo.
FONTE: SINGH *et al.*, 2019.

Em cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de proteínas, os danos ocorrem por conta da oxidação causada por radicais hidroxilas, ou metais de transição quando associados ao peróxido de hidrogênio. O radical hidroxila irá retirar um hidrogênio da cadeia polipeptídica da proteína formando um radical, e este radical formado em condições aeróbicas irá reagir com o oxigênio molecular formando radicais peroxila. O superóxido em sua forma protonada (HO_2^{\cdot}) irá reagir com o radical peroxila formado, produzindo peróxidos de alquila. Ocorre cisão oxidativa quando o dano é causado por um metal, há perda do resíduo de histidina, formação de radicais alcoxil (RO^{\cdot}), alquil (R^{\cdot}), alquilperoxil (ROO^{\cdot}) e introdução de grupo carbonil, que é um importante marcador da oxidação de proteínas (STADTMAN, 2004; VALKO *et al.*, 2007).

Já a peroxidação lipídica que ocorre nas membranas celulares se dá pela oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua estrutura. Todo o processo ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Primeiramente a reação se iniciará com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado por EROs, levando a formação do radical lipídico

(L•) (Equação 1). Na segunda etapa o radical lipídico irá reagir com oxigênio molecular e formará o radical peroxila (LOO•) (Equação 2). Então, o radical peroxila irá sequestrar um outro hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o radical lipídico (Equação 3). O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais formados reagem entre si. (Equação 4) (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015).



O radical peroxil (LOO•) pode sofrer reação de ciclização e formar endoperóxidos que são precursores do malonaldeído (MDA), que é o principal marcador de peroxidação lipídica (MARNETT, 1999; KOHEN & NYSKA, 2002; NIKI *et al.*, 2005).

A fim de manter a homeostase celular o organismo conta com sistemas de defesas antioxidantes que atuam para manter as espécies reativas em níveis não prejudiciais. Esses sistemas podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Figura 9). O grupo enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); enquanto o grupo não enzimático inclui glutathione (GSH) e alguns compostos que podem ser obtidos através da alimentação, tendo como exemplos ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides e flavonoides (YE *et al.*, 2015).

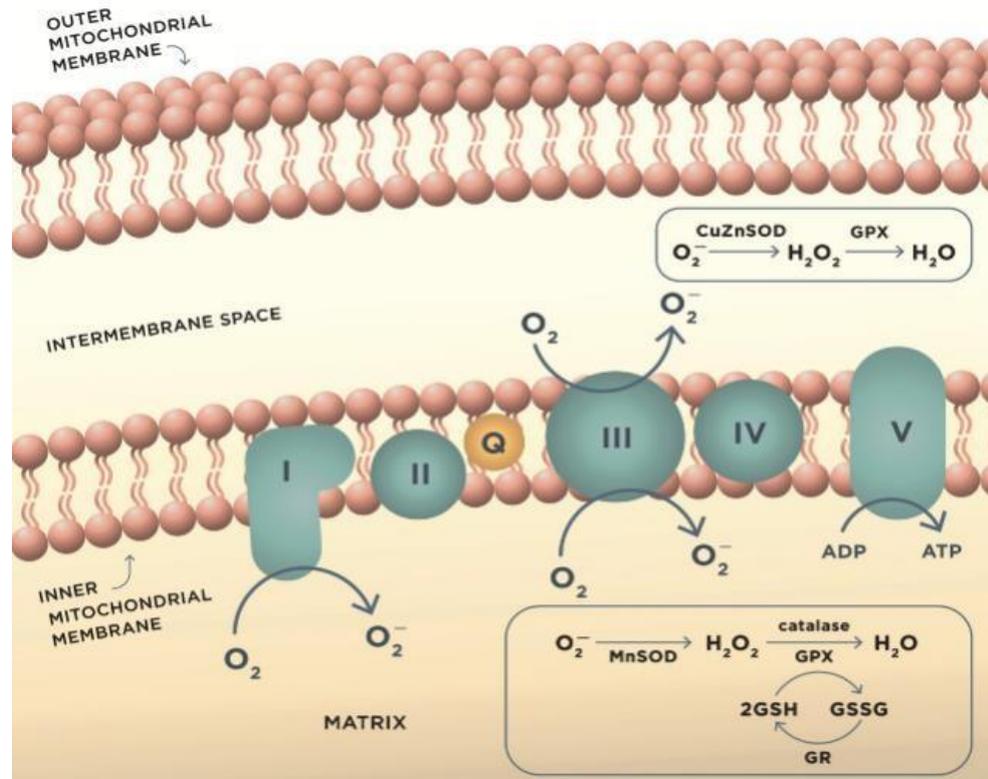


Figura 9. Produção de espécies reativas de oxigênio na cadeia respiratória.
 FONTE: TÖNNIES & TRUSHINA, 2017.

A superóxido dismutase (SOD), uma metaloproteína com atividade catalítica na dismutação do radical ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, é um componente crucial na manutenção do equilíbrio redox. Em mamíferos, a família de enzimas SOD engloba três isoformas distintas: SOD citosólica, SOD extracelular (ambas contendo cobre e zinco) e SOD mitocondrial, que apresenta manganês em sua composição. Essas enzimas desempenham um papel vital na primeira linha de defesa antioxidante, atuando na prevenção de processos oxidativos e suprimindo a formação de espécies radicalares (PISOSCHI *et al.*, 2021).

A catalase é uma das enzimas antioxidantes de maior relevância encontrada na maioria dos organismos que realizam metabolismo aeróbico. Sua função primordial reside na quebra do peróxido de hidrogênio em duas etapas, resultando na formação de uma molécula de oxigênio e duas moléculas de água. O mecanismo reacional envolvido nesse processo compreende duas etapas distintas. A primeira etapa inicia-se com a formação de um intermediário, o qual se caracteriza como uma espécie covalente conhecida como oxiferril (FeIVO), acompanhada de um radical π -cátion porfirina. Esse composto intermediário é gerado mediante a redução de uma molécula de peróxido de hidrogênio. Na segunda etapa da reação, o composto intermediário é novamente submetido a reações redox, envolvendo a transferência

de dois elétrons provenientes de um doador de elétrons (que é a segunda molécula de peróxido de hidrogênio). Essa etapa conduz à regeneração da enzima catalase, bem como à produção de oxigênio e água (VON OSSOWSKI, HAUSNER & LOEWEN, 1993; NANDI *et al.*, 2019).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo sulfídrico originado da fusão de três aminoácidos distintos: glutamina, cisteína e glicina. Dotada de um grupo sulfidril (SH), a glutathiona desempenha um papel essencial no sistema de desintoxicação, contribuindo para a manutenção do equilíbrio redox intracelular e, por conseguinte, na prevenção e proteção contra danos oxidativos. A glutathiona assume duas formas principais: a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG). A GSH tem a capacidade de reagir diretamente com radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e superóxido ($\bullet\text{O}^{2-}$) e funciona como um doador de elétrons vital na redução de substâncias como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos. Essa reação é mediada por enzimas específicas, nomeadamente a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR). A GPx facilita a redução do peróxido de hidrogênio e do peróxido lipídico na presença de GSH, gerando GSSG. A GSSG é posteriormente convertida em GSH pela ação da GR na presença de NAD(P)H, restabelecendo os níveis de GSH intracelular (GRANT, PERRONE & DAWES, 1998).

1.4 Modelo biológico

Saccharomyces cerevisiae (Figura 10), popularmente conhecida como a levedura de pão e cerveja, é unicelular, pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota. Este foi o primeiro organismo a ter seu genoma eucariótico totalmente sequenciado, com cerca de 80% dos seus 6.000 genes funcionalmente caracterizados, sendo a célula eucariótica mais bem estudada em nível genético e fisiológico (GOFFEAU *et al.*, 1996; TENREIRO & OUTEIRO, 2016).

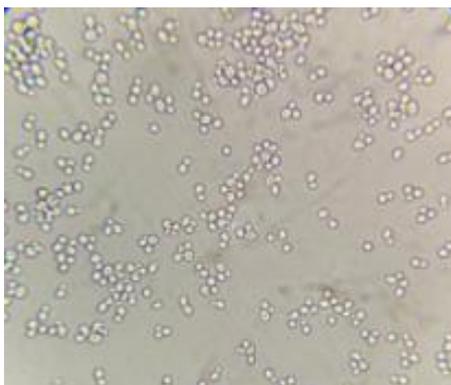


Figura 10. Células de *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741).

FONTE: Acervo pessoal.

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo amplamente utilizado como modelo de estudo de células eucarióticas, devido a presença de características similares entre as suas vias

metabólicas e sistemas de defesa antioxidante também encontrados em células de mamíferos superiores. A resposta a danos no DNA é um exemplo notável de uma via eucariótica na qual os principais passos foram primeiramente elucidados usando esta levedura como modelo. Além disso, a possibilidade de trabalhar com mutações genômicas, cepas contendo deleções, revelou diversos genes envolvidos na resposta a danos ao DNA (VANDERWAEREN *et al.*, 2022). Estudos recentes têm mostrado a levedura como uma ferramenta útil na pesquisa dos efeitos de mutações associadas à doença de Parkinson, visto que é possível introduzir genes humanos envolvidos nesta doença em células de *S. cerevisiae*, permitindo análises do impacto desses genes nas funções celulares (DELENCLOS *et al.*, 2019).

A grande vantagem de utilizar esta célula como um modelo de estudo biológico é o fato de seu genoma ter sido completamente sequenciado, o que propicia a criação de cepas geneticamente modificadas, permitindo uma abordagem mais precisa e direcionada nas pesquisas. Essa capacidade de manipulação genética amplia as possibilidades de investigação de vários processos biológicos, como por exemplo, a influência de um composto antioxidante em uma cepa cujos os genes de sistemas de defesa antioxidantes encontram-se ausentes; desta forma, respostas mais detalhadas podem ser alcançadas acerca de como esse composto contribuiu na atividade antioxidante. Além disso, existe o baixo custo de manutenção das células, a facilidade de manipulação em laboratório e a rapidez de crescimento que são características adicionais, também contribuindo para a sua utilização (LUSHCHAK, 2006).

S. cerevisiae é conhecida por seu metabolismo aeróbico facultativo, onde ela é capaz de atuar em metabolismo fermentativo ou respiratório, que são conduzidos dependendo da quantidade de hexoses presentes no meio extracelular. Após um contato inicial das células com um novo meio de cultura ocorre a fase Lag, na qual as células entram em um estado adaptativo letárgico. Em seguida, inicia-se a primeira fase exponencial, caracterizada por um rápido crescimento devido à divisão celular acelerada. Nessa fase, ocorre a fermentação das hexoses presentes no meio, resultando na produção de etanol. Conforme as hexoses são consumidas e sua concentração diminui no ambiente externo (menos de 0,2%), ocorre a fase diáuxica. Nessa fase, o crescimento celular estagna e os mecanismos metabólicos são ativados para iniciar o metabolismo aeróbico. Na etapa seguinte, conhecida como fase pós-diáuxica, o crescimento celular é retomado (segunda fase exponencial), porém em um ritmo mais lento em comparação à fase fermentativa. Nessa fase, o etanol produzido durante a fermentação é utilizado como fonte de energia. Por fim, quando o etanol é completamente consumido, a replicação celular cessa e a cultura entra na fase estacionária, na qual a proliferação celular é diminuída (Figura 112) (HERMAN, 2002; BUSTI *et al.*, 2010).

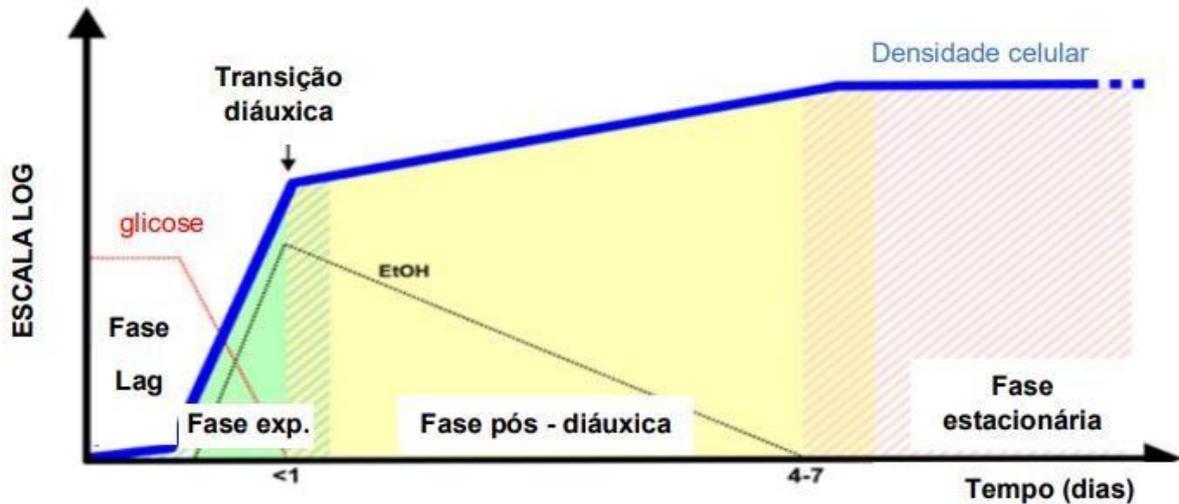


Figura 11. Gráfico de proliferação celular em escala Log x Tempo em dias.
 FONTE: BUSTI *et al.*, 2010.

Como todos os eucariotos, esta levedura contém sistemas de defesa antioxidante, tendo como exemplos as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Esse modelo biológico eucarioto possui o fator de transcrição Yap1 (Yeast Associated Protein 1), uma proteína que desempenha papel crucial na regulação da expressão gênica. Esse fator liga-se ao DNA em regiões específicas chamadas de elementos de controle ou promotores, localizadas próximas aos genes que regula. Os fatores de transcrição podem ativar ou reprimir a transcrição (síntese de RNA a partir do DNA) de genes, controlando assim a produção de proteínas em uma célula. Esta proteína desempenha um papel de destaque na regulação da resposta ao estresse oxidativo provocado por agentes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e metais. Além disso, é importante notar que o Yap1p é gerado de maneira constitutiva como resposta a danos decorrentes de quadro de estresse oxidativo no interior da célula. Dessa forma, sua atuação é crucial para a proteção e adaptação da célula em ambientes com estresse oxidativo, auxiliando na preservação de sua integridade e viabilidade (MOYE-ROWLEY *et al.*, 1989; SCHNELL & ENTIAN, 1991; WU *et al.*, 1993; COLEMAN *et al.*, 1999; DELAUNAY *et al.*, 2000; RODRIGUES-POUSADA, NEVITT & MENEZES, 2005; WYSOCKI & TAMÁS, 2010).

A localização de Yap1 é citoplasmática (DELAUNAY *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 1998); porém um quadro de estresse oxidativo leva à oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) em cisteínas presentes na proteína Yap1. Essa oxidação leva à formação de pontes dissulfeto entre cisteínas de Yap1, resultando em uma mudança conformacional, conseqüentemente ocorre o bloqueio da sua ligação com Crm1, um receptor de exportação nuclear (LOVATO *et al.*, 2017). Acumulado no núcleo, Yap1 ativa a transcrição de vários genes (GULSHAN *et al.*, 2005;

OKAZAKI *et al.*, 2007). Dentre os alvos transcricionais, os mais bem descritos e conhecidos são: tiorredoxina (*TRX2*), catalase (*CTT1*) e superóxido dismutase (*SOD1*), que são genes responsáveis pela eliminação de EROs (TEMPLE *et al.*, 2005).

Esse mecanismo de ativação do Yap1 é fundamental para a sobrevivência da célula em situações de estresse oxidativo. O fator de transcrição Yap1p age como um regulador-chave da resposta ao estresse oxidativo, garantindo que a célula seja capaz de se adaptar e se defender contra as espécies reativas de oxigênio que podem ser prejudiciais para sua integridade e funcionamento.

Para mamíferos, incluindo seres humanos, o fator de transcrição homólogo à *YAP1* é o *NRF2* (Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2). Ele desempenha um papel fundamental na resposta celular ao estresse oxidativo e à toxicidade causada por substâncias químicas e radicais livres. A função principal do *NRF2* é regular a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante. Quando as células são expostas a estressores oxidativos, como EROs, o *NRF2* é transcrito. Após a sua síntese, ele se separa de uma proteína reguladora chamada Keap1p e se move para o núcleo da célula. No núcleo, o Nrf2p liga-se a elementos de resposta antioxidante (ARE) nos promotores de genes-alvo. Isso desencadeia a ativação desses genes, que, por sua vez, codificam proteínas antioxidantes, enzimas de detoxificação e proteínas envolvidas na reparação do DNA. O *NRF2* desempenha um papel crítico na proteção das células contra danos oxidativos e no equilíbrio do estado redox. Sua ativação ajuda a neutralizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres e outras EROs, prevenindo o dano celular e contribuindo para a manutenção da saúde celular. Além disso, o *NRF2* está associado à prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e outras condições. Em resumo, embora *YAP1* de levedura e *NRF2* de mamíferos compartilhem o objetivo comum de proteger as células contra o estresse oxidativo, eles operam em organismos diferentes, possuem vias de sinalização distintas e regulam genes antioxidantes específicos para as necessidades de suas células hospedeiras. O estudo desses fatores de transcrição tem aprimorado nossa compreensão da resposta antioxidante e é relevante para a saúde celular e a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo em seus respectivos sistemas biológicos (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; FORMAN, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade biológica e o potencial antioxidante do extrato de *X. sagittifolium* (L.) Schott em células de *S. cerevisiae* sob estresse oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Caracterizar o perfil químico do extrato aquoso de *X. sagittifolium* por CLAE-DAD;
- II. Identificar a presença de algumas substâncias presentes no extrato aquoso de *X. sagittifolium*;
- III. Determinar a citotoxicidade dose-dependente do extrato de *X. sagittifolium* em células eucarióticas;
- IV. Avaliar a influência do extrato de *X. sagittifolium* sobre a cadeia respiratória em células de *S. cerevisiae*;
- V. Quantificar o potencial antioxidante do extrato de *X. sagittifolium* em células de *S. cerevisiae*;
- VI. Correlacionar os resultados biológicos com as classes das substâncias presentes no extrato e com seus constituintes majoritários;
- VII. Avaliar a resposta biológica do extrato aquoso de *X. sagittifolium* sobre o sistema de defesa antioxidante endógeno de células eucarióticas.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

As folhas de *X. sagittifolium* foram cedidas pelo professor Douglas Siqueira de Almeida Chaves do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Esse material foi lavado com água destilada e fracionado em pequenos pedaços através de uma tesoura, em frações de aproximadamente 2 cm². O material foi submetido a um processo de decocção utilizando uma concentração de 10% p/v. Para isso, foram utilizados 40,6 gramas de folhas picadas e 460 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até atingir 80 °C, sendo mantida nessas condições por 15 minutos. Posteriormente, foi aguardado o resfriamento do produto resultante, seguido pelo processo de filtração. Em seguida, o produto foi submetido ao processo de congelamento e secagem por liofilização.

3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

As análises de CLAE-DAD foram executadas em instrumento Shimadzu® LC-20AD, com detector de arranjo diodo SPD-20A a 200-400 nm e controladas por uma estação de trabalho Shimadzu CMB-20A. A coluna de fase inversa utilizada foi RP-18 (4,6 µm, 150 mm, 2,5 mm, phenomenex). O ácido fosfórico 0,1% (A) e o metanol (B) foram utilizados como gradiente, descrito na Tabela 1 com o fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O detector UV foi utilizado na faixa de 254 nm e 365 nm. A concentração da amostra injetado foi de 20 mg mL⁻¹ com o volume de injeção correspondente a 20 mL.

Tabela 1. Sistema de gradiente utilizado para a realização da CLAE: fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detector de UV a 254 nm e 365 nm. Volume de injeção de 20 mL.

Tempo (min)	Composição	Valor
0	Solvente B	8%
10	Solvente B	10%
30	Solvente B	25%
40	Solvente B	98%
42	Solvente B	8%
50	Solvente B	8%

3.3 Cepas de *S. cerevisiae*

Duas cepas da levedura *S. cerevisiae* foram utilizadas neste estudo para os ensaios com

os extratos de *X. sagittifolium*. A cepa controle (BY4741) portadora do genoma sem nenhuma deleção *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; e a cepa mutante (*Δyap1*), deficiente no fator de transcrição *YAP1* (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *YML007w::kanMX4*). As cepas foram adquiridas da empresa Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>) com sede em Frankfurt, na Alemanha; e armazenadas em meio sólido YPD 2% a 4 °C.

3.4 Meios de Cultura

Três formulações de meios de cultura foram utilizadas: dois meios denominados YPD 2% (Yeast-Peptide-Dextrose) líquidos ou sólidos (acrescido de 2% de ágar). Este meio YPD é composto por 2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedura. O terceiro meio é o YPGly 4%, com a substituição da glicose pelo glicerol, preparados em uma proporção de 20% do volume do frasco para o volume do meio de cultura líquido. O meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. O meio sólido foi vertido em ambiente estéril em capela de fluxo laminar (com filtro HEPA, marca Esco[®]) em placas de Petri de vidro esterilizadas. Os meios utilizados são da marca Difco[®]/USA, a glicose da marca Sigma-Aldrich[®] e o ágar da marca Kasvi[®].

3.5 Repique

Para garantir que as células utilizadas em cada ensaio estejam metabolicamente ativas, é realizada a técnica de repique, que se baseia na transferência de um microrganismo de um meio de cultura para outro meio rico em nutrientes essenciais para seu crescimento.

Os repiques foram preparados através da transferência das células de uma cultura estoque por uma alça descartável e estéril para a superfície do meio YPD 2% sólido com inclinação em um tubo *viale*. Esses repiques foram armazenados a 28 °C por 24 horas em uma estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB[®]).

3.6 Inóculo

Para seu preparo em alguns dos ensaios, uma massa de células do repique fresco foi transferida com o auxílio de uma alça esterilizada descartável para um erlenmeyer contendo meio YPD 2% líquido. As células foram recolhidas quando a concentração da suspensão celular estava acima de 2,8 mg mL⁻¹, correspondente a fase respiratória de crescimento. Já para outros ensaios utilizou-se as células na primeira fase de crescimento exponencial, correspondente à concentração da suspensão celular entre 0,5 e 1,0 mg mL⁻¹.

Esse procedimento envolve a transferência de uma massa de células do repique fresco para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril. O volume correspondente a 20 µg de células foi transferido para o erlenmeyer com meio YPD 2%. Em ambos os casos os inóculos foram mantidos a 28 °C por 22 horas sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®). O volume de meio YPD 2% dentro de cada erlenmeyer correspondia a 1/5 do volume total do frasco. Após as 22 horas, a concentração do inóculo foi determinada pela leitura da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro®) a 570 nm.

3.7 Avaliação da Toxicidade do Extrato de *X. Sagittifolium* por Resazurina

Em uma placa de 96 poços (estéril) transferiu-se 50 µL de meio YPD 2 % líquido livre de células. Adicionou-se 50 µL da solução aquosa do extrato de *X. sagittifolium* no primeiro poço e diluições seriadas foram realizadas. Do primeiro poço, que foi adicionado o extrato de *X. sagittifolium*, retirou-se 50 µL da solução que foi adicionada para o segundo poço, seguindo assim até o último poço de uma mesma linha da placa. Após a diluição, 10 µL da suspensão celular (inóculo) das cepas da levedura *S. cerevisiae* foram adicionadas, obtendo-se uma absorvância de 0,04 em cada poço. Para o controle negativo, foi adicionado em um poço somente 50 µL de meio livre de células. Para controle positivo, foi adicionado 50 µL de meio com 10 µL da suspensão celular.

A placa foi deixada na estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®) por 24 horas a 28 °C. Após esse período, 10 µL de uma solução aquosa a 0,01% (p/v) de resazurina, 7-hidroxi-3H-fenantro[1,2-b]pirazin-3-ona (C₁₂H₇NO₄), foi adicionada em cada poço. Após 30 minutos, foi avaliada a coloração de cada poço, onde a cor rosa sinaliza a presença de atividade metabólica e a cor azul representa a ausência de atividade metabólica (metabolismo celular reduz a resazurina a resorufina). O intuito foi analisar de forma qualitativa a citotoxicidade dose-dependente do extrato.

3.8 Avaliação da Toxicidade do Extrato de *X. Sagittifolium* por Viabilidade Celular

Um volume correspondente a 3,0 mg de células foi coletado, lavado com água destilada estéril e ressuspenso em um microtubo contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio a 0,5 M, pH 6,0. Em seguida, adicionou-se o extrato de *X. sagittifolium* na concentração de 0,6 mg mL⁻¹, mantendo-se a incubação por 2 horas; ou adicionando-se o peróxido de hidrogênio (1,0 mM) e mantendo-se este tratamento por 1 hora. Após esta etapa, alíquotas das suspensões

celulares correspondentes a 40 µg de células foram diluídas em água destilada estéril, em seguida diluições seriadas foram realizadas, e foi feito o plaqueamento destas células em duplicata no meio de cultura sólido YPD 2%. As unidades formadoras de colônias foram contadas após 48 horas de incubação à 28 °C em estufa B.O.D.

3.9 Pré-Tratamento com Extrato e Peróxido de Hidrogênio

Determinou-se a concentração de uma suspensão celular após crescimento celular por 22h. O volume correspondente à concentração de células determinada para cada ensaio foi transferido para tubo tipo falcon estéril, centrifugado, lavado 2 vezes com água destilada estéril, e ressuspensão em solução tampão fosfato de potássio a 0,5 M e pH 6,0. Em seguida foi adicionado o extrato de *X. sagittifolium* na concentração de 0,6 mg mL⁻¹, a suspensão celular foi mantida sob agitação a 28 °C/160 rpm por 2 horas. Logo após, a suspensão celular foi novamente centrifugada e lavada com 10 mL por 2 vezes com água destilada estéril, e ressuspensão em solução tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 6,0. Por fim, o peróxido de hidrogênio (Merck®) foi adicionado (exceto nas células controle) na concentração de 2 mM para o ensaio de oxidação intracelular ou 1,0 mM para os demais ensaios, permanecendo por mais 1 hora sob agitação de 160 rpm a 28 °C no Shaker.

3.10 Viabilidade Celular Antioxidante

Após toda a etapa de pré-tratamento, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a 40 µg de células foram diluídas em água destilada estéril, e após as diluições seriadas foram realizados os plaqueamentos destas células em duplicata no meio de cultura sólido YPD 2%. As unidades formadoras de colônias foram contadas após 48 horas de incubação à 28 °C em estufa B.O.D.

3.11 Peroxidação da Membrana Lipídica

Após a etapa de pré-tratamento, foi recolhida em tubo tipo falcon uma suspensão celular (50 mg de células) e centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos, em seguida as células foram lavadas 2 vezes com água destilada gelada. As células foram ressuspensas em 5,0 mL de água destilada, retirada uma alíquota de 0,1 mL, completada com 9,9 mL de água e mensurada a absorvância a 570 nm. Os outros 4,9 mL da suspensão celular foi centrifugado e ressuspensão em 0,5 mL de TCA 10% (ácido tricloroacético diluído em solução tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 6,0), transferindo-se todo o conteúdo para um tubo de ensaio de parede grossa

contendo 1,5 g de pérolas de vidro. Posteriormente, 6 ciclos de agitação de 20 segundos no vórtex intercalados por repouso no gelo foram realizados a fim de promover a lise celular. O extrato celular foi recolhido em microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 4.000 rpm por 4 minutos.

Em um outro microtubo de tampa de rosca foi adicionado 150 μL do sobrenadante do extrato celular, 150 μL de H_2O , 100 μL de EDTA (Vetec[®]) 0,1 M e 600 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck[®]) 1% em NaOH 0,05 M. Um branco reacional também foi preparado (sem o extrato celular), juntamente com uma duplicata contendo o dobro do sobrenadante de cada extrato celular. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Após o resfriamento dos tubos, a absorvância foi medida no espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em picomoles de malonaldeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de células (pmoles MDA mg cel^{-1}) (Figura 12) (STEELS, LEARMONTH & WATSON, 1994).

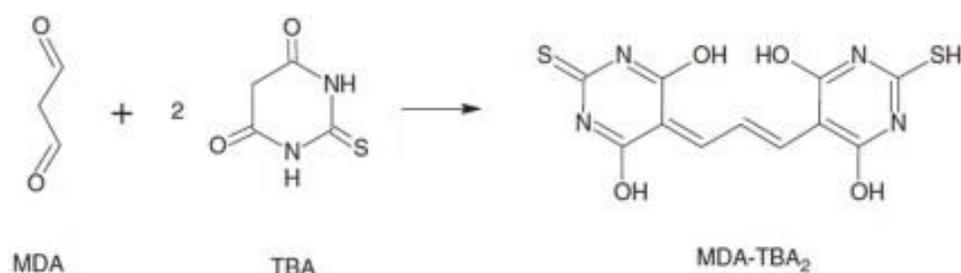


Figura 12. Reação de condensação de malonaldeído e ácido tiobarbitúrico a partir de peroxidação lipídica. FONTE: Adaptado de STEELS, LEARMONTH & WATSON, 1994.

3.12 Disfunção Mitocondrial

Após as etapas de pré-tratamento, um volume da suspensão celular correspondente a 40 μg de células foi diluído em série com água destilada estéril e plaqueado em meio sólido YPGly 4%. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 horas em estufa B.O.D. O ensaio de viabilidade celular em meio YPD 2% foi realizado simultaneamente em meio YPGly 4% para fins de comparação das contagens.

3.13 Avaliação Do Ambiente Redox Intracelular

Uma massa correspondente a 3,0 mg da suspensão celular foi submetida ao pré-tratamento. Logo em seguida as células foram lavadas com 10 mL de água destilada estéril e centrifugadas, depois foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,5 M a um pH de 7,8. Em seguida, 20 μL de uma solução de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

(H₂DCFDA) (Sigma/EUA), preparada a partir de uma solução estoque de 1,0 mM em etanol, foram adicionados, mantendo uma concentração de 20 µM em contato com as células. Após 15 minutos, foram adicionados 20 µL de uma solução de peróxido de hidrogênio, mantendo a concentração de 2,0 mM desse agente estressante.

Após uma hora de incubação a 28 °C e 200 rpm, as suspensões celulares foram submetidas a centrifugação e alíquotas foram transferidas para uma placa de 96 poços. A fluorescência desses sobrenadantes foi medida (Figura 17) utilizando um leitor de microplacas (HIDEX, Turku, Finlândia) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 520 nm, respectivamente.

3.14 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados na forma de uma média e desvio padrão de três experimentos independentes, no mínimo. Por meio do Programa GraphPad PRISM 8.0.1 foi aplicado o teste de análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para a comparação entre os resultados gerados das diversas médias. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Para realizar uma análise da classe de substâncias presentes no extrato de *Xanthosoma sagittifolium*, recorreu-se à aplicação de uma técnica conhecida como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). Essa técnica analítica combina a habilidade de separar os diversos compostos contidos em uma amostra líquida, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com a capacidade de detecção simultânea em múltiplos comprimentos de onda, viabilizada por um arranjo de diodos. Esse procedimento permite uma avaliação das substâncias presentes no extrato, contribuindo para uma compreensão mais profunda de sua composição química.

O procedimento teve início com a injeção da amostra no sistema de cromatografia, composto por uma coluna cromatográfica contendo partículas estacionárias. À medida que a amostra era transportada pelo solvente (fase móvel) através da coluna cromatográfica, ocorria a separação. Os diversos compostos contidos na amostra interagem de maneiras distintas com a fase estacionária, resultando em diferentes tempos de eluição. Para a detecção por meio do Arranjo de Diodos (DAD), o eluente da amostra seguia através de uma célula de detecção equipada com um arranjo de diodos. Os diodos são capazes de detectar a absorção de luz em comprimentos de onda específicos, permitindo a medição da absorção de luz simultaneamente em vários comprimentos de onda durante uma única análise (FACCI *et al.*, 2020). Todos os dados obtidos foram registrados e obteve-se o cromatograma (Figura 14) e os espectros UV (Figura 15).

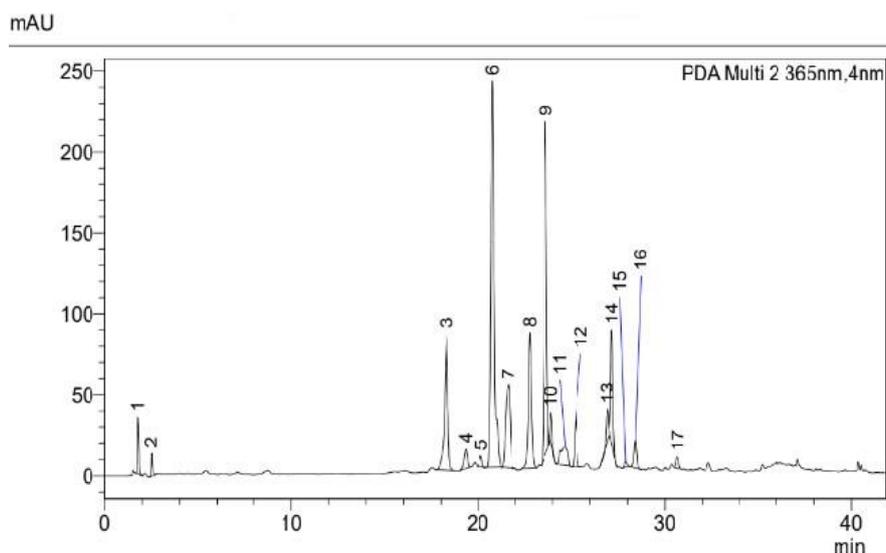
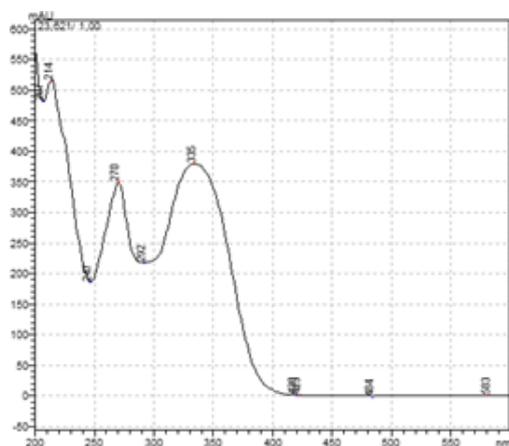


Figura 13. Perfil cromatográfico do extrato de folha de taioba por CLAE-DAD.

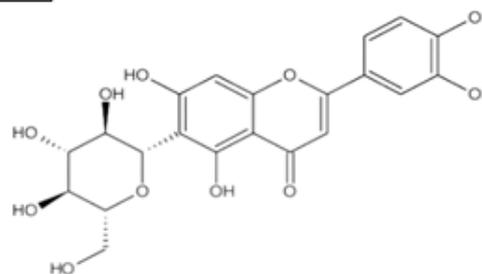
Tabela 2. Descrição de cada pico encontrado de acordo com seu tempo de retenção e porcentagem; composto presente na amostra de acordo com padrões testados.

Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Composto
1	1,78	1,67	
2	2,50	0,62	
3	18,31	12,20	
4	19,35	1,51	
5	20,15	0,64	
6	20,77	28,71	
7	21,62	8,61	
8	22,78	9,35	
9	23,61	20,0	ISORIENTINA
10	23,91	1,09	ORIENTINA
11	24,66	3,02	
12	25,22	2,45	
13	26,91	1,52	ISOVITEXINA
14	27,17	5,87	
15	27,91	0,32	
16	28,41	1,76	
17	30,69	0,64	
TOTAL		100	

No cromatograma derivado do extrato de *X. Sagittifolium*, foi possível identificar um total de 17 picos distintos (Figura 14). Para identificar os flavonoides presentes na amostra, compostos padrões foram usados como base de comparação. A correspondência no tempo de retenção entre os picos do extrato e os picos dos compostos padrões permitiu a classificação das substâncias (Tabela 2). Dentre os 17 picos encontrados, o pico de número 6 destacou-se como o mais predominante, compreendendo uma parcela significativa, equivalente a 28% do total. Seguindo pelo pico 9, que apresentou 20% do total. Vale ressaltar que os picos numerados de 3 a 17 no cromatograma têm a possibilidade de representar flavonoides, devido à concordância no tempo de retenção e às características de bandas UV distintas. Essas características UV englobam duas bandas de absorção distintas: a primeira na faixa de 330-350 nm e a segunda na faixa de 250-270 nm (Figura 15) (BALBUENA & CALDERIUS, 2010).



A



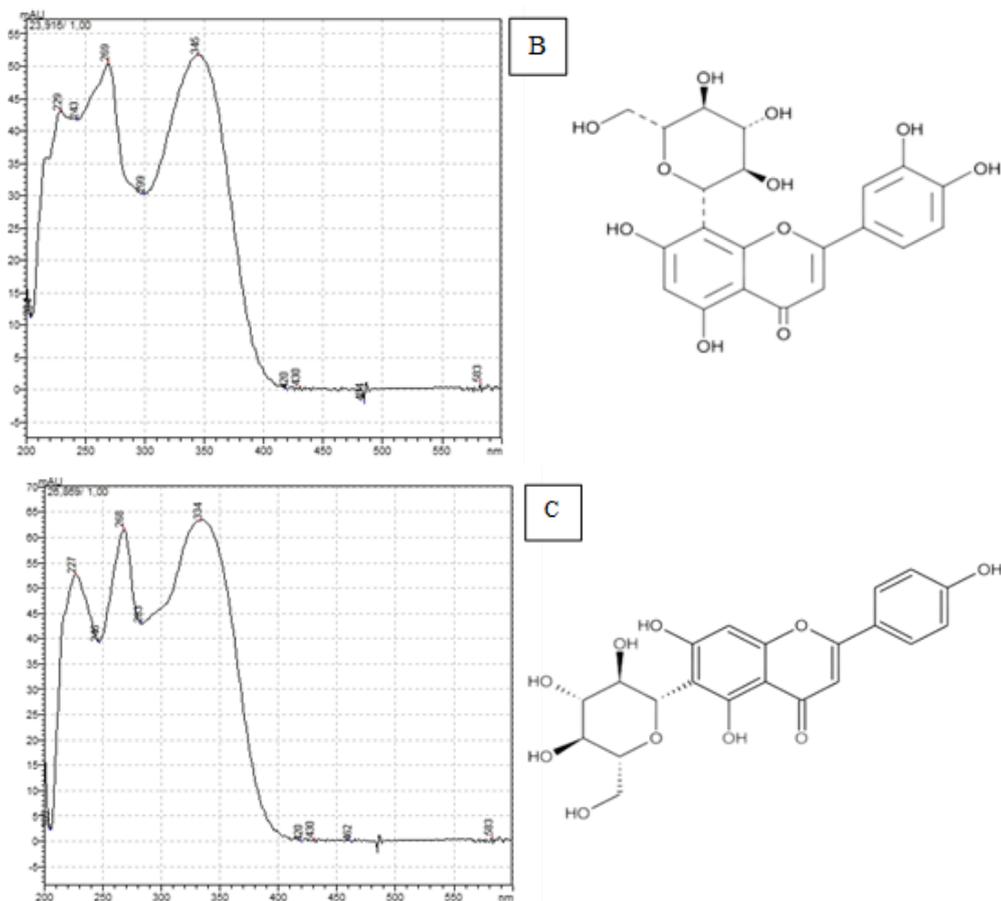


Figura 14. Espectro UV (A) correspondente ao pico 9 e estrutura molecular da isoorientina. Espectro UV (B) correspondente ao pico 10 e estrutura molecular da orientina. Espectro UV (C) correspondente ao pico 13 e estrutura molecular da isovitexina.

Nesta análise foram caracterizados três picos específicos. O pico 9 foi identificado como isorientina, constituindo 20% da amostra, enquanto o pico 10 foi associado à orientina, com uma presença de 1,09%. Além disso, o pico 13 foi classificado como isovitexina, representando 1,52% da composição total. Essas descobertas ressaltam a riqueza da amostra em termos de flavonoides e fornecem informações relevantes sobre sua composição química.

Para a isoorientina, observou-se bandas de absorvância em 270 nm e 335 nm. Em relação à orientina, as análises revelaram a presença de bandas de absorvância a 269 nm e 345 nm, enquanto, para a isovitexina, as bandas de absorvância se manifestaram a 268 nm e 334 nm. Importante salientar que os valores obtidos para cada um desses compostos guardam coerência com dados já registrados na literatura (JANG *et al.*, 2019).

A constatação do perfil químico do extrato neste estudo reforça os achados previamente documentados na literatura. Williams (1981) e colaboradores já haviam relatado a presença de flavonoides em espécies pertencentes à família Araceae. Além disso, registros de flavonóis com diversos graus de glicosilação foram feitos em *Colocasia esculenta* (FERRERES *et al.*, 2012).

Em uma pesquisa adicional, a análise do extrato metanólico da planta *Xanthosoma violacium* apontou como principais constituintes a apigenina 6,8-di-C- β -D-glucopiranosídeo, isovitexina e vitexina. Importante observar que essa planta pertence ao mesmo gênero que a *X. sagittifolium* (PICERMO *et al.*, 2003). Um outro estudo utilizando o extrato butanólico obtido a partir das folhas da planta *L. japonica* realizou um procedimento de cromatografia, resultando na identificação de diversos flavonoides. Entre esses compostos, destacam-se a isovitexina, a 6,8-di-C- β -glucosilapigenina, a isoorientina 6,8-di-C- β -glucosilluteolina, o éter 3'-metílico de luteolina, o éter 3'-metílico de isoorientina e o luteolina-7-O- β -glicosídeo (BAI *et al.*, 2018)

A isoorientina, também reconhecida como uma flavona C-glicosil, possui a nomenclatura 2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il] cromen-4-ona. Sua fórmula molecular é representada por C₂₁H₂₀O₁₁, com um peso molecular de 448,38 g mol⁻¹. Estudos científicos têm revelado uma série de propriedades associadas a essa molécula. Entre as propriedades investigadas, destaca-se a capacidade de manter os níveis de glicose no sangue e aumentar a sensibilidade à insulina; sendo observados efeitos benéficos, como a redução do peso corporal e a limitação do acúmulo de lipídios em experimentos envolvendo ratos diabéticos. Além disso, a literatura científica relata propriedades antioxidantes atribuídas à isoorientina. Esses achados apontam para um considerável potencial terapêutico dessa substância (LUAN *et al.*, 2018; MAZIBUKO-MBEJE *et al.*, 2020).

A orientina é um flavonoide C-glicosídeo hidrossolúvel, cujo nome é 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroxietil)-oxan-2-il]cromen-4-ona. Apresenta uma fórmula molecular de C₂₁H₂₀O₁₁ e um peso molecular de 448,37 g mol⁻¹. Suas notáveis propriedades antioxidantes têm sido objeto de extensa investigação científica. Estudos apontam que a administração de orientina a ratos idosos resultou no aumento do peso cerebral desses animais. Além disso, observou-se um acréscimo nos níveis de enzimas antioxidantes, como a catalase, a glutationa peroxidase e a superóxido dismutase, tanto no soro quanto nos tecidos cerebrais, hepáticos e renais dos ratos tratados. Paralelamente, houve uma redução significativa nos níveis de malonaldeído, que é um biomarcador de estresse oxidativo, especialmente nos tecidos cerebrais, hepáticos e renais. Adicionalmente, constatou-se uma diminuição significativa nos níveis de lipofuscina, um pigmento relacionado ao envelhecimento, nesses mesmos tecidos (AN *et al.*, 2012). Cabe destacar que a orientina tem sido objeto de ampla investigação devido ao seu notável efeito cardioprotetor *in vivo*. Estudos demonstraram que a orientina desempenha um papel significativo na redução apoptótica das células do miocárdio em ratos submetidos a condições

de isquemia e subsequente reperfusão cardíaca (LAM *et al.*, 2016).

A isovitexina é classificada como 6-C-glicosil-4',5,7-trihidroxi-flavona, com uma fórmula molecular representada por $C_{21}H_{20}O_{10}$ e um peso molecular de $432,37 \text{ g mol}^{-1}$. Suas propriedades são extensamente documentadas na literatura científica, abrangendo propriedades antioxidantes e neuroprotetoras com notáveis características terapêuticas. Um exemplo é a capacidade de inibir a ação de colinesterases (MIN *et al.*, 2015). Estudos também apontam melhorias no desempenho cognitivo associado ao uso dessa substância (OIVEIRA *et al.*, 2014). Portanto, a isovitexina não apenas oferece propriedades antioxidantes, mas também demonstra potencial na promoção da saúde cerebral e no suporte à função cognitiva (ZIQUBU *et al.*, 2020).

4.2 Teste Qualitativo da Toxicidade do Extrato de *X. sagittifolium* por Resazurina

O ensaio qualitativo com o reagente resazurina teve como finalidade verificar se o extrato aquoso de *X. sagittifolium* apresentava toxicidade às células de *S. cerevisiae* utilizando uma ampla faixa de concentrações desse extrato. Além disso, um outro objetivo deste ensaio foi selecionar uma faixa de concentrações não citotóxicas do extrato para serem empregadas nas análises posteriores visando o potencial antioxidante de *X. sagittifolium*.

O ensaio é baseado na reação de redução da resazurina pelo metabolismo redox intracelular, originando um produto reduzido denominado resorufina. Esse processo envolve a captura de elétrons (ganho de elétrons) pela resazurina a partir de moléculas redutoras geradas durante o metabolismo celular. A suspensão celular contendo resorufina apresenta uma tonalidade rósea a olho nu, portanto, à medida que a resazurina, que em solução apresenta uma solução azulada, é reduzida, a solução muda de cor, passando de azul para rosa. A mudança de cor da suspensão celular contendo resazurina de azul (oxidada) para rosa (reduzida) é resultado da alteração química em sua estrutura molecular, afetando a absorção de luz da molécula na região do espectro visível (Figura 16). Essa redução irá ocorrer em células metabolicamente ativas, ou seja, células vivas; que produzem e utilizam NADH e NADPH, ou qualquer outra molécula redutora, como fonte de elétrons. Este ensaio possibilita a análise da toxicidade a partir da visualização da mudança ou não da coloração da suspensão celular, apresentando resultados qualitativos. Cabe destacar que a coloração da solução aquosa do extrato (marrom) influenciou na análise visual da coloração da suspensão celular final, resultando numa coloração marrom nos primeiros poços, correlacionada com um maior volume de extrato. Vale ressaltar que a resazurina é um composto não tóxico para esse modelo biológico (PETTIT *et*

al., 2005).

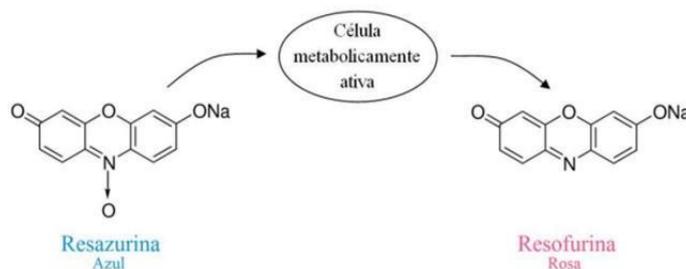


Figura 15. Esquema da conversão por oxirredução da resazurina para resorufina por agentes redutores gerados em células metabolicamente ativas.

FONTE: CANABARRO, 2017.

Nesta análise foram empregadas duas cepas (BY4741 e $\Delta yap1$) para avaliar como o perfil de atividade metabólica se comporta em resposta a diferentes concentrações do extrato de *X. Sagittifolium*. A utilização da cepa mutante visou avaliar o quanto uma substância incomum ao metabolismo celular poderia causar maior sensibilidade às células; uma vez que parte da produção de agentes redutores poderia estar comprometida, indicando um déficit no metabolismo redox da cepa mutante, visto que diversos sistemas de defesa que utilizam o potencial redox gerado pelo metabolismo celular estão presentes na cepa BY4741, porém ausentes na cepa $\Delta yap1$.

Para a avaliação da coloração presente em cada poço (Figuras 17 e 18) realizou-se um comparativo em relação aos poços que constituíam o grupo controle (Linha B). A Linha A, correspondente a uma sequência de diferentes concentrações do extrato, estão organizadas em ordem decrescente, do primeiro ao décimo segundo poço. Essas concentrações variavam de 20,8 mg mL⁻¹ a 0,01 mg mL⁻¹, sendo respectivamente: 20,8 - 10,4 - 5,2 - 2,6 - 1,3 - 0,6 - 0,3 - 0,16 - 0,08 - 0,04 - 0,02 - 0,01. Na Linha B, o primeiro poço é o controle negativo, no qual havia apenas meio de cultura, células pertencentes à cepa controle e o reagente resazurina (representando as condições metabólicas normais das células); já o segundo poço representava o controle de células estressadas, contendo meio de cultura, células da cepa controle, uma solução de peróxido de hidrogênio (1,0 mM) e o reagente resazurina (representando as células com metabolismo redox comprometido).



Figura 16. Ensaio qualitativo com resazurina utilizando a cepa controle (BY4741). Linha A: Suspensões celulares contendo concentrações decrescentes do extrato aquoso de *X. sagittifolium*. Linha B: controle negativo (suspensão

celular) e controle positivo de toxicidade (suspensão celular na presença de peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM).



Figura 17. Ensaio qualitativo com resazurina utilizando a cepa mutante ($\Delta yap1$). Linha A: Suspensões celulares contendo concentrações decrescentes do extrato aquoso de *X. sagittifolium*. Linha B: controle negativo (suspensão celular) e controle positivo de toxicidade (suspensão celular na presença de peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM).

Na Figura 17, revelando o ensaio realizado com a cepa controle, pode-se observar que nos poços nos quais o extrato foi adicionado, em comparação com aqueles que representam os poços controle, não houve toxicidade do extrato em nenhuma concentração avaliada. Isso se evidencia pelo fato de que não foi observada qualquer coloração azul em nenhum dos poços, sendo que todos eles exibiram uma coloração semelhante àquela presente no controle negativo. Ao analisar a Figura 18 correspondente à cepa mutante, percebemos que o mesmo padrão de comportamento se repetiu; logo as concentrações do extrato que foram utilizadas também não demonstraram ser tóxicas, uma vez que os resultados obtidos foram semelhantes àqueles observados no controle negativo.

Em consonância com os resultados já mencionados, é válido notar que estudos prévios abordando a citotoxicidade do extrato hidroetanólico de folhas de *X. sagittifolium*, em células de fibroblastos de camundongo, não demonstraram a presença de toxicidade em nenhuma das concentrações que foram examinadas, variando de 25 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, também foi analisada uma linhagem de células humanas leucêmicas, e é relevante observar que o extrato hidroetanólico obtido a partir das raízes de *X. sagittifolium*, quando administrado na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, também não manifestou efeitos citotóxicos (CAXITO *et al.*, 2015). Ainda assim, outro estudo sobre citotoxicidade, em que células humanas de câncer cervical foram submetidas ao contato com extrato metanólico de *A. tortuosum*, planta da família Araceae, demonstrou inibição de crescimento celular dose-dependente. A análise foi feita em diferentes concentrações que variaram de 25 mg mL^{-1} a 100 mg mL^{-1} (NILE & PARK, 2014).

Uma concentração intermediária dentre as examinadas neste ensaio foi eleita para ser empregada nos estudos subsequentes, correspondendo à concentração de 0,6 mg mL^{-1} , o que está em conformidade com dados relatados na literatura, apontando que concentrações superiores a 25 mg mL^{-1} exibem toxicidade, enquanto concentrações inferiores são consideradas não tóxicas.

4.3 Avaliação Quantitativa da Toxicidade do Extrato de *X. sagittifolium* por Viabilidade Celular

O propósito central deste experimento foi conduzir uma análise quantitativa para avaliar a toxicidade do extrato de *X. sagittifolium*, com a finalidade de analisar se o extrato detinha a capacidade de provocar algum tipo de dano às células ou se, alternativamente, o metabolismo celular seria capaz de manter sua viabilidade. No presente estudo, utilizou-se as cepas controle (BY4741) e mutante ($\Delta yap1$). O ensaio foi composto por três grupos distintos, sendo um grupo controle (constituído por células que não foram submetidas a nenhum tratamento), um grupo de células estressadas (constituído por células submetidas ao agente estressor) e, por fim, um grupo composto por células submetidas à exposição do extrato de *X. sagittifolium*, cuja concentração era de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$. As células foram plaqueadas em meio de cultura YPD 2%, contendo a glicose como fonte de carboidrato (meio de cultura fermentável).

Paralelamente a este ensaio, foi realizada uma avaliação da disfunção mitocondrial. Para isso, as células foram plaqueadas em meio de cultura YPGly 4%, que inclui glicerol como a única fonte de carbono disponível, sendo essa fonte não fermentável. Isso direciona as células a adotar o metabolismo respiratório (aeróbico) como meio de obtenção de crescimento e desenvolvimento. O processo de respiração celular ocorre nas mitocôndrias, que possuem complexos enzimáticos responsáveis para o transporte de elétrons na cadeia respiratória e, por fim, a aceitação dos elétrons finais pelo oxigênio molecular. Ao impor a utilização do metabolismo aeróbico, é possível realizar uma análise mais precisa para determinar se o tratamento afetou de alguma forma as condições de funcionamento da mitocôndria, pois a partir de um desequilíbrio oxidativo, a função mitocondrial pode ser prejudicada, impactando diretamente a produção de energia e, conseqüentemente, comprometendo a sobrevivência celular (GRANT, MACIVER & DAWES, 1997).

No meio de cultura sólido YPGly 4%, é notável que as células desenvolvem-se formando colônias de pequeno porte, frequentemente denominadas de petites. Uma baixa viabilidade nesse meio, quando comparada ao meio YPD 2%, sinaliza possíveis danos à mitocôndria. Esse cenário ocorre devido às dificuldades enfrentadas pelas células na ativação das mitocôndrias e na subsequente produção de energia por meio da respiração aeróbica, acarretando significativamente o desenvolvimento das células (LING *et al.*, 2019).

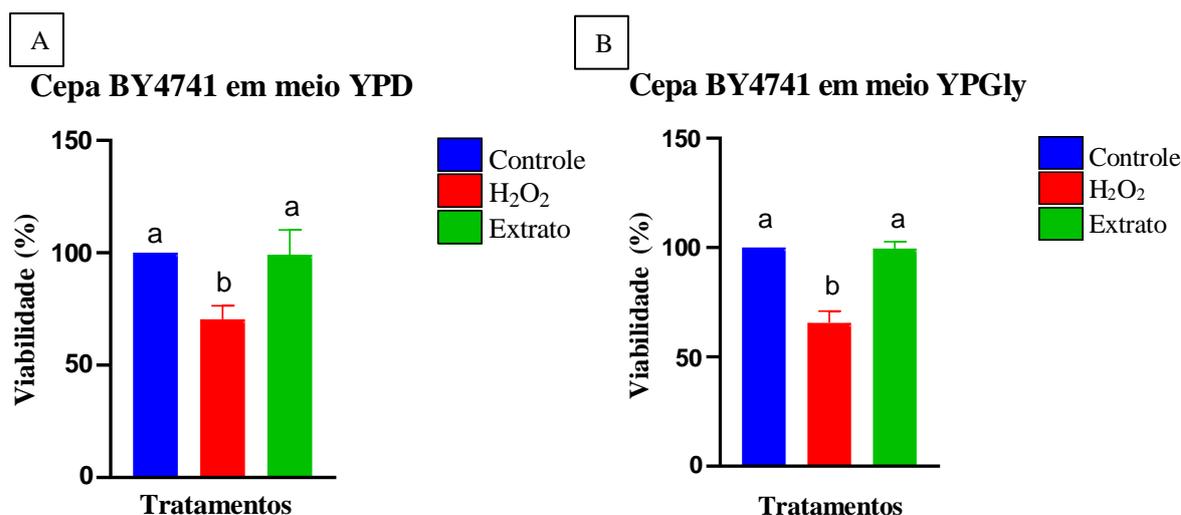


Figura 18. Gráficos do ensaio quantitativo de toxicidade por viabilidade celular x tratamento na cepa BY4741 em meio YPD (A) e meio YPGly (B). Exposição ao extrato de *X. sagittifolium* na concentração de $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ por 2 horas.

Foi observado que as células da cepa BY4741 submetidas à exposição do extrato *X. sagittifolium* em meio YPD mantiveram uma taxa de viabilidade comparável àquela do grupo controle, que foi considerada como 100%; apresentado a viabilidade correspondente a $99,1\% \pm 4,4$ em relação ao controle. Em contrapartida, as células submetidas ao peróxido de hidrogênio, agente estressor, apresentaram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente $70\% \pm 8,3$ (Figura 19A). A análise estatística revelou que os resultados do grupo controle e das células que foram expostas ao extrato apresentaram-se estatisticamente semelhantes. Portanto, na concentração previamente selecionada, de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ do extrato, não foram observados indícios de toxicidade.

O resultado representado na Figura 19A está em conformidade com a análise relatada anteriormente (ensaio utilizando o reagente resazurina), onde a concentração do extrato de *X. sagittifolium* que foi avaliada não mostrou indícios de toxicidade para a cepa BY4741. Uma pesquisa realizada por Guimarães e colaboradores verificou que o extrato aquoso obtido a partir de *Philodendron megalophyllum*, planta pertencente à família Araceae, demonstrou não exibir efeitos citotóxicos sobre as células de fibroblastos humanos, onde a viabilidade celular foi mantida a 93,2% mesmo na concentração mais elevada avaliada, a qual atingiu $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GUIMARÃES *et al.*, 2020). Um outro ensaio realizado para verificar a toxicidade do extrato de *Colocasia gigantea*, planta pertencente à família Araceae, através da administração oral à ratos identificou que doses variadas de 200 e 2.000 mg kg^{-1} de peso corporal não manifestou indício de toxicidade (ALAM *et al.*, 2021).

A análise dos resultados indica que, ao avaliar a cepa BY4741, em meio YPGly não se observaram diferenças substanciais entre o grupo controle e as células submetidas ao tratamento com o extrato *X. sagittifolium*. A taxa de sobrevivência para o controle foi considerada como 100%, enquanto aquelas que foram tratadas com o extrato demonstraram uma taxa de sobrevivência de $99,5\% \pm 4,4$ com relação ao controle. Por outro lado, as células submetidas exclusivamente ao estresse exibiram uma viabilidade de $65,6\% \pm 4,9$ (Figura 19B). A análise estatística apontou que o grupo controle e o grupo de células expostas ao extrato *X. sagittifolium* demonstraram similaridade. Logo, na concentração de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ do extrato, previamente determinada, não foi detectada toxicidade.

Os resultados obtidos mostram que o extrato de *X. sagittifolium* não exibiu evidências de toxicidade para as células, inclusive em relação às mitocôndrias, uma vez que o crescimento celular em meio YPGly se assemelhou ao observado nas células que foram plaqueadas em meio de cultura YPD. Para a cepa mutante o resultado obtido está ilustrado abaixo (Figura 20).

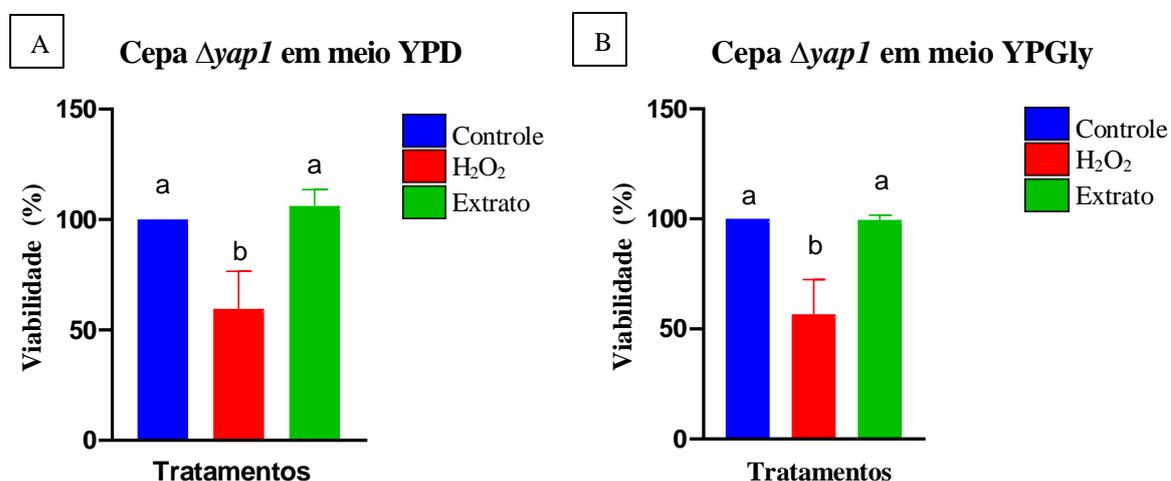


Figura 19. Gráficos do ensaio quantitativo de toxicidade por viabilidade celular x tratamento na cepa BY4741 em meio YPD (A) e meio YPGly (B). Exposição ao extrato de *X. sagittifolium* na concentração de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ por 2 horas.

No que diz respeito à cepa mutante (*Δyap1*) com crescimento em meio de cultura YPD (Figura 20A), a taxa de sobrevivência das células expostas ao extrato *X. sagittifolium* atingiu $106\% \pm 7,9$ de viabilidade, sendo um pouco superior à observada no grupo controle. Em contrapartida, as células submetidas ao estresse oxidativo apresentaram uma taxa de sobrevivência de $59\% \pm 9,8$. A análise estatística revelou que não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo exposto ao extrato.

Para as células que foram cultivadas em meio de cultura YPGly (Figura 20B), observou-se um padrão semelhante entre o grupo controle e o grupo que passou pelo tratamento com o extrato de *X. sagittifolium*, sendo estatisticamente semelhantes entre si. A taxa de viabilidade

do grupo controle foi determinada como 100%, e o grupo que recebeu o tratamento com o extrato *X. sagittifolium* foi de $99,6\% \pm 6,5$. Em contraste, as células que passaram apenas pelo estresse exibiram a porcentagem de viabilidade de $59,6\% \pm 4,1$.

Em ambas as análises, as células expostas ao extrato *X. sagittifolium* apresentaram um crescimento que se assemelha ao grupo de controle, indicando que não houve evidências de danos específicos às mitocôndrias das células. Portanto, podemos inferir que a ausência de toxicidade deste extrato não resultou em impactos negativos direcionados à viabilidade celular, assim como já havia sido verificado nos ensaios de toxicidade discutidos anteriormente.

4.4 Peroxidação da Membrana Lipídica

Após a determinação e confirmação de que a concentração a ser utilizada nos ensaios não mostrou toxicidade, o próximo passo consistiu na realização do ensaio de peroxidação lipídica. Esse ensaio foi conduzido para investigar o efeito protetor do extrato de taioba nas células de *S. cerevisiae* diante do estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, que é um agente oxidante naturalmente produzido durante o metabolismo celular. Essa espécie química desempenha um papel fisiológico importante em condições celulares normais, como sinalização intracelular. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio em sua concentração, pode resultar em uma série de danos às células, incluindo a oxidação dos lipídios da membrana, o que pode afetar a integridade estrutural e, portanto, prejudicar as funções celulares (URBAN *et al.*, 2017).

Este ensaio permite examinar de forma mais detalhada o cenário redox intracelular, pois quantifica produtos oriundos da degradação de lipídios de membrana em um quadro de estresse. Nesse tipo de dano celular, ocorre uma série de reações bioquímicas que resultam na formação de radicais lipídicos por conta da ação de espécies radicalares nos lipídios insaturados das membranas celulares (Figura 21). As consequências estendem-se a danos à estrutura membranar, comprometendo a permeabilidade desta célula e até mesmo podendo gerar morte celular (AYALA *et al.*, 2014).

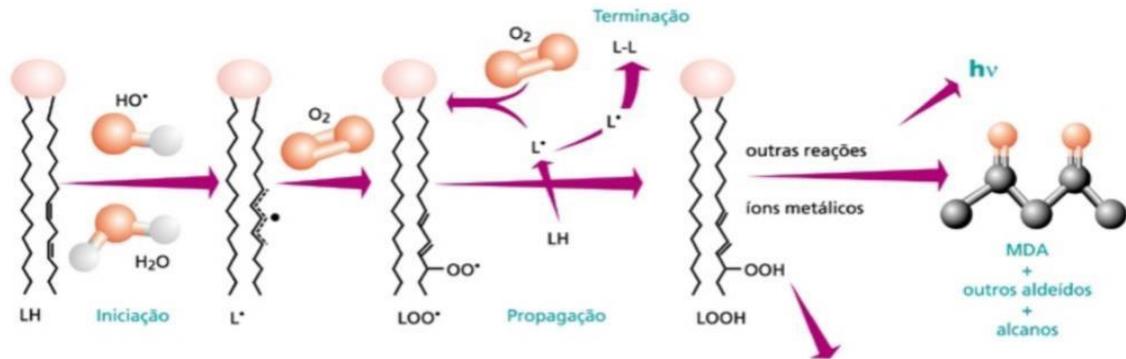


Figura 20. Formação de espécies radicalares lipídicas e do malonaldeído (MDA).
 FONTE: Radicais Livres: bons, maus e naturais (AUGUSTO, 2006).

A mudança de permeabilidade na membrana celular pode alterar o fluxo iônico e de outras substâncias, resultando na perda de seletividade de entrada e saída de nutrientes e substâncias que deveriam ser descartadas. Como consequência também pode gerar danos ao DNA e alterações no ciclo celular (AYALA *et al.*, 2014; LIMA, SAES & ABDALLA, 2001). Os resultados obtidos no ensaio para verificação dos níveis de peroxidação lipídica mostraram proteção antioxidante do extrato de *X. sagittifolium* para a cepa controle (BY4741), na concentração de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 22).

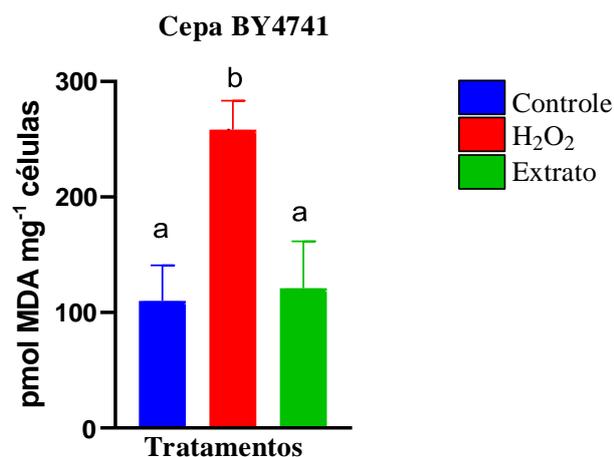


Figura 21. Gráfico da avaliação da peroxidação lipídica na cepa controle. Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato *X. sagittifolium* ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio ($1,0 \text{ mM}$) por 1h.

Para as células pertencentes ao grupo controle, obteve-se a concentração de $110,1 \text{ pmol de MDA mg}^{-1}$ de células. Em contrapartida, para as células submetidas ao estresse oxidativo, observou-se uma concentração elevada, atingindo $258,5 \text{ pmol de MDA mg}^{-1}$ de células. No caso das células que foram submetidas ao tratamento com o extrato aquoso de *X. sagittifolium*, foi registrada uma concentração de $121,12 \text{ pmol de MDA mg}^{-1}$ de células. É relevante notar que as células em seu estado basal exibiram uma redução notável de $64\% \pm 8,5$ nos níveis de

MDA quando comparadas às células submetidas apenas ao estresse oxidativo. Já as células expostas ao extrato aquoso de *X. sagittifolium* demonstraram uma diminuição significativa de $53,1\% \pm 8,1$ nos níveis de MDA em comparação com as células que foram unicamente submetidas ao estresse oxidativo. A análise estatística revelou que o tratamento com o extrato de *X. sagittifolium* produziu resultados estatisticamente equivalentes aos níveis basais de MDA com $P < 0,05$.

Os resultados obtidos nesta análise demonstraram que o pré-tratamento com o extrato se revelou eficaz na proteção das membranas lipídicas contra os danos provocados pela exposição ao peróxido de hidrogênio. Logo, os dados resultantes desta análise estão em concordância com os adquiridos previamente durante o ensaio de viabilidade antioxidante realizado na cepa controle (BY4741), onde verificou-se que o extrato aquoso de *X. sagittifolium*, na concentração de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$, mostrou propriedades antioxidantes; corroborando, deste modo, a capacidade do extrato de *X. sagittifolium* em atuar como um agente antioxidante, reduzindo os danos celulares causados pelo estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio.

Uma pesquisa conduzida por Arruda e colaboradores (2004) avaliou os níveis de peroxidação lipídica em células hepáticas e cardíacas de ratos mediante suplementação alimentar. Os animais foram submetidos a uma dieta contendo folhas de *X. sagittifolium*, com uma proporção de 107 g de folhas por quilograma de peso dos animais. Este estudo envolveu a exposição dos ratos a um período de deficiência de vitamina A por um período de 37 dias para induzir o estresse oxidativo. Os resultados obtidos neste ensaio apontaram que a ingestão das folhas de *X. sagittifolium* demonstraram uma eficácia na redução dos danos que afetam a integridade da membrana lipídica nestes tipos celulares. Essa eficácia equiparou-se à observada em ratos que foram alimentados com β -caroteno, que serviu como grupo controle positivo no estudo. Além disso, é relevante mencionar uma outra análise que empregou células humanas K562, células relacionadas à leucemia mieloide crônica, expostas a diferentes concentrações do extrato obtido a partir das folhas de *Cyperus rotundus*, uma planta pertencente à família Araceae. As concentrações do extrato variaram de 35 a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. O resultado observado foi que o extrato exibiu uma capacidade significativa de reduzir os níveis de danos na membrana lipídica, causado pelo peróxido de hidrogênio, de maneira diretamente proporcional à concentração utilizada; demonstrando uma resposta dose-dependente (KILANI-JAZIRI *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado com o extrato de *Amorphophallus konjac*, outra planta da família Araceae, em diferentes concentrações (20, 40, 60, 80 e 100 mg mL^{-1}), utilizou-se plasma

humano com o propósito de avaliar sua capacidade de reduzir os níveis de MDA. Os resultados revelaram que esse extrato, nas concentrações mais elevadas, apresentou uma notável capacidade antioxidante, resultando em uma redução significativa de 93% nos níveis de peroxidação lipídica. É relevante destacar que esse efeito antioxidante se assemelhou ao obtido com o controle positivo, o trolox, o qual também demonstrou uma redução de 92% (GAMBOA-GÓMEZ *et al.*, 2020). Esses resultados corroboram os obtidos neste estudo, sugerindo um potencial promissor de plantas da família Araceae como agente antioxidante em comparação com o extrato aquoso de *X. sagittifolium*.

No caso da cepa mutante (*Δyap1*), foi observado que a presença do extrato aquoso de *X. sagittifolium* resultou em uma diminuição dos níveis de peroxidação lipídica para 139,4 pmol MDA mg⁻¹ de células em comparação com as células submetidas ao estresse por peróxido de hidrogênio (1,0 mM), que registraram uma concentração de 167,2 pmol MDA mg⁻¹ de células. Enquanto isso, para o grupo controle não estressado, a concentração foi de 99,6 pmol MDA mg⁻¹ de células. Portanto, a exposição ao extrato demonstrou uma redução de 16,6% ± 2,1 nos níveis de MDA em comparação com as células que foram submetidas apenas ao estresse (Figura 23). A análise estatística indica que os resultados para as células que passaram pelo tratamento de estresse e para as células que foram expostas ao extrato *X. sagittifolium* são estatisticamente semelhantes.

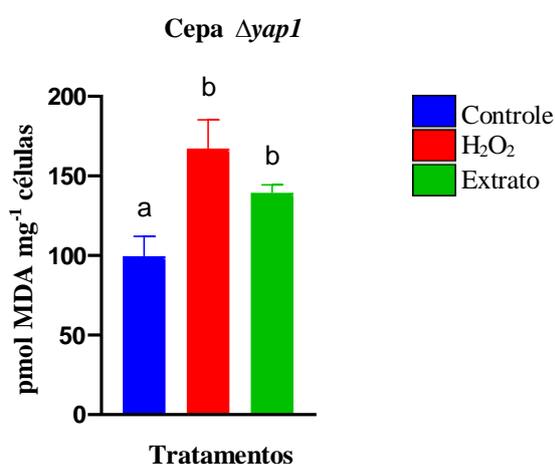


Figura 22. Gráfico de avaliação da peroxidação lipídica na cepa mutante. Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato (0,6 mg mL⁻¹), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1h.

Neste contexto, ao aprofundarmos a análise do ambiente redox intracelular, observamos que os resultados revelaram que o tratamento com o extrato não foi eficaz na proteção das membranas lipídicas contra os danos oxidativos sofridos pelas células.

É importante ressaltar que outros estudos também corroboraram esse padrão de

resultados, em que a cepa sem nenhuma deleção de *S. cerevisiae* demonstrou uma maior resistência aos danos nas membranas lipídicas provocados pela presença de arsênio, que é um metalóide altamente tóxico e contribui para o quadro de estresse oxidativo; enquanto a cepa mutante ($\Delta yap1$) apresentou-se mais sensível, com níveis elevados de peroxidação de lipídios, deixando claro que o arsênio pode induzir o estresse oxidativo em organismos deficientes em seu sistema de defesa antioxidante e que a reversão deste estresse é menos pronunciada ou inexistente, dependendo dos danos causados (MENEZES *et al.*, 2008).

Neste experimento, a ausência do gene *YAP1* revelou que a cepa mutante se tornou mais sensível ao estresse em comparação com a cepa controle (BY4741). Adicionalmente, é importante destacar que pesquisas anteriores utilizando uma linhagem celular hepática humana documentaram que o extrato de *A. konjac*, planta da mesma família Araceae, reduziu os níveis de malonaldeído, com um aumento nos níveis de atividade das enzimas glutatona peroxidase e catalase; concluindo que os efeitos citoprotetores do extrato desta planta estavam relacionados ao aumento da atividade de enzimas CAT e GSH-Px (JIAN *et al.*, 2017). Isto também se observa nos resultados obtidos neste estudo, onde o extrato de *X. sagittifolium* pode estar influenciando positivamente a atividade de enzimas antioxidantes na cepa controle. Já para a cepa mutante ($\Delta yap1$), este comportamento não foi observado exatamente por não apresentarem suas principais vias antioxidantes plenamente expressas resultando em uma menor resistência celular. Em virtude disso, o extrato aquoso de *X. sagittifolium* não se mostrou capaz de reparar os danos aos lipídios que foram gerados nesse contexto.

4.5 Avaliação do Ambiente Redox Intracelular

Este ensaio possibilita uma avaliação mais precisa do estado redox intracelular, uma vez que mensura as condições resultantes do aumento do estresse oxidativo. Estudos anteriores já confirmaram que a mensuração da fluorescência da diclorofluoresceína (DCF) no meio extracelular é uma abordagem válida para detectar as condições oxidantes no interior das células, servindo como um indicador geral de estresse oxidativo (LEBEL, ISCHIROPOULOS & BONDY, 1992). A oxidação intracelular é estimada através da utilização do composto diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H_2DCFDA), que tem a capacidade de penetrar facilmente na membrana plasmática e é subsequentemente desacetilado no interior das células por enzimas esterases. Dentro do ambiente intracelular, a 2',7'-diclorofluoresceína, inicialmente não fluorescente (H_2DCF), é convertida em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente, e sua concentração é então quantificada fluorimetricamente em um comprimento de onda específico

(JAKUBOWSKI & BARTOSZ, 1997).

Após a conclusão dos ensaios realizados com o extrato de *X. sagittifolium*, é possível observar o resultado obtido para as cepas controle BY4741 e $\Delta yap1$, os quais estão ilustrados nas Figura 24 e 25, respectivamente.

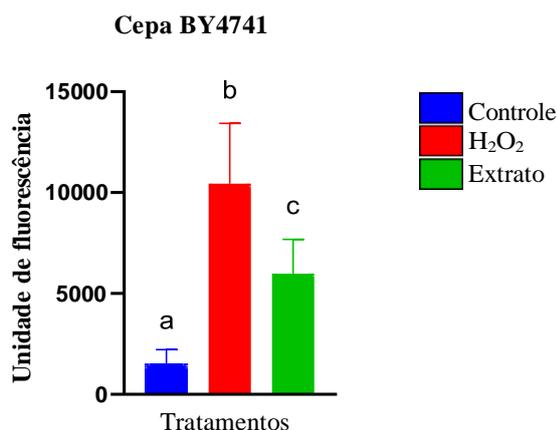


Figura 23. Gráfico da avaliação da oxidação intracelular na cepa BY4741. Células foram submetidas ao pré-tratamento por 2h com o extrato ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio ($2,0 \text{ mM}$) por 1h.

Para as células pertencentes ao grupo controle, a análise revelou uma concentração expressa em unidade de fluorescência, que foi quantificada em 1527,5. Por outro lado, no grupo de células expostas exclusivamente ao agente estressor, detectou-se um valor notável de 10444,0, o que demonstrou um aumento significativo na intensidade de fluorescência, sendo $85,4\% \pm 5,1$ mais elevado do que o grupo controle. Esse aumento é indicativo da presença de um nível mais elevado de espécies oxidantes, conforme esperado. No grupo de células que foram submetidas ao tratamento com o extrato de *X. sagittifolium*, a intensidade de fluorescência foi registrada em 5983,5, o que representa uma redução significativa de $42,7\% \pm 2,1$ em comparação com o valor observado no grupo de células submetidas ao estresse.

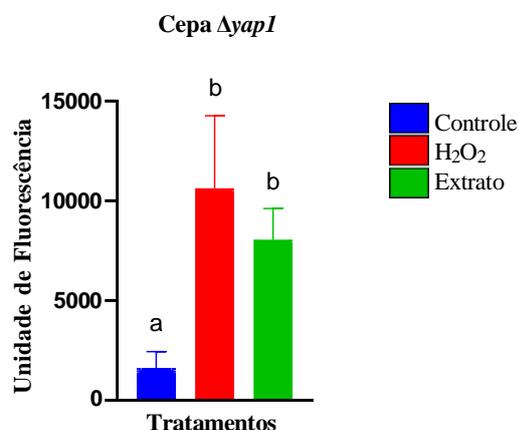


Figura 24. Gráfico da avaliação da oxidação intracelular na cepa $\Delta yap1$. Células foram submetidas ao pré-

tratamento por 2h com o extrato (0,6 mg mL⁻¹), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por 1h.

Nas células pertencentes ao grupo da cepa mutante, a análise revelou uma intensidade de fluorescência quantificada em 1621,0. Em contraste, no grupo de células expostas exclusivamente ao agente estressor, foi observado um valor notável de 10629,0, indicando um aumento significativo na intensidade de fluorescência, sendo 84,7% ± 2,3 mais elevado do que o grupo controle, esse aumento é indicativo da presença de um nível mais elevado de espécies oxidante, conforme era esperado. Já no grupo de células submetidas ao tratamento com o extrato de *X. sagittifolium*, a intensidade de fluorescência foi registrada em 8055,0, representando uma redução de 24,2% ± 2,1 em comparação com o valor observado no grupo de células submetidas ao estresse. A análise estatística indica que o grupo de células estressadas e o grupo que recebeu o tratamento com o extrato são semelhantes entre si, sugerindo que o ambiente redox encontrado nessas duas situações foi próximo.

Os resultados obtidos sugerem que na cepa BY4741, a presença do extrato de *X. sagittifolium* foi eficaz em atenuar o ambiente redox desencadeado pelo agente estressor. Isso implica que o extrato desempenha um papel na modulação do estado redox nessa cepa, contribuindo para a redução do estresse oxidativo gerado pelo agente. Informações disponíveis na literatura corroboram os resultados obtidos neste estudo, onde uma pesquisa conduzida por Jian e colaboradores teve como foco a avaliação da capacidade antioxidante do extrato da planta *A. konjac*, utilizando células humanas hepáticas. Nesse estudo, os pesquisadores investigaram os níveis de EROs intracelulares e observaram que, após o pré-tratamento com concentrações do extrato da planta na faixa de 0,1 a 0,4 mg mL⁻¹, seguido da exposição ao H₂O₂, houve uma notável redução de aproximadamente 36% nos níveis de EROs. Essa redução aproximou-se dos níveis observados no grupo controle, que foi composto por células pré-tratadas com vitamina E (JIAN *et al.*, 2017). Em uma investigação adicional, foi constatado que o extrato aquoso de *P. megalophyllum* revelou uma inibição considerável da oxidação intracelular. A inibição máxima alcançada atingiu 41,6% e foi obtida na concentração mais elevada testada, variando entre 5 e 20 µg mL⁻¹. Vale salientar que o potencial de inibição demonstrado pelo extrato foi inferior ao observado com a quercetina, que alcançou um nível de inibição de 71,7% para a mesma concentração (GUIMARÃES *et al.*, 2020).

Além dos estudos mencionados, vale destacar uma descoberta significativa feita por Caxito e colaboradores, que conduziram pesquisas com um extrato hidroetanólico proveniente das folhas de *X. sagittifolium*, utilizando células de camundongo. Os resultados demonstraram que o extrato foi capaz de reduzir a presença de EROs em duas concentrações distintas, 25 e 50 µg mL⁻¹; e o efeito observado foi comparável ao obtido com a quercetina, substância utilizada

como controle no experimento. Os dados da literatura apresentados anteriormente são coerentes com os resultados obtidos nesta pesquisa, destacando o potencial antioxidante do extrato de *X. sagittifolium* e de plantas pertencentes à sua família com relação à sua capacidade de reduzir EROs e conseqüentemente os danos oxidativos (CAXITO, 2015).

Para as células da cepa mutante, o resultado obtido diverge do encontrado para as células da cepa BY4741. Neste caso, o tratamento feito com o extrato de *X. sagittifolium* não foi capaz de mitigar os efeitos causados pelo agente estressor. Apesar de ter apresentado uma redução de 24,2 % do nível de oxidantes intracelular, o resultado foi estatisticamente semelhante às células que passaram apenas pelo estresse. Este resultado demonstra uma maior sensibilidade desta cepa, sendo também observado no ensaio antioxidante de danos à membrana lipídica.

Os genes *GSH1*, *SOD1* e *TRX2*, que desempenham um papel crucial na proteção antioxidante da célula, são regulados pela transcrição do gene *YAP1*. Quando a expressão desses genes é suprimida na cepa mutante, a resposta a danos oxidativos sofre uma significativa diminuição. Isso torna as células mais vulneráveis a esses danos e prejudica sua capacidade de manter a homeostase celular. Embora o extrato de *X. sagittifolium* contenha compostos conhecidos por auxiliar na atividade antioxidante do organismo, os resultados deste ensaio indicaram que o extrato não foi eficaz o suficiente na redução dos danos gerados pelo H₂O₂ na ausência de parte do sistema de defesa natural da levedura (MENEZES, 2008).

4.6 Avaliação da Viabilidade Celular Antioxidante

O ensaio de viabilidade celular foi projetado com o propósito de avaliar a capacidade de proteção fornecida pelo extrato de *X. sagittifolium* às cepas que foram anteriormente submetidas ao estresse oxidativo. Nesse experimento, as células foram plaqueadas em meio YPD e mantidas em crescimento por 48h. O resultado foi expresso através da contagem de unidades formadoras de colônias que conseguiram sobreviver e manter a viabilidade a ponto de gerar células-filhas.

Foi observado que as células da cepa BY4741 submetidas à exposição do extrato de *X. sagittifolium* mantiveram uma taxa de viabilidade comparável àquela do grupo controle, que foi considerada como 100%; apresentado a viabilidade correspondente a 88,4% ± 7,8 em relação ao controle. Em contrapartida, as células submetidas ao peróxido de hidrogênio, agente estressor, apresentaram uma taxa de viabilidade de aproximadamente 52,3% ± 2,1 (Figura 26). A análise estatística revelou que o grupo controle e células que foram expostas ao extrato apresentaram-se estatisticamente semelhantes.

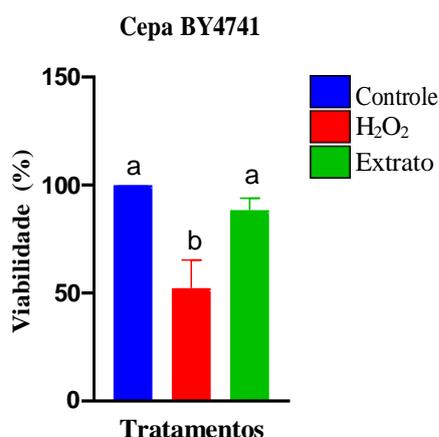


Figura 25. Gráfico de viabilidade antioxidante celular da cepa BY4741. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1h após o pré-tratamento com o extrato (0,6 mg mL⁻¹) por 2h.

Foi notado que para as células da cepa *Δyap1*, submetidas à exposição do extrato de *X. sagittifolium*, manteve-se uma taxa de viabilidade comparável à do grupo controle, que foi considerada como 100%; apresentando uma viabilidade correspondente a 81,3% ± 1,6 em relação ao controle. Em contraste, as células expostas ao peróxido de hidrogênio demonstraram uma taxa de viabilidade de aproximadamente 54,3% ± 1,4 (Figura 27). A análise estatística revelou que o grupo controle e as células expostas ao extrato mostraram-se estatisticamente similares.

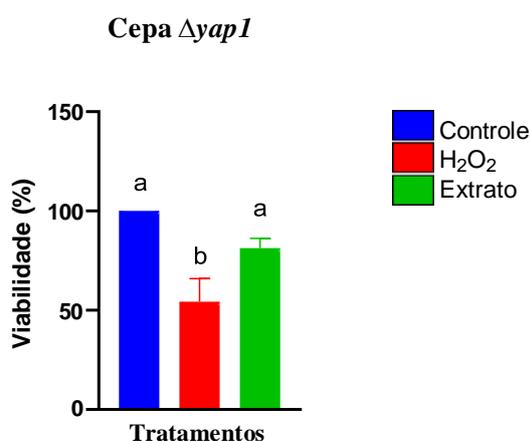


Figura 26. Gráfico de viabilidade celular antioxidante da cepa *Δyap1*. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1h após o pré-tratamento com o extrato (0,6 mg mL⁻¹) por 2h.

Os resultados obtidos nesta avaliação revelaram que o tratamento com o extrato de *X. sagittifolium*, quando precedido pela exposição ao agente estressor, demonstrou a capacidade de conferir proteção às células, evidenciando uma notável atividade antioxidante. Esta atividade pode estar associada aos compostos fenólicos presentes na constituição desta planta, uma vez que os flavonoides identificados no extrato são previamente documentados na literatura como substâncias com propriedades antioxidantes.

Um ensaio realizado por Nishanthini e colaboradores (2012) com extrato metanólico de *X. sagittifolium* demonstrou a capacidade de eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), que é um radical utilizado como reagente para ensaios antioxidantes *in vitro*, onde a concentração utilizada do extrato foi de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo capaz de eliminar 78,2% dos radicais. Vale ressaltar que, para fins comparativos, o ácido ascórbico foi empregado como referência, e notavelmente, na concentração de extrato avaliada, uma atividade antioxidante superior foi observada quando comparada ao ácido ascórbico.

Uma investigação destinada a avaliar o potencial antioxidante da planta *P. megalophyllum*, também empregou o ensaio com o DPPH para determinar os efeitos do extrato aquoso em várias concentrações distintas (10, 20, 50, 100, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados revelaram que, para a concentração mais elevada testada, o extrato exibiu uma notável inibição de 63,4%. Isso representou uma inibição superior àquela observada com o composto controle, o trolox, que foi utilizado na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e alcançou uma inibição de 49,6%. Esses achados destacam o potencial antioxidante significativo do extrato de *P. megalophyllum* (GUIMARÃES *et al.*, 2020). Em um estudo adicional que tinha como objetivo investigar as propriedades antioxidantes do extrato metanólico da planta *Landoltia punctata*, utilizou-se como modelo biológico o organismo *Caenorhabditis elegans*. O estresse oxidativo foi induzido através da exposição a um composto conhecido como juglona, numa concentração de 250 μM . A juglona é uma substância química orgânica encontrada em algumas espécies de nozes, e é conhecida por suas propriedades alelopáticas, o que significa que ela pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de outras plantas, microrganismos e organismos vivos em seu entorno. Notavelmente, quando o extrato metanólico derivado da planta *L. punctata* foi aplicado como pré-tratamento em concentração de 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se um aumento significativo na taxa de sobrevivência, aproximadamente duas vezes maior em relação ao grupo controle não tratado (TSOLMON *et al.*, 2021).

Para os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados neste trabalho, observou-se evidências da presença de atividade antioxidante no extrato em relação às duas cepas envolvidas. No caso da cepa BY4741, os resultados corroboram e reforçam as análises prévias, consolidando ainda mais a existência de atividade antioxidante no extrato. No entanto, a cepa mutante apresentou um resultado notável e divergente, marcando a primeira vez em que se constatou uma proteção celular proveniente do extrato. Um aspecto fundamental a ser considerado diante dessa situação é que, embora o extrato tenha demonstrado não ser eficaz nos ensaios de peroxidação da membrana lipídica e oxidação intracelular para a cepa mutante, os resultados deste ensaio específico revelam que a levedura foi capaz de gerar células-filhas. Isso

é uma indicação notável de que, mesmo na presença de danos à membrana e acúmulo de EROs intracelulares, o organismo manteve a viabilidade. Esses achados destacam a complexidade da resposta celular e os diversos mecanismos de proteção que podem estar envolvidos.

Os resultados obtidos neste estudo apontam que a valorização desse vegetal, por meio da expansão do nosso entendimento acerca das suas propriedades nutricionais e benéficas, desempenha um papel crucial na promoção da segurança alimentar e na diversificação das fontes de nutrientes disponíveis para a população. Esse enfoque nas propriedades da taioba não só poderia enriquecer nossas escolhas alimentares, mas também contribuir para a construção de dietas mais saudáveis e equilibradas, reforçando a importância do conhecimento científico na orientação das práticas alimentares.

5 CONCLUSÃO

O extrato de *X. sagittifolium* revelou sua não toxicidade às células de *S. cerevisiae*, conforme atestado nos ensaios de toxicidade realizados, tanto na cepa controle (BY4741) quanto na cepa mutante ($\Delta yap1$), em todas as concentrações avaliadas. Além disso, não foram observados danos diretos à cadeia respiratória, indicando a manutenção do funcionamento adequado da mitocôndria. Esses resultados apontam para a segurança do uso do extrato, sem comprometer a integridade da função mitocondrial.

Nos ensaios antioxidantes, ficou evidente que o extrato de *X. sagittifolium* exerce uma notável ação protetora na cepa controle em todas as avaliações realizadas. No entanto, essa proteção não foi observada na cepa mutante nos ensaios que mensuraram os danos à membrana lipídica e os níveis de oxidação intracelular, demonstrando ser mais sensível a ponto de o pré-tratamento com o extrato não ter proporcionado proteção a essas células. Porém, é importante destacar que apenas no ensaio de viabilidade antioxidante foi notado o efeito protetor do extrato para esta cepa, apontando a geração de células-filhas. Esses resultados destacam a complexidade das interações entre o extrato de *X. sagittifolium* e as diferentes cepas de *S. cerevisiae*, com impactos variados sob cada aspecto analisado.

O perfil químico do extrato destacou a presença de flavonoides em sua composição, e a ação antioxidante observada pode estar associada a um estímulo no sistema de defesa endógeno das células BY4741. Além disso, estudos indicam que o flavonoide isoorientina possui uma ação moduladora positiva sobre a glutatona (GSH) e a superóxido dismutase (SOD). No entanto, essa ação não pôde ser observada na cepa mutante, uma vez que a proteína de transcrição para os genes dessas enzimas foi deletada. Isso justifica a maior sensibilidade da cepa mutante aos danos oxidativos aos quais foi exposta. Esses resultados ressaltam a importância dos flavonoides na ativação do sistema de defesa celular e as diferenças nas respostas celulares entre as cepas BY4741 e $\Delta yap1$.

Adicionalmente, a atividade antioxidante desse extrato pode ser atribuída à sua ação direta, neutralizando espécies radiculares através dos flavonoides presentes em sua composição. Essa ação também contribui para a redução dos danos gerados no sistema celular pelo estresse oxidativo.

Como resultado das descobertas deste estudo, surge a perspectiva de que a taioba, uma hortaliça não convencional, pode ser introduzida na dieta das pessoas de forma segura, potencialmente trazendo vantagens significativas para a saúde humana. Aprofundando essa ideia, é importante destacar que a pesquisa científica tem voltado sua atenção para as PANC,

buscando compreender melhor suas propriedades nutricionais, medicinais e ambientais. Isso pode resultar em descobertas inovadoras e aplicações futuras dessas plantas.

Plantas Alimentícias Não Convencionais desempenham um papel versátil, contribuindo para a promoção da saúde, da segurança alimentar, da sustentabilidade agrícola e da conservação da biodiversidade. Seu uso e promoção representam uma oportunidade valiosa para um mundo mais saudável e sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, S.; RASHID, M. A.; SARKER, M. M. R. Antidiarrheal, antimicrobial and antioxidant potentials of methanol extract of *Colocasia gigantea* Hook. f. leaves: evidenced from in vivo and in vitro studies along with computer-aided approaches. *BMC Complement Medicine and Therapies*, 2021.
- ALMEIDA, M. E. F.; CORREA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. *Ciência Rural*, v. 42, n. 4, p. 751-756, 2012.
- ALTIERI, M.; NICHOLLS, C. I. Agroecología y resiliência al cambio climático: principios y consideraciones metodológicas. *Agroecología*, Lima - Peru, v.8, n.1, p. 7-20, 2013.
- ARIF, H.; SOHAIL, A.; FARHAN, M.; REHMAN, A. A.; AHMAD, A.; HADI, S. M. Flavonoids-induced redox cycling of copper ions leads to generation of reactive oxygen species: A potential role in cancer chemoprevention. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 569–578, 2018.
- ARRUDA, S. F.; SIQUEIRA, E. M. A.; SOUZA, E. M. T. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and purslane (*Portulaca oleracea*) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rats. *Annals of nutrition and metabolism*, v. 48, n. 4, p. 288-295, 2004.
- AUGUSTO, O. *Radicais Livres: bons, maus e naturais*. 1ª edição. São Paulo: Editora Oficina de Textos, 2006.
- AYALA, A; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.
- BAI, H. H.; WANG, N. N.; MI, J.; YANG, T.; FANG, D. M.; WU, L. W.; LI, G. Y. Hydroxycinnamoylmalated flavone C -glycosides from *Lemna japonica*. *Fitoterapia*, v. 124, p. 211–216, 2018.
- BAIÃO, D.; DE FREITAS, C.; GOMES, L.; DA SILVA, D.; CORREA, A. C.; PEREIRA, P. Polyphenols from root, tubercles and grains cropped in Brazil: Chemical and nutritional characterization and their effects on human health and diseases. *Nutrients*, v. 9, p. 1-29, 2017.
- BALBUENA E. V.; CALDERIUS E. I. Método para la obtención de flavonoides de hojas de *Tamarindus indica* Lin. A method for the obtention of flavonoids from the leaves of *tamarindus indica* Lin. *Multimed*, v. 14, n. 3, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENA, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BIONDO, E.; FLECK, M.; KOLCHINSKI, E.M.; SANT'ANNA, V.; POLESII, R.G. Diversidade e potencial de utilização de plantas alimentícias não convencionais no Vale do Taquari, RS. *Revista Eletrônica Científica Da UERGS*, v.4, n.1, p.61-90, 2018.

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

BUSTI, S.; COCCETTI, P.; ALBERGHINA, L.; VANONI, M. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*, v. 10, n. 6, p. 6195-6240, 2010.

CASTRO, G. R. Studies on cocoyam (*Xanthosoma* spp.) in Nicaragua, with emphasis on Dasheen mosaic virus. Tese doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences, 2006.

CAXITO, M. L.; CORREIA, R. R.; GOMES, A. C.; JUSTO, G.; COELHO, M. G.; SAKURAGUI, C. M.; KUSTER, R. M.; SABINO, K. C. In Vitro Antileukemic Activity of *Xanthosoma sagittifolium* (Taioba) Leaf Extract. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:384267. doi: 10.1155/2015/384267. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26180533; PMCID: PMC4477105.

CHOMENKO, L.; BENCKE, G.A.; BECKER, A.N.; HEIDRICH, A.L.; TRENTIN, A.M.; SANT'ANNA, D.M.; SOUZA, F.A.L.; VERDUM, R. Nosso Pampa desconhecido. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2016.

COELHO, M.A.N.; SOARES, M.L.; CALAZANS, L.S.B.; GONÇALVES, E.G.; ANDRADE, I.M. DE, PONTES, T.A.; SAKURAGUI, C.M.; TEMPONI, L.G.; Buturi, C.; Mayo, S. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB51. Acessado em on 03 março, 2022.

COLEMAN, S. T.; EPPING, E. A.; STEGGERDA, S. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. Yap1p ativa a transcrição do gene de uma forma específica de oxidante. *Biologia Molecular e Celular*, v. 19, p. 8302-8313, 1999.

COOKE, M. S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

COSTA, E. A. Nutrição e Fitoterapia: tratamento alternativo através das plantas. Petrópolis, RJ. Editora Vozes, 2012.

DELAUNAY, A.; ISNARD, A.-D.; TOLEDANO, M. B. Detecção de H₂O₂ através da oxidação do fator de transcrição Yap1. *O Jornal EMBO*, v. 19, p. 5157-5166, 2000.

DELAUNAY, A.; PFLIEGER, D.; BARRAULT, M.-B.; VINH, J.; TOLEDANO, MB. Um tiol peroxidase é um receptor de H₂O₂ e um transdutor redox na ativação do gene. *Célula*, v. 111, p. 471-481, 2002.

DELENCLOS, M.; BURGESS, J. D.; LAMPROKOSTOPOULOU, A.; OUTEIRO, T. F.; VEKRELLIS, K.; MCLEAN, P. J. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of neurochemistry*, v. 150, n. 5, p. 566–576, 2019.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, v. 109, p. 212–228, jul. 2014.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

ELEAZU, C.; SAMPSON, A.; SAIDU, S.; ELEAZU K.; EGEDIGWE-EKELEME, C. Starch digestibility, polyphenol contents and in vitro alpha amylase inhibitory properties of two varieties of cocoyam (*Colocassia esculenta* and *Xanthosoma 54 mafafa*) as affected by cooking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, p.1-7, 2018.

FACCI, J.; DINIZ, L. F.; REIS, N. F. A.; FERNANDES, C. Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. *Química Nova*, v. 43, p. 959-973, 2020.

FARID, M. M.; HUSSEIN, S.R.; IBRAHIM, L.F.; EL DESOUKY, M.A.; ELSAYED, A.M.; EL OQLAH, A.A.; SAKER, M.M. Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. v. 5, n. 11, p. 944–947, 2015.

FELTRAN, J. C. Plantas alimentícias antigas e esquecidas: Taioba, mangarito e taro. Campinas-SP. Informações Tecnológicas. Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio da Horticultura. <http://www.iac.sp.gov.br>. Acesso 23 de janeiro de 2022. 2010.

FERRERES, F.; GONÇALVES, R. F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; SILVA, A. M. S.; SILVA, J. B.; SANTOS, D.; ANDRADE, P. B. Further knowledge on the phenolic profile of *Colocasia esculenta* (L.) Shott. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 28, p. 7005-7015, 2012.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. *Pesquisa FAPESP*, São Paulo, n. 241, p. 42-47. Mar. 2016. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/03/042-047_Botanica_241.pdf> Acesso em: 30/07/2022.

FORMAN, H. J. Glutathione—From antioxidant to post-translational modifier. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 595, p. 64-67, 2016.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature reviews. Drug Discovery*, v. 20, n. 8, p. 652, 2021.

GAMBOA-GÓMEZ, C. I.; GUERRERO-ROMERO, F.; SÁNCHEZ-MERAZ, M. A.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E. Hypoglycemic and antioxidant properties of konjac (*Amorphophallus konjac*) *in vitro* and *in vivo*. *Journal of food biochemistry*, v. 44, n. 12, 2020.

GENTILE, D., FORNAI, M., PELLEGRINI, C., COLUCCI, R., BLANDIZZI, C., & ANTONIOLI, L. Dietary flavonoids as a potential intervention to improve redox balance in obesity and related co-morbidities: A review. *Nutrition Research Reviews*, v. 31, p. 239–247, 2018.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

GRANATO, E. M.; GRANATO, M. M.; GERENUTTI, M.; SILVA, M. G.; FERRAZ, H. O.; VILA, M. M. D. C. Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 94, p. 130- 135, 2013.

GRANT, C. M.; MACIVER, F. H.; DAWES, I. W. Mitochondrial function is required for

resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 410, n. 2-3, p. 219–222, 1997.

GRANT, C. M.; PERRONE, G.; DAWES, I. W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 253, n. 3, p. 893-898, 1998.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 1, p. 76–82, 2010.

GUIMARÃES, N. C.; SOUSA, L. A. F.; SOUZA, M. C. S.; ALMEIDA, P. D. O.; SANTOS, M. C., NUNEZ, C. V.; MOURA, V. M. Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. *Toxicon*, v. 184, p. 99-108, 2020.

GULSHAN, K.; ROVINSKY, S. A.; COLEMAN, S. T.; MOYE-ROWLEY, W. S. O dobramento específico de oxidante de Yap1p regula tanto a ativação transcricional quanto a localização nuclear. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 40524-40533, 2005.

GUVEN, H., ARICI, A., & SIMSEK, O. Flavonoids in our foods: A short review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, v.3, p. 96–106, 2019.

HALLIWELL, B.; R. AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; O.I. ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HERMAN, P. K. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 602–607, 2002.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, v. 11, n. 7, p. 443–54, 2013.

JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 29, n. 11, p. 1297–1301, 1997.

JANG, D.; JUNG, Y. S.; KIM, M. S.; OH, S. E.; NAM, T. G.; KIM, D.-O. Developing and validating a method for separating flavonoid isomers in common buckwheat sprouts using HPLC-PDA. *Foods*, v. 8, n. 11, p. 549, 2019.

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

JIAN, W.; TU, L.; WU, L.; XIONG, H., PANG, J.; SUN, Y. M. Physicochemical properties and cellular protection against oxidation of degraded Konjac glucomannan prepared by γ -irradiation. *Food Chemistry*, v. 231, p. 42–50, 2017.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J.

Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético. *Artmed*, p. 249-251, 2009.

KAC, G.; VELÁSQUEZ, M. G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. *Cadernos de Saúde Pública*. v.19, n.1, p.4-5, 2003.

KADA, S., BOURICHE, H., SENATOR, A., DEMIRTAS, I., OZEN, T., ÇEKEN TOPTANCI, B. Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, p. 330–337, 2017.

KARAKAYA, S.; KOCA, M.; SYTAR, O.; DUMAN, H. Determination of natural phenolic compounds of *Ferula longipedunculata* Peşmen and assessment their antioxidant and anticholinesterase potentials. *Nat. Prod. Res.*, v. 29, p. 1–3, 2019.

KELEN, M. E. B.; NOUHUYS, I. S. V.; KEHL, L. C.; BRACK, P.; SILVA, D. B. Plantas alimentícias não convencionais (PANCs): hortaliças espontâneas e nativas. ed.1, p.44, UFRGS: Porto Alegre, 2015.

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

KIM, J. I., HIDALGO-SHRESTHA, C., BONAWITZ, N. D., FRANKE, R. B., & CHAPPLE, C. Spatio-temporal control of phenylpropanoid biosynthesis by inducible complementation of a cinnamate 4-hydroxylase mutant. *Journal of Experimental Botany*, v. 72, p. 3061–3073, 2021.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. Plantas Alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, p.768, 2014.

KU, Y. S., NG, M. S., CHENG, S. S., LO, A. W. Y., XIAO, Z., SHIN, T. S. Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption. *Nutrients*, v. 12, p. 1717, 2020.

LAM, K. Y.; LING, A. P. K.; KOH, R. Y.; WONG, Y. P.; SAY, Y. H. A Review on Medicinal Properties of Orientin. *Advances in Pharmacological Sciences*, p. 1–9, 2016.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LI, S.; CHEN, G.; ZHANG, C.; WU, M.; WU, S.; LIU, Q. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness*, dez. 2014.

LIBERATO, P. S.; LIMA, D. V. T.; SILVA, G. M. B. PANCs - Plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais. *Environmental smoke*, v. 2, n. 2, p. 102-111, 2019.

LIMA, É. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LING, F.; BRADSHAW, E.; YOSHIDA, M. Prevention of mitochondrial genomic instability in yeast by the mitochondrial recombinase Mhr1. *Sci Rep* 9, 5433, 2019.

LIRA, A. Mais do que matos, elas são plantas alimentícias não convencionais (PANCs). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 20 abr. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/33580014/mais-do-que-matos-elas-sao-as-plantas-alimenticias-nao-convencionais>. Acesso em:30/07/2020.

LOVATO, F. L.; TEIXEIRA, J. B.; DALLA CORTE, C. L. Diphenyl diselenide protects against methylmercury-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* via the Yap1 transcription factor. *Chemical Research in Toxicology*, v. 30, n. 5, p. 1134-1144, 2017.

LUAN, G.; WANG, Y.; ZHOU, W.; HU, N.; LI, G.; WANG, H. Flavonoid glycosides from fenugreek seeds regulate glycolipid metabolism by improving mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes in vitro, *J. Agric. Food Chem*, v. 66, n. 12, p.3169–3178, 2018.

LUSHCHAK, V. I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, n. 4, p. 679-684, 2006.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999.

MARTÍNEZ-PASTOR MT, PUIG S. Adaptation to iron deficiency in human pathogenic fungi. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, v. 1867, 2020.

MAZIBUKO-MBEJE, S. E.; DLUDLA, P. V.; SILVESTRI, S.; ORLANDO, P.; NYAWO, T. A.; LOUW, J.; KAPPO, A. P.; MULLER. C. J. F. Isoorientin ameliorates lipid accumulation by regulating fat browning in palmitate-exposed 3T3-L1 adipocytes, *Metabolomics (Los Angel)* 100037 (2020).

MENEZES, R. A.; AMARAL, C.; BATISTA-NASCIMENTO, L.; SANTOS, C.; FERREIRA, R. B.; DEVAUX, F.; ELEUTHERIO, E. C.; RODRIGUES-POUSADA, C. Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. *Biochem J*. 2008 Sep 1;414(2):301-11.

MIN, J. W.; HU, J. J.; HE, M.; SANCHEZ, R. M.; HUANG, W. X.; LIU, Y. Q.; BSOUL, N. B.; HAN, S.; YIN, J.; LIU, W. H.; HE, X. H.; PENG, B. W. Vitexin reduces hypoxia-ischemia neonatal brain injury by the inhibition of HIF-1alpha in a rat pup model, *Neuropharmacology*, v. 99, p. 38-50, 2015.

MOO-HUCHIN, V. M.; MOO-HUCHIN, M. I.; ESTRADA-LEÓN, R. J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I. A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURIDUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem*. 2015 Jan 1;166:17-22. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.127. Epub 2014 Jun 5. PMID: 25053022.

MOYE-ROWLEY, W. S.; HARSHMAN, K. D.; PARKER, C. S. Yeast YAP1 codifica uma nova forma da família jun de proteínas ativadoras da transcrição. *Genes and Development*, v. 3, p. 283-292, 1989.

NANDI A, YAN LJ, JANA CK, DAS N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, V. 2019, 2019.

NILE, S. H.; PARK, S. W. HPTLC analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Arisaema tortuosum* tuber extract. *Pharm Biol*. 2014.

NIKI, E.; Yoshida Y.; Saito Y.; Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005.

NISHANTHINI, A.; MOHAN, V. R. Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* Schott using various in vitro assay models. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 2, n. 3, p. S1701-S1706, 2012.

OKAZAKI, S.; TACHIBANA, T.; NAGANUMA, A.; MANO, N.; KUGE, S. A formação de ligações dissulfeto de várias etapas em Yap1 é necessária para a detecção e transdução do sinal de estresse de H₂O₂. *Molecular Cell*, v. 27, p. 675-688, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, R. G.; FERRAZ, C. A. A.; NUNES, X. P.; ALMEIDA, R. G. S. Utilização de flavonoides no setor industrial farmacêutico: um estudo de prospecção tecnológica. *GEINTEC*, v. 4, n. 2, p.859-866, 2014.

PEDROSA, M.W.; MASCARENHAS, M.H.T.; CARVALHO, E.R.O.; SILVA, L.S.; SANTOS, I.C.; CARLOS, L.A. Hortaliças não convencionais: saberes e sabores. *Belo Horizonte*, p.22, 2012.

PETTIT, R. K.; WEBER, C. A.; KEAN, M. J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G. R.; TAN, R.; FRANKS, K. S.; HORTON, M. L. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2612-7. doi: 10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005. PMID: 15980327; PMCID: PMC1168683.

PINTO, N.; FERNANDES, S.; THÉ, P.; CARVALHO, V. Variabilidade da composição centesimal, vitamina c, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). *Current Agricultural Science and Technology*, v. 7, n. 3, 2001.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; IORDACHE, F.; STANCA, L.; PREDOI, G.; SERBAN, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 209, p. 112891, 2021.

PODDA, M.; ZOLLNER, T. M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M.; THIELE, J. J.; PACKER, L.; KAUFMANN, R. Activity of alpha-lipoic acid in the protection against oxidative stress in skin. *Curr Probl Dermatol*. 2001; 29:43-51. doi: 10.1159/000060652. PMID: 11225200.

POLESI, R.G.; ROLIM, R.; ZANETTI, C.; ANNA, V.S.; BIONDO, E. Agrobiodiversidade e segurança alimentar no Vale do Taquari, RS: Plantas alimentícias não convencionais e frutas nativas. *Revista Técnico-Científica*, v.19, n.2, p.118-135, 2017.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

RAUF, A., IMRAN, M., ABU-IZNEID IAHTISHAM-UL-HAQ, T., PATEL, S., PAN, X., &

- RASUL SULERIA, H. A. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 116, 2019.
- RAY, R.; SHAH, A. M. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*, v. 109, n. 3, p. 217-226, 2005.
- RODRIGUES-POUSADA, C., NEVITT, T., & MENEZES, R. The yeast stress response. *FEBS Journal*, v. 272, n. 11, p. 2639–2647, 2005.
- SAGALIK, S.; ALPINAR, K.; IMRE, S. Fatty acid composition of *Dracunculus vulgaris* Schott (Araceae) seed oil from Turkey. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 5, 231–233, 2002a.
- SAGALIK, S.; ALPINAR, K. & IMRE, S. Fatty acid composition of the seed oil of *Arum italicum* Miller. *Journal of Food Lipids*. 9, 95–103, 2002b.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SAMSONOWICZ, M., REGULSKA, E., & KALINOWSKA, M. Hydroxyflavone metal complexes-molecular structure, antioxidant activity and biological effects. *ChemicoBiological Interactions*, v. 273, p. 245–256, 2017.
- SANTÍN, O., & MONCALIÁN, G. Loading of malonyl-CoA onto tandem acyl carrier protein domains of polyunsaturated fatty acid synthases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, p. 12491–12501, 2018.
- SARIAN, M. N., AHMED, Q. U., MAT SO'AD, S. Z., ALHASSAN, A. M., MURUGESU, S., PERUMAL, V., & LATIP, J. Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: a structureactivity relationship based study. *BioMed Research International*, 2017.
- SCHNELL, N.; ENTIAN, K. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. *European journal of biochemistry*, v. 200, n. 2, p. 487-493, 1991.
- SEGANFREDO, R.; FINGER, F.L.; BARROS, R.S.; MOSQUIM, P.R. Influência do momento de colheita sobre a deterioração pós-colheita em folhas de taioba. *Horticultura Brasileira*. 19, 184–187, 2001.
- SEPÔLVEDA-NIETO, M. D. P.; BONIFACIO-ANACLETO, F.; FIGUEIREDO, C. F.; MORAES-FILHO, R. M.; ALZATE-MARIN, A. L. Accessible Morphological and Genetic Markers for Identification of Taioba and Taro, Two Forgotten Human Foods. *Horticulturae*, v. 3, n. 4, p. 49-52, 2017
- SHEN N., WANG T., GAN Q., LIU S., WANG L., JIN B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.* 2022; 383:132531 doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132531. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35413752.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry*, v. 11, n. 9, p. 1105-1112, 2004.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* (Reading, England), v. 140, n. 3, p. 569–576, 1994.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Respostas celulares complexas a espécies reativas de oxigênio. *Tendências em Biologia Celular* v. 15, p. 319-326, 2005.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. A levedura como modelo para estudar as bases moleculares da doença de Parkinson. *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*. v. 12, 2016.

TERRA, S. B.; VIERA, C. T. R. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs): levantamento em zonas urbanas de Santana do Livramento, RS. *Ambiência Guarapuava* (PR) v.15 n.1 p. 112-130, 2019.

TSOLMON, B.; FANG, Y.; YANG, T.; GUO, L.; HE, K.; LI, G. Y.; ZHAO, H. Structural identification and UPLC-ESI-QTOF-MS2 analysis of flavonoids in the aquatic plant *Landoltia punctata* and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Food Chem.* 2021 May 1;343:128392.

TOHGE, T., DE SOUZA, L. P., & FERNIE, A. R. Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 68, p. 4013–4028, 2017.

TÖNNIES, E., & TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease*. v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.

URBAN, M.; RATH, T.; RADTKE, C. Hydrogen peroxide (H₂O₂): a review of its use in surgery. *Wiener Medizinische Wochenschrift* (1946), v. 169, n. 9-10, p. 222-225, 2017.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16978905.

VAN DEN ENDE, W.; PESHEV, D.; DE GARA, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, v. 22, n. 12, p. 689-697, 2011.

VANDERWAEREN, L.; DOK, R.; VOORDECKERS, K.; NUYTS, S.; VERSTREPEN, K. J. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 1;23(19):11665. doi: 10.3390/ijms231911665. PMID: 36232965; PMCID: PMC9570374.

VIANA, M.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C.; PEREIRA, S. M. F.; OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, M. L. V. Composição fitoquímica e potencial antioxidante de hortaliças não convencionais. *Horticultura Brasileira*, v. 33, p. 504-509, 2015.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; DE LA FUENTE, M. Immune cells: free radicals and

antioxidants in sepsis. *International immunopharmacology*, v. 4, n. 3, p. 327-347, 2004.

VON OSSOWSKI, I.; HAUSNER, G.; LOEWEN, P. C. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *Journal of molecular evolution*, v. 37, n. 1, p. 71 -76, 1993.

WADA, E.; FEYISSA, T.; TESHAYE, K. Proximate, mineral and antinutrient contents of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) from Ethiopia. *International Journal of Food Science*, v. 2019, 2019.

WEN, L.; GUO, X.; LIU, R.H.; YOU, L.; ABBASI, A.M.; FU, X. Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*". *Food Chemistry*. 186, 54–62, 2015.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; MAYO, S. J. Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family Araceae. *Phytochemistry*, v. 20, n. 2, p. 217-234, 1981.

WILLIAMSON G, KAY CD, CROZIER A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. v. 17, n. 5, p.1054-1112, 2018.

WYSOCKI, R.t; TAMÁS, M. J. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS microbiology reviews*, v. 34, n. 6, p. 925-951, 2010.

WU, A.; WEMMIE, J. A.; EDGINGTON, N. P.; GOEBL, M.; GUEVARA, J. L.; MOYEROWLEY, W. S. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem*. 1993 Sep 5;268(25):18850-8. PMID: 8360174.

YAN, C., LEE, LH, DAVIS, LI. Crm1p medeia a exportação nuclear regulada de um fator de transcrição semelhante a AP-1 de levedura. *O Jornal EMBO*, v. 17, p. 7416-7429, 1998.

YE, Z. W.; ZHANG, J.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Aug;1850(8):1607-21. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.010. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25445706; PMCID: PMC4433447.

YU, J.; SONG, X.; YANG, P.; WANG, X.; WANG X. Alkaloids from *Scindapsus officinalis* (Roxb.) Schott. and their biological activities. *Fitoterapia*. 2018 Sep; 129:54-61. doi: 10.1016/j.fitote.2018.06.006. Epub 2018 Jun 9. PMID: 29894739.

YONEKURA-SAKAKIBARA, K., HIGASHI, Y., & NAKABAYASHI, R. (2019). The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 943, 2019.

ZANOTTO-FILHO, A.; MASAMSETTI, V. P.; LORANC, E.; TONAPI, S. S.; GORTHI, A.; BERNARD, X.; GONÇALVES, R. M.; MOREIRA, J. C.; CHEN, Y.; BISHOP, A. J. Alkylating Agent-Induced NRF2 Blocks Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis via Control of Glutathione Pools and Protein Thiol Homeostasis. *Mol Cancer Ther*. 2016 Dec;15(12):3000-3014. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0271. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27638861; PMCID: PMC5136348.

ZIQUBU, K., DLUDLA, P. V., JOUBERT, E., MULLER, C. J. F., LOUW, J., TIANO, L.; Mazibuko-Mbeje, S. E. Isoorientin: A dietary flavone with the potential to ameliorate diverse

metabolic complications. *Pharmacological Research*, v. 158, 2020.

ZUO, A. R., DONG, H. H., YU, Y. Y. The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. *Chinese Medicine*, v. 51, 2018.