



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ÉDEN BRUNO SOUSA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae).**

**Santarém- PA  
2019**

**ÉDEN BRUNO SOUSA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências. Área de concentração: Fisiologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana  
Co-orientador: Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes

**Santarém- PA  
2019**

**ÉDEN BRUNO SOUSA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências. Área de concentração: Fisiologia Ambiental.

Conceito:

Data de Aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana.

Orientador – Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

---

Profa. Dra. Flávia Garcez da Silva

Membro Titular da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

---

Profa. Dra. Débora Kono Taketa Moreira

Membro Titular da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

## **DEDICATÓRIA**

Primeiramente a Deus, só tenho a agradecer por tudo o que a mim ofereceu.

A minha família, pai, mãe, que sempre me auxiliaram nas dificuldades e com muito esforço me apoiaram na minha jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Prof. Dr. Maxwell Santana de Barbosa**, por ser meu orientador neste Plano de Trabalho e pela confiança a mim depositada durante todo o percurso da pós-graduação.

Agradeço ao **Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes**, por ser meu co-orientador neste Plano de Trabalho e pela confiança a mim depositada durante todo o percurso da pós-graduação.

À **Profa. Dra. Tânia Mara Pires Moraes** que sempre esteve disposta a auxiliar e colaborar neste trabalho.

Ao técnico de laboratório **Jander Cirino Lopes** e aos acadêmicos do curso de Farmácia, que me auxiliou na realização dos experimentos.

Ao **Adilson Sartoratto**, químico do **Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)** da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelo auxílio na análise da composição química do extrato da planta.

À minha família, em especial meus pais **José Ediraci da Silva** e **Gracilene Oliveira Sousa**, à minha companheira **Luciana Tais Dias Azevedo**, a minha filha **Isabella Azevedo da Silva**, a minha irmã **Simone Suana Sousa da Silva**, por toda atenção, paciência, carinho, apoio e incentivo aos meus estudos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências - PPGBio** e à **UFOPA** por toda assistência prestada.

Aos órgãos financiadores **CAPES**, **CNPq** e **FAPESPA** pelo apoio financeiro ao projeto.

“A vida é como andar de bicicleta.  
Para ter equilíbrio é necessário se manter em movimento.”

Albert Heistein.

Sousa da Silva, Éden Bruno. **Atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa do extrato etanólico de *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae)** 2019. 90p. Dissertação de Mestrado em Biociências. Programa de Pós Graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2019.

## RESUMO

Priprioica (*Cyperus articulatus* L.) é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada contra inflamações. Estudos realizados no óleo essencial dessa espécie levaram a identificação de substâncias sesquiterpênicas. Entretanto, pouco se conhece sobre a utilização dos resíduos sólidos gerados após a extração do óleo essencial dessa espécie. Este trabalho teve como objetivos investigar a composição química e avaliar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa *in vitro*, do extrato etanólico dos resíduos sólidos gerados da extração do óleo essencial de *Cyperus articulatus* L., em macrófagos peritoneais de camundongos e linhagens de células tumorais humanas. A seguinte metodologia empregada para alcançar esses objetivos foram: a análise cromatográfica, viabilidade celular, produção de óxido nítrico, prostaglandinas tipo 2, interleucina 1 beta, fator de necrose tumoral alfa e espécies reativas de oxigênio, atividade da arginase, atividade antiproliferativa. Resultados: A análise da composição química indicou a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e especialmente cetonas sesquiterpênicas como constituintes majoritários. Os resultados demonstraram que o tratamento com extrato etanólico de *Cyperus articulatus* L. diminui a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, prostaglandinas tipo 2, interleucina 1 beta, fator de necrose tumoral alfa, atividade da enzima arginase e proliferação de células cancerígenas. O extrato etanólico de *Cyperus articulatus* L. também não demonstrou citotoxicidade nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL. Os resultados indicaram que o extrato de *Cyperus articulatus* L. exerce atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória em modelos experimentais *in vitro*.

**Palavras-chave:** inflamação. planta medicinal. espécies reativas de oxigênio. óxido nítrico. Arginase. antiproliferativa. câncer.

Sousa da Silva, Édén Bruno. **Anti-inflammatory and antiproliferative activity of the ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae)** 2019. 89p. Master's Dissertation in Biosciences. Postgraduate Program in Biosciences. Federal University of West of Pará - UFOPA, Santarém, 2019.

### **ABSTRACT**

Priprioca (*Cyperus articulatus* L.) is a medicinal plant traditionally used against inflammation. Studies on the essential oil of this species have led to the identification of sesquiterpene substances. However, little is known about the use of the solid residues generated after the extraction of the essential oil of this species. The objective of this work was to investigate the chemical composition and to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative activity in vitro of the ethanolic extract of solid residues generated from the extraction of the essential oil of *Cyperus articulatus* L., in peritoneal macrophages of mice and cell lines tumor cells. The following methodology was used to achieve these objectives: chromatographic analysis, cell viability, nitric oxide production, prostaglandins type 2, interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha and reactive oxygen species, arginase activity, antiproliferative activity. Results: The chemical composition analysis indicated the presence of monoterpenes, sesquiterpenes and especially sesquiterpene ketones as major constituents. The results showed that the treatment with ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. decreases the production of reactive species of oxygen, nitric oxide, prostaglandins type 2, interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, activity of the arginase enzyme and proliferation of cancer cells. The ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. also showed no cytotoxicity at concentrations of 12.5, 25 and 50 µg / mL. The results indicated that the extract of *Cyperus articulatus* L. exerts antioxidant, antiproliferative and anti-inflammatory activity in experimental models in vitro.

**Keywords:** Inflammation. medicinal plant. oxygen-reactive species. nitric oxide. arginase. antiproliferative. cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> <i>Cyperus articulatus</i> L.....	5
<b>FIGURA 2.</b> Representação esquemática da via de ativação de macrófagos induzida por LPS e expressão de citocinas inflamatórias.....	8
<b>FIGURA 3.</b> Vias de sinalização envolvidas na produção de NO pela ativação de macrófagos.....	18
<b>FIGURA 4.</b> Esquema do metabolismo da arginina: as principais enzimas catabolizadoras de arginina envolvidas nas respostas imunes inflamatórias.....	20
<b>FIGURA 5.</b> Mecanismo inflamatório associado a EROs em macrófagos ativados por LPS.....	21
<b>FIGURA 6.</b> O efeito do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. sobre a viabilidade.....	39
<b>FIGURA 7.</b> O extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. inibe a produção de EROs.....	40
<b>FIGURA 8.</b> O efeito do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. sobre a produção de nitrito.....	41
<b>FIGURA 9.</b> Efeito do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. sobre a produção de TNF- $\alpha$ .....	42
<b>FIGURA 10.</b> Efeito do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. sobre a produção de IL-1 $\beta$ .....	43
<b>FIGURA 11.</b> Efeito do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. sobre a produção de PGE <sub>2</sub> .....	44
<b>FIGURA 12.</b> O efeito do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L. sobre a atividade da enzima arginase.....	45
<b>FIGURA 13.</b> Curva de proliferação celular em função da concentração do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AA – ácido araquidônico
- a. C – antes de Cristo
- AINEs – Anti-inflamatórios não-esteroidais
- AP-1 – proteína ativadora 1
- ATP – trifosfato de adenosina
- CEUA – comitê de ética animal
- cm – centímetro
- CO<sub>2</sub> – gás carbônico
- COX-1 – Ciclooxigenase 1
- COX-2 – Ciclooxigenase 2
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EDTA – ácido etileno diamino tetraacético
- *Cyperus articulatus* L. – Extrato Etanólico de *Cyperus articulatus* L.
- eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
- EROs – espécies reativas de oxigênio
- ePKs – proteínas quinases eucarióticas
- eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
- FDA – Food and Drug Administration
- g – grama
- G-CSF – fator de estimulação de colônias granulocíticas
- GM-CSF – fator de estimulação de colônias granulócitos-monócitos
- h – hora
- HPETE – hidroperoxieicosatetraenóicos
- HETE – hidroxieicosatetraenóicos
- IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$
- iNOS – óxido nítrico sintase induzível
- i.p. – intraperitoneal
- iNOS – óxido nítrico sintase
- IKK - I $\kappa$ B quinase
- IL-1 – interleucina 1
- IL-1 $\beta$  – interleucina 1 $\beta$
- IL-6 – interleucina 6
- iNOS – óxido nítrico sintase induzida
- JNK – c-Jun-N-terminal quinase
- kg – kilograma
- L – litro
- LOX – lipoxigenases
- LPS – lipopolisacarídeo de parede bacteriana
- LT – leucotrienos
- LX – lipoxinas
- m – metro
- m/s – metro por segundo
- MAP3Ks – proteína quinase ativada por mitógeno 3
- MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
- mg – miligrama
- ml – mililitro
- mM – micro molar

- MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium
- MPEG – museu paraense Emilio Goeldi
- NADPH – Lactaldehído reductase
- NCI/EUA – Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
- NF-kB – fator nuclear kB
- NFκB – Fator de transcrição nuclear kappa B
- NK – Linfócito natural killer
- n° – número
- nm – nanometro
- nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
- NO – óxido nítrico
- NOS2 – óxido nítrico sintase isoforma 2
- OMS – Organização mundial da saúde
- °C – graus Celsius
- p38 – via pró-inflamatória 38
- PAF – fator ativador de plaquetas
- PGE<sub>2</sub> – prostaglandinas tipo 2
- PGD<sub>2</sub> – prostaglandina D2
- PGL<sub>2</sub> – Glicolípídeo fenólico - 2
- PGs – prostaglandinas
- PKs – proteínas quinases
- PLA2 – fosfolipase A2
- RLU – unidades relativas de luz por segundo
- rpm – rotação por minuto
- s – segundo
- SFB – soro fetal bovino
- s.c. – sub cutâneo
- TGI – Inibição Total do Crescimento
- TNF-α – fator de necrose tumoral-α
- TX – troboxanos
- v.o. – via oral
- µg – micrograma
- µL – microlitro
- µm – micrometro
- µmol – micromol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Produtos Naturais.....	1
1.2 Família Cyperaceae.....	3
1.3 <i>Cyperus articulatus</i> L.....	4
1.4 Inflamação.....	7
1.4.1 Mediadores Inflamatórios.....	12
1.4.2 Citocinas.....	12
1.4.3 Eicosanóides.....	13
1.4.4 Prostaglandinas e Tromboxanos.....	13
1.4.5 Leucotrienos, autacóides e histamina.....	15
1.4.6 Óxido Nítrico.....	17
1.5 Arginase.....	18
1.6 Espécies Reativas de Oxigênio .....	20
1.7 O Câncer.....	22
1.7.1 Drogas antineoplásicas.....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos.....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Material botânico.....	30
4.2 Preparação do extrato etanólico da <i>Cyperus articulatus</i> L.....	30
4.3 Análise cromatográfica da <i>Cyperus articulatus</i> L.....	30
4.4 Animais.....	31
4.5 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos.....	31
4.6 Drogas e Soluções.....	31
4.7 Análise da viabilidade celular.....	32
4.8 Análise da capacidade antioxidante.....	32
4.8.1 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	32
4.9 Análise anti-inflamatória.....	33
4.9.1 Determinação da produção de Óxido nítrico (NO).....	33
4.9.2 Determinação dos níveis de Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), Fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF-	

A) e Prostaglandinas tipo 2 (PGE <sub>2</sub> ).....	33
4.10 Análise antiproliferativa.....	34
4.10.1 Dosagem da atividade da enzima arginase.....	34
4.10.2 Ensaio de atividade antiproliferativa .....	35
4.13 Análise estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
5.1 Análise da composição química da <i>Cyperus articulatus</i> L.....	37
5.2 Viabilidade Celular.....	38
5.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por macrófagos peritoneais estimulados por zymosan.....	39
5.4 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais estimulados por LPS+IFN- $\gamma$ .....	40
5.5 Avaliação da produção de fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos peritoneais estimulados por LPS+IFN- $\gamma$ .....	42
5.6 Avaliação da produção de Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) por macrófagos peritoneais estimulados com LPS+IFN- $\gamma$ .....	42
5.7 Avaliação da produção de prostaglandina tipo 2 (PGE <sub>2</sub> ) por macrófagos murinos estimulados com LPS+IFN- $\gamma$ .....	43
5.8 Determinação da atividade da Arginase.....	44
5.9 Determinação da atividade antiproliferativa.....	45
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>7.1 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>8 ANEXO 1</b> .....	<b>70</b>
<b>9 ANEXO 2</b> .....	<b>71</b>
<b>10 ANEXO 3</b> .....	<b>72</b>
<b>11 ANEXO 4</b> .....	<b>73</b>
<b>12 ANEXO 5</b> .....	<b>74</b>
<b>13 ANEXO 6</b> .....	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produtos Naturais

A medicina tradicional é uma prática cultural, que especialmente na região amazônica sofre grande influência das culturas indígenas. Uma das características mais expressivas desta prática etnomédica é a utilização de plantas medicinais no processo diagnóstico-terapêutico, que faz uso dos produtos naturais para profilaxia, tratamento e cura de enfermidades, além disso, é um dos métodos mais antigos utilizados pela medicina tradicional e eventualmente constituem matéria-prima para a produção de medicamentos fitoterápicos ou fitomedicamentos (DE LA CRUZ *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2014).

Sabe-se que a utilização de plantas medicinais selecionadas por meio de registros e estudos etnofarmacológicos como partida para o isolamento de novos fármacos é uma das primeiras estratégias utilizadas pela indústria farmacêutica (PIMM *et al.*, 2014). Contudo, a partir dos avanços científicos e tecnológicos, novas estratégias foram desenvolvidas para obtenção de novos fármacos e, atualmente, uma das mais avançadas é o rastreamento de alto rendimento (high-throughput screening) a partir de quimiotecas (coleção de dezenas, centenas ou milhares de moléculas diferentes sintetizadas a partir de um ou mais substratos de partida) alcançadas por química combinatória baseada no alvo molecular (planejamento racional) com auxílio de recursos informáticos e computacionais de modelagem molecular (EVERETT, 2015). Não obstante, dados atuais comprovam que os produtos naturais continuam sendo importantes fontes de novos medicamentos (KUMAR *et al.*, 2014; PIMM *et al.*, 2014).

De acordo com NEWMAN; CRAGG, (2016) que realizaram um levantamento dos novos agentes com potencial terapêuticos (fármacos, extratos vegetais, macromoléculas biológicas e vacinas) aprovados no mundo num período de 34 anos (janeiro de 1981 a dezembro de 2014). O total encontrado foi de 1.211, dos quais, 55% estão diretamente relacionados a produtos naturais (1% de extratos vegetais, 6% de fármacos naturais, 21% de fármacos derivados de produtos naturais e 27% de fármacos sintéticos análogos a produtos naturais). Ainda podemos citar que segundo esta pesquisa dentre os fármacos naturais, predominam aqueles extraídos de plantas medicinais.

Na indústria de produtos alopáticos, os produtos naturais com ênfase nas plantas medicinais, constituem excelentes modelos moleculares estruturais para a síntese de novas substâncias com atividade biológica, modificando e aprimorando as características bioquímicas e farmacológicas. Valendo a pena destacar que na grande maioria das vezes, os

constituintes químicos responsáveis pelo potencial farmacológico são desconhecidos (ALBUQUERQUE; LUCENA; CUNHA, 2004).

As plantas medicinais podem ser encontradas em todos os habitats do nosso planeta, no entanto, é nos países com clima tropical que existe maior variedade delas. As preparações a base destes produtos são bastante conhecidas popularmente em países em desenvolvimento, principalmente pelo aspecto cultural do uso e pela crença no poder medicinal das plantas, ademais não podemos esquecer a longa tradição em países desenvolvidos, como a França, Itália e Estados Unidos, onde inicialmente surgiram as propostas políticas para o registro desses medicamentos (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2013). Nessa área, o Brasil destaca-se por apresentar uma vasta biodiversidade de produtos naturais e a fonte para possível descoberta de novas drogas (PIMM *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente cerca de 80% da população de países em desenvolvimento utiliza da medicina tradicional, especialmente de plantas medicinais no tratamento de doenças (ROBINSON; ZHANG, 2011). Em comparação com as drogas sintéticas, esses produtos apresentam alguns problemas relevantes, como a qualidade da matéria prima e a ocorrência de efeitos colaterais. Como benefício, cita-se o seu amplo espectro de utilização terapêutica e de uso crônico (YAU; GOH; KOH, 2015).

Por influência cultural e econômica, os produtos naturais têm um elevado consumo no Brasil, sendo muito utilizados nos sistemas de cuidado à saúde e terapêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O emprego de moléculas oriundas de produtos naturais, principalmente de espécies vegetais tem sido alvo de vários estudos que visam principalmente a descoberta de novos compostos químicos (KUMAR *et al.*, 2014).

Atualmente muitos grupos de pesquisa estão trabalhando na busca de novos fármacos de origem vegetal, principalmente oriundos de metabólitos secundários. Os produtos naturais desempenham um papel importante na terapia. Entre 1981 e 2010, 1355 novos medicamentos foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), dos quais 4,7% eram produtos naturais ou seus derivados e 22% farmacóforos derivados de produtos naturais (DE LA CRUZ *et al.*, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2012). A procura e a obtenção de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos a partir de produtos naturais medicinais levaram à descoberta de inúmeros compostos que originaram muitos medicamentos modernos produzidos pela indústria farmacêutica (ROBINSON; ZHANG, 2011). No entanto, atualmente a maioria dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) disponíveis atualmente no mercado são totalmente

sintéticos, constatação que nos leva a questão dos problemas de efeitos indesejados e maior toxicidade (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011).

Vale citar ainda que inúmeros estudos realizados com plantas medicinais atribuem aos seus metabólitos secundários potente atividade anti-inflamatória e concomitantemente atividade gastroprotetora. Nesse caso, os produtos oriundos de plantas medicinais se destacam como uma excelente alternativa de uso, visto que, uma das principais restrições quanto ao uso desta classe de fármacos é justamente o aparecimento de lesões gastroduodenais (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011).

## 1.2 Família Cyperaceae

A família Cyperaceae foi descrita por Davidse *et al.*(1995), como compostas por ervas anuais ou perenes, glabras ou pilosas, que possuem talos eretos e ascendentes, frequentemente trígonos, usualmente sólidos. Flores geralmente 3-seriadas; lâminas lineares ou filiformes e elípticas, às vezes reduzidas ou ausentes; vagens geralmente cerradas, não auriculares, ocasionalmente com uma contralígula, larga e oposta à da lâmina. Flores pequenas, bissexuadas ou unissexuadas localizadas nas laterais ou terminais e laterais, pelo menos as laterais geralmente com uma escama floral (conhecida como gluma) subjacente, disposta dística ou espiraladamente, ou seja, ráquila de uma inflorescência parcial (espiga), às vezes com escamas florais (conhecidas como bractéolas) subjacentes e dispostas em espigas, às vezes diversamente reduzidas. As espécies são monóicas ou raramente dióicas.

Se trata de uma família cosmopolita com cerca de 104 gêneros e 5000 espécies, das quais 845 ocorrem nos neotrópicos, geralmente em solos úmidos. Na reserva florestal Adolpho Ducke, área de 10.000 ha perto da cidade de Manaus, muito confundida com a família Poaceae, as espécies de Cyperaceae podem ser conhecidas pelas folhas com bainha fechada e lígula ausente, além do caule triangular. Este último caráter pode confundir as espécies de Cyperaceae com *Thurnia sphaerocephala*, única espécie de Turniaceae presente na reserva, cujo porte é muito maior, além de ocorrer em igarapés. Espécies de Cyperaceae podem ser encontradas em áreas de solo encharcado, porém a base da planta nunca fica submersa (CASTELLANI *et al.*, 2011).

Segundo Bum *et al.* (2003) para a identificação precisa de uma ciperácea é necessário observar certos detalhes morfológicos como: rizomas, caules, folhas, folhas involucrais, inflorescência, espiguetas, flores, frutos e sementes. De acordo com este autor, muitas espécies de Cyperaceae apresentam rizomas, que podem ser seriados, cespitosos ou

estoloníferos, os quais podem terminar em tubérculos ou, mais raramente, formar rosários de tubérculos.

A morfologia da espécie é muito similar à das espécies da família Poaceae, com redução de peças florais favorecendo a polinização pelo vento. *Hypolytrum scharoderianum* tem flores perfumadas, provavelmente polinizadas por insetos. A dispersão pode ser epi ou endozoocórica ou, ainda, hidrocórica (CASTELLANI *et al.*, 2011). O gênero *Cyperus* possui aproximadamente 550 espécies cosmopolitas, distribuídas nos trópicos e subtropicais (DAVIDSE *et al.*, 1995). Este mesmo autor registra ocorrência da espécie *Cyperus articulatus* em escavações das bordas de lagos, pântanos dulceacuículos ou ligeiramente salubres e campos abertos e úmidos.

Segundo Davidse *et al.* (1995) a *Cyperus articulatus* L. conhecida como pripioca é nativa do continente Americano, ocorrendo no sudeste dos Estados Unidos, na América Central, Índias Ocidentais, Caribe e na América do Sul. No Brasil é comum nas faixas litorâneas dos estados do Norte, chegando a certas regiões do Nordeste. Mas ocorre na Ásia, África, Austrália e Oriente Médio. Encontrada em locais úmidos ou alagados, em solos arenosos a médios. Suporta condições de elevada salinidade, como a beira-mar. Aceita iluminação difusa.

No estado do Pará foram encontradas as espécies *Cyperus articulatus* L., *Cyperus articulatus* L. var. *nodosus* e *Cyperus prolixus* ocorrendo naturalmente em alguns municípios como: São Caetano de Odivelas, Vigia, Belém, Santarém Novo, São João de Pirabas, Tracuateua, Capanema, Peixe-Boi, Santo Antônio do Tauá, Acará e Bragança, ocorrendo em locais úmidos e solos arenosos (CASTELLANI *et al.*, 2011).

### 1.3 *Cyperus articulatus* L.

O nome Pripioca vem do tupi e tem sua origem em uma lenda indígena. Segundo a lenda, Piripiri era um guerreiro que exalava um cheiro misterioso e irresistível para as mulheres. Porém, ele sempre se esvaia em fumaça quando elas tentavam se aproximar. Aconselhadas pelo pajé, para tentar segui-lo, elas amarraram os pés do guerreiro com os próprios cabelos. Mas foi inútil; de manhã ele havia desaparecido de vez. No local onde ele dormia, surgiu uma planta cujas raízes soltavam o mesmo aroma de Piripiri. Pripioca quer dizer “Casa de Piripiri” (CASTELLANI *et al.*, 2011).

*Cyperus articulatus* L. é uma espécie de capim alto, em cuja extremidade brotam flores miúdas, quase insignificantes (**FIGURA 1**). Os talos de capim alto escondem sob a

terra raízes de fragrância incomum na forma de pequenos tubérculos que, quando cortados, exalam um perfume fresco, amadeirado e picante, que surpreende o olfato. Graças a esta qualidade, a espécie é tradicionalmente usada em banhos de cheiro e na fabricação de colônias artesanais no norte do país, principalmente no Pará. No Brasil, sobretudo no estado do Pará são conhecidas como priprioca três espécies pertencentes à família Cyperaceae: priprioca *Cyperus articulatus* L. var. *nodosus*, a priprioquinha *Cyperus articulatus* L. var. *articulatus* e o Priprioção *Cyperus Prolixus* H.B.K. (CASTELLANI *et al.*, 2011; ZOGHBI *et al.*, 2006).

**FIGURA 1.** Imagem de espécime de *Cyperus articulatus* L., após a coleta, demonstrando suas características anatômicas, formato dos rizomas e inflorescências.



Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/906001/priprioca>.

A planta foi preservada pelas populações caboclas que, durante os séculos de colonização portuguesa, foram substituindo as tribos que ocupavam a bacia amazônica. Plantada nos quintais das residências, ralada ou raspada com a língua seca do pirarucu, a Priprioca era usada como remédio e ingrediente de banhos atrativos (ZOGHBI *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, a priprioca é plantada em áreas de queimada de mata secundária, onde há cinzas, e em consórcio com a mandioca. A planta possui um sistema radicular fibroso e a sua propagação se dá por meio de rizomas delgados, apesar de se reproduzir por sementes, prática esta pouco recomendada. Os tubérculos são brancos e suculentos quando jovens, variando de marrom a preto além de tornarem-se fibrosos com a idade; os colmos são eretos, lisos contínuos e triangulares na seção transversal, apresentando normalmente 30 a 43 cm de

altura. Ocasionalmente alcançam 70 cm de altura e muitos são encontrados até com 1 m de altura em solos férteis e úmidos (BUM *et al.*, 2003).

O interesse pela planta *Cyperus articulatus* L. partiu do embasamento de estudos etnobotânicos que apontavam o uso desta espécie Amazônica como anti-inflamatório, sedativo e anticonvulsivo (BUM *et al.*, 2003; CASTELLANI *et al.*, 2011; ZOGHBI *et al.*, 2006). Tradicionalmente é utilizada como contraceptivo, analgésico, anti-inflamatório e no tratamento de diarreias e ainda possui efeito sedativo e anticonvulsivo (BUM *et al.*, 2003; FORERO-DORIA *et al.*, 2014; RAKOTONIRINA *et al.*, 2001).

É uma planta aromática e medicinal que ocorre naturalmente na Amazônia e apresenta fácil propagação vegetativa, sendo também utilizada como contraceptivo, analgésico e no tratamento de diarreias (BUM *et al.*, 2003; RAKOTONIRINA *et al.*, 2001). Considerada uma espécie de vasta composição química, seu óleo essencial é constituído principalmente por sesquiterpenos pertencentes às classes do cipereno, cariofilano, eudesmano, patchoulano e rotundano (POTIGUARA, 2008). Os terpenoides são compostos lipofílicos de baixo peso molecular. (ZOGHBI *et al.*, 2006). Vários estudos relatam as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais como antimicrobiano, hepatoprotetor, anticonvulsivante, antitumoral, anti-inflamatório e ansiolítica (NÓBREGA DE ALMEIDA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012; KREUGER *et al.*, 2012; LAWAL *et al.*, 2016). No entanto, não há na literatura relatos de estudos sobre extratos oriundos dos resíduos sólidos da extração do óleo essencial.

Tanto a citotoxicidade como as propriedades anti-inflamatórias dos sesquiterpenos são mediadas pelas funções carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturadas, tais como ciclopentanonas e a porção  $\alpha$ -metileno- $\alpha$ -lactona (GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012). O primeiro parece ser um pouco mais citotóxico, ao passo que o último é o que se acredita ser importante grupo que media a atividade anti-inflamatória de sesquiterpenos (PINHEIRO; COSTA; ALVES; GALTER; PINHEIRO; PEREIRA; OLIVEIRA & FONTES, 2015). Plantas medicinais ricas em sesquiterpenos tornaram-se uma fonte importante de compostos para diversos estudos (SOUSA; DUARTE; ALCÂNTARA; SILVA; VIEIRA-FILHO; SILVA; OLIVEIRA & TAKAHASHI, 2012).

Levando em conta a importância do reconhecimento botânico e químico da planta, a análise da composição química da espécie em estudo é uma etapa crucial da pesquisa científica. Os extratos oriundos de plantas medicinais apresentam grande complexidade química. A garantia da qualidade e procedência do extrato se inicia pela definição e detecção de um biomarcador na amostra vegetal, se trata de um produto químico característico da

planta e que pode ajudar a determinar a identidade, padronização, estabilidade do produto e processamento do material botânico (HEBA *et al.*, 2014; MEENA *et al.*, 2010; YAU; GOH; KOH, 2015).

Os relatos encontrados na literatura acerca da análise da composição química da espécie se restringem ao seu óleo essencial, onde também são encontrados monoterpênicos tais o como  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, o monoterpene aldeídico  $\alpha$ -mirtenal, além dos sesquiterpênicos  $\alpha$ -copaeno, cipereno,  $\beta$ -selineno e (Z)-calameno,  $\alpha$ -calacoreno, a cetona sequiterpênica  $\alpha$ -ciperona, limoneno, cineol, miternal, espatulenol e óxido-cariofileno (HEBA *et al.*, 2014; LAWAL *et al.*, 2016; ZOGHBI *et al.*, 2006).

#### 1.4 Inflamação

A inflamação é uma resposta imune de grande complexidade relacionada ao dano tecidual e/ou celular causada pelos mais variados estímulos químicos, físicos, imunológicos ou microbianos (GOLAN *et al.*, 2009). Este processo foi caracterizado clinicamente em 30 a.C pelo médico romano Aulus Cornélius Celsus por quatro sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Posteriormente, Cláudio Galeno acrescentou a perda da função do membro afetado. A inflamação tem como objetivo levar a resolução do dano tecidual, contribuindo assim para o processo de homeostasia. No entanto, quando esta resposta não é modulada, ocorrendo exacerbação do processo, o quadro pode se tornar crônico, culminando com a perda de função do tecido e diminuição da qualidade de vida do organismo (SACRAMENTO *et al.*, 2017).

As primeiras barreiras imunológicas atuantes no organismo estão relacionadas as reações inatas, elas ocorrem localmente, no interior dos tecidos e podem se dividir em eventos vasculares e celulares. Os fenômenos vasculares caracterizam-se por alterações no calibre vascular, ou seja, diâmetro do vaso, que provocam um aumento no fluxo sanguíneo (calor) e por alterações na permeabilidade vascular, conduzindo ao extravasamento de exsudato para o interstício, com conseqüente formação de edema (RAMÍREZ-ATEHORTÚA *et al.*, 2018).

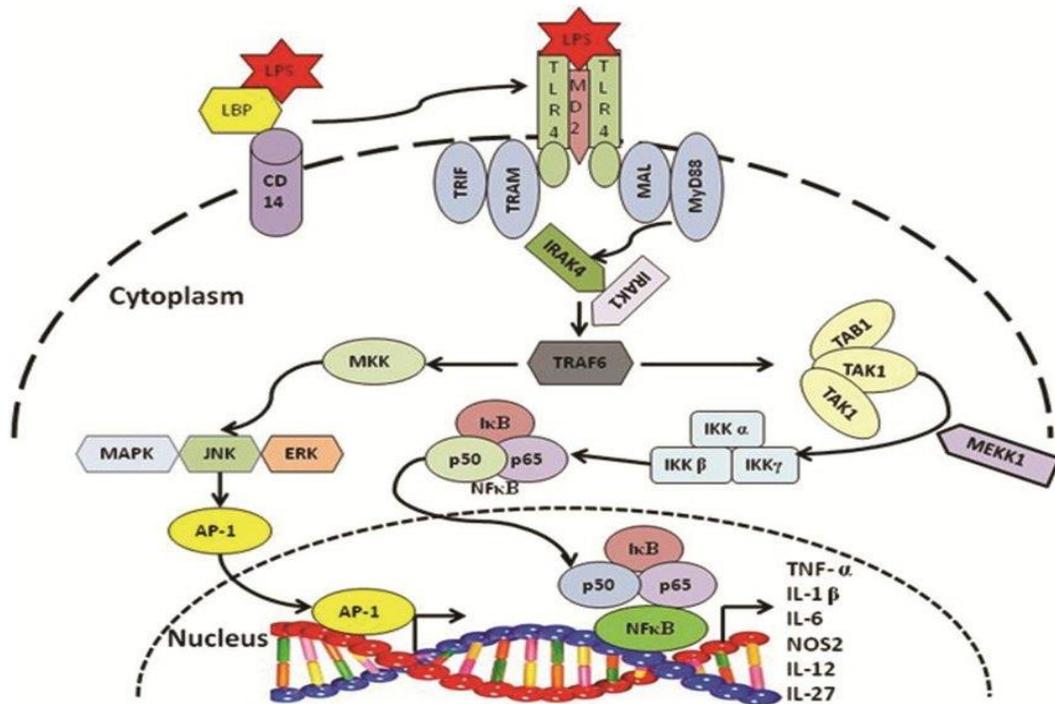
A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com exsudação são provocados por mediadores, produzidos a partir do plasma e das células. Tais mediadores, agindo isoladamente, em conjunto, ou em sequência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução. Já nos eventos celulares, as células envolvidas estão normalmente presentes nos tecidos, como no caso das células endoteliais e os macrófagos, ou têm acesso ao local a partir da circulação, como por exemplo, plaquetas e leucócitos (GHOLIPOUR *et al.*,

2018).

A ação inflamatória é fundamentalmente um mecanismo de proteção, tendo a função de proteger o organismo de agentes que causam lesão de células e tecidos (ex.: microrganismos e toxinas) e remover os que foram danificados em consequência de uma injúria. No entanto, os processos de inflamação e reparo podem ser potencialmente danosos ao organismo, quando sua intensidade ou duração ultrapassam o suficiente e necessário para conter o agente agressor (CHEN *et al.*, 2018). Por esta razão muitas drogas com a capacidade de interferir no processo inflamatório, atenuando sua intensidade ou reduzindo seu tempo de duração, são objetos de interesse e pesquisa (KO *et al.*, 2018).

O processo inflamatório envolve uma complexa cascata de eventos a nível bioquímico e celular, que inclui extravasamento de plasma, ativação de enzimas constitutivas e induzíveis, migração de células do sistema imunológico e outras, sensibilização e ativação de receptores, lise e o reparo tecidual (GHOLIPOUR *et al.*, 2018; KO *et al.*, 2018; RAMÍREZ-ATEHORTÚA *et al.*, 2018). Geralmente as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local, iniciadas e reguladas por mediadores inflamatórios, como as aminas (histamina e serotonina de mastócitos), as proteases plasmáticas [sistema complemento, cininas (bradicinina e calidina) e proteínas fibrinolíticas e de coagulação], mediadores lipídicos [prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF)], citocinas (de linfócitos ativados e macrófagos – interleucinas e fator de necrose tumoral), óxido nítrico (NO), entre outros (HSU *et al.*, 2017; KHOYRATTY; UDALOVA, 2018; NAKAMURA; SHIMIZU, 2011; SINGH *et al.*, 2014). A inflamação conduz à libertação de uma complexa variedade de mediadores inflamatórios como o NO, as espécies reativas de oxigênio (EROs), as citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides) e a histamina (autacóides), dentre outros (**FIGURA 2**) (SACRAMENTO *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2010).

As células que atuam primariamente durante um processo inflamatório são os macrófagos e células dendríticas localizados no local da lesão, as quais fagocitam os microrganismos e restos celulares (GHOLIPOUR *et al.*, 2018). Adicionalmente, trabalhos anteriores demonstraram que os macrófagos são células secretoras potentes que liberam uma variedade de mediadores químicos (KHOYRATTY; UDALOVA, 2018), incluindo as substâncias pró-inflamatórias, citotóxicos, fatores de crescimento, lipídios bioativos, enzimas hidrolíticas, NO e EROs (CHEN *et al.*, 2018).



**FIGURA 2.** Representação esquemática da via de ativação de macrófagos induzida por LPS e expressão de citocinas inflamatórias. [LPS: lipopolissacarídeo, LBP: proteína de ligação a LPS, TLR: Receptores Toll-like, CD-14: Cluster of differentiation-14, TRIF: TIR-domain-contendo molécula adaptadora indutora de interferon- $\beta$ , relacionada ao TRAM: TRIF, MyD88: Resposta primária de diferenciação mielóide proteína 88, MAL: Adaptador MyD-88 como, IRAK: quinase associada ao receptor da interleucina-1, TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , TRAF: Fator associado ao receptor de TNF, TAK 1: Quinase 1 ativada pelo fator de crescimento de transformação beta, NF $\kappa$ B: Fator nuclear  $\kappa$ B, I $\kappa$ B: Inibidor de  $\kappa$ B, IKK: I $\kappa$ B cinase, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, MKK: MAPK cinase, MEKK: Mitogênio / sinal extracelular quinase quinase regulada, ERK: quinases reguladas por sinais extracelulares, AP-1: Proteína ativadora-1.

Fonte: PARADKAR *et al.*, 2017.

A inflamação aguda procura reparar tecidos lesados e eliminar elementos indesejados. O resultado ideal da inflamação aguda é a resolução completa e oportuna, com retorno à homeostase. Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação do agente infeccioso seguida pela fase de resolução e reparo, a qual é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados. Se a inflamação aguda falha em eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e no caso de infecção por linfócitos T. Se o efeito combinado

dessas células ainda continua insuficiente, um estado inflamatório crônico se segue, envolvendo a formação de granulomas (DEWNJEE; DUA; SAHU, 2013; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011; TREHANPATI; VYAS, 2017).

As mudanças fisiológicas que acompanham a inflamação aguda local incluem algumas características principais e envolve uma sequência de eventos, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, prejuízo tecidual por atividade de proteases e EROs, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (HSU *et al.*, 2017). Podem ainda estimular a síntese de NO pelo endotélio vascular e células do sistema imune como os macrófagos, causando vasodilatação e extravasamento de plasma para os tecidos (edema), desgranulação de mastócitos, aumento da liberação de enzimas lisossômicas e de prostaglandinas (KHOYRATTY; UDALOVA, 2018; SACRAMENTO *et al.*, 2017).

Uma das vias pró-inflamatórias muito importantes é mediada a ativação de proteínas de resposta intracelular, ocorre quando o sinal extracelular promove a ativação das vias de sinalização intracelular ERK/MAPK-1 (proteína quinase ativada por mitógeno 1) e JNK/MAPK- 8 (c-Jun-N-terminal quinase). Este processo leva a síntese de mediadores pró inflamatórios, como interleucina tipo 1 (IL-1), Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas tipo 2 (PGE<sub>2</sub>) e NO (ABELLA *et al.*, 2017; SACRAMENTO *et al.*, 2017).

Um dos eventos que ocorrem seguindo a lesão em nervo periférico é o aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular, levando a subsequente ativação das vias de p38, MAPK e ERK na microglia. A ativação destas vias promove a ativação de vários fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1, interleucina tipo 6 (IL-6) e PGE<sub>2</sub>, e o fator neurotrófico derivado do cérebro. Uma possibilidade pela qual as citocinas pró-inflamatórias liberadas contribuem para a dor é por atuar em seus receptores que são expressos em neurônios em regiões responsivas a dor na medula espinhal (TEGELER *et al.*, 2016; TRENHAPI; VYAS 2017).

As proteínas quinases (PKs) constituem uma família de enzimas que, através da fosforilação de proteínas substrato, regulam a atividade, localização e a função das mesmas (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011). A fosforilação dessas proteínas é responsável pela regulação celular, assim como a transdução de sinais na célula. Devido as suas funções de extrema importância, as PKs têm sido alvos de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos que modulem suas funções (TOLOZA *et al.*, 2018).

As proteínas quinases eucarióticas (ePKs) podem ser divididas em duas subfamílias de acordo com os resíduos que fosforilam: as serina/reonina quinases e as tirosina quinases (ABELLA *et al.*, 2017; TEGELER *et al.*, 2016). A fosforilação é realizada através da remoção de um grupo fosfato de uma molécula de ATP (adenosina trifosfato) e posterior ligação covalente deste grupo a um dos três aminoácidos, que possuem um grupo hidroxila livre. Este processo, o qual pode ser revertido pela desfosforilação catalisada por fosfatases, resulta em mudanças conformacionais na proteína substrato podendo ativar ou inibir sua função. Em humanos, a desregulação das tirosina-quinases está relacionada ao desenvolvimento de várias doenças incluindo câncer e diabetes, além de uma grande variedade de doenças congênitas (DEWNJEE; DUA; SAHU, 2013; TOLOZA *et al.*, 2018).

As MAPKs (proteínas quinase ativadas por mitógenos) são integrantes da subfamília serina e reonina quinases e são ativadas por uma grande variedade de tensões ambientais, tais como choque osmótico, raios ultra-violeta, luz, choque térmico, desgaste mecânico, lipopolissacarídeos e citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A p38 $\alpha$  MAPK, uma isoforma das MAPKs, tem sido relacionada com a inflamação e apoptose. A isoforma p38 $\alpha$  é a melhor caracterizada e talvez a mais fisiologicamente relevante quinase envolvida em respostas inflamatórias. Além disso, a p38 $\alpha$  MAPK fosforila diversos fatores de transcrição, alguns deles responsáveis pela expressão transcricional de genes que codificam citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (ABELLA *et al.*, 2017; TEGELER *et al.*, 2016). Estudos mostraram que os inibidores da p38 $\alpha$  MAPK podem diminuir a produção de citocinas e outras substâncias relacionadas com a inflamação como a Ciclooxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase (iNOS) em diferentes estudos de inflamação realizados *in vivo* e *in vitro*. Vários p38 $\alpha$  MAPK inibidores têm sido mostrados para bloquear a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  e outras citocinas (TRENHAPI; VYAS 2017; TOLOZA *et al.*, 2018). Portanto, a inibição de p38 $\alpha$  MAPK é considerada uma nova alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias, e estudos devem ser realizados para avaliar possíveis inibidores eficientes desta proteína (SINGH *et al.*, 2014; TOLOZA *et al.*, 2018).

O conhecimento sobre mecanismos do processo inflamatório nos dá a possibilidade de avaliar a evolução do processo inflamatório, bem como, para reconhecer o mecanismo de ação dos fármacos com efeito anti-inflamatório (KHOYRATTY; UDALOVA, 2018). Atualmente existem muitas doenças que envolvem a inflamação crônica, estas representam uma grande carga de mortalidade da população do Brasil (DEWNJEE; DUA; SAHU, 2013; DUNCAN *et al.*, 2012). A resposta inflamatória é um componente fisiopatológico que

contribuiu para a instauração de muitas doenças e distúrbios metabólicos como a aterosclerose, artrite reumatoide e o câncer (HEADLAND; NORLING, 2015; TOLOZA *et al.*, 2018).

A padronização do estímulo para ativação de macrófagos é um passo crucial da investigação da atividade anti-inflamatória *in vitro*. De acordo com a literatura, o estímulo mais eficaz para ativar macrófagos peritoneais *in vitro* é o lipopolissacarídeo de parede bacteriana (LPS), cuja ativação é potencializada pela ação sinérgica do interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (ALLEY; MURPHY; RUSSELL, 1995). Os resultados obtidos por Alley; Murphy e Russel (1995) demonstraram que IFN- $\gamma$  sozinho não apresenta capacidade de ativar macrófagos quiescentes, visto que, a produção de nitrito frente a estimulação com IFN- $\gamma$  não é alterada. Este dado está de acordo com a literatura, a qual mostra que macrófagos quiescentes não expressam receptores para IFN- $\gamma$ , passando a expressá-los somente após sua ativação prévia (GHOLIPOUR *et al.*, 2018).

#### **1.4.1 Mediadores inflamatórios**

A inflamação é um processo mediado pela liberação de muitas substâncias conhecidas como mediadores inflamatórios, dentre os quais se destacam o NO, as citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides), a histamina (autacóides), dentre outros (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014; HEADLAND; NORLING, 2015).

#### **1.4.2 Citocinas**

No decorrer das reações imunes e inflamatórias, as citocinas são liberadas de forma a regular a ação das células destes sistemas. Dentre as citocinas pró- inflamatórias destacam-se o TNF- $\alpha$  e IL-1, liberadas por macrófagos ativados e vários outros tipos celulares imunológicas. Estas citocinas favorecem a aderência leucocitária ao endotélio, aumentam a síntese de prostaciclina e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias, dentre outras ações. Já as citocinas secundárias, como as quimiocinas, atraem e ativam as células inflamatórias móveis (KHOYRATTY; UDALOVA, 2018; PAN *et al.*, 1996).

As citocinas são proteínas que atuam parácrinamente para regular as atividades dos leucócitos. Como exemplo, temos as interleucinas, o TNF- $\alpha$ , fatores de crescimento hematopoiéticos, o fator de estimulação de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF) e o fator de estimulação de colônias granulocíticas (G-CSF). As quimiocinas constituem um subgrupo específico que promovem a circulação e o recrutamento das células inflamatórias para os locais de inflamação. Suas ações de inibição ou estimulação têm os potenciais de

modular as respostas imunes e inflamatórias (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011; CHEN *et al.*, 2018).

O TNF- $\alpha$  regula a função imunitária, a diferenciação e a proliferação celular, a apoptose, o metabolismo de energia e a produção de outras citocinas inflamatórias como a IL-1 e a IL-6, onde medeia e/ou amplifica seus efeitos nos órgãos periféricos. Durante o processo inflamatório agudo, a superprodução de TNF- $\alpha$  é fundamental para a indução de genes inflamatórios e ao recrutamento e ativação de células do sistema imunológico do hospedeiro (KHOYRATTY; UDALOVA, 2018; PAN *et al.*, 1996).

### 1.4.3 Eicosanóides

A síntese destes inicia-se com a liberação de ácidos graxos da bicamada lipídica, esta liberação ocorre através de uma hidrólise catalisada pela enzima fosfolipase, isto ocorre, por exemplo, em resposta a inflamação. Os Eicosanóides são formados a partir de fosfolipídios e estão envolvidos, como mediadores e moduladores importantes no processo inflamatório, no controle de processos fisiológicos. Sua principal fonte é o ácido araquidônico que encontra-se esterificado nos fosfolipídios. Seus principais membros são as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2017). A relevância pró-inflamatória do ácido araquidônico ainda é citada por outros trabalho, que esclarecem a biossíntese de EROs que tem como substrato o ácido araquidônico, a mesma biomolécula que origina os eicosanoides (FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011; HSU *et al.*, 2017).

Quando a membrana celular é lesionada, citocinas pró-inflamatórias - como TNF-  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dentre outros - ativam a enzima Fosfolipase A<sub>2</sub> que vai degradar os fosfolipídios produzindo o ácido araquidônico. Este ao ser metabolizado pela lipoxigenase formará os leucotrienos, e pela ação das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) sintetizará as prostaglandinas, prostacilinas e os tromboxanos (ABELLA *et al.*, 2017; DVASH *et al.*, 2015; NAKAMURA; SHIMIZU, 2011).

Os eicosanóides não são transportados pela circulação, geralmente eles exercem seu efeito no local onde são sintetizados e possuem uma curta meia-vida, regulam processos fisiológicos importantes principalmente no aspecto da resposta inflamatória como a contração muscular, regulam a pressão arterial, dilatação dos brônquios, manifestação da dor e febre, coagulação sanguínea dentre outras respostas imediatas ao dano tecidual local. A via de síntese de eicosanóides é bidirecional: a mesma via sintetiza: prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanas; outra via é exclusiva na síntese de leucotrienos (BANDEIRA-

MELO *et al.*, 2017; DVASH *et al.*, 2015; NAKAMURA; SHIMIZU, 2011).

#### 1.4.4 Prostaglandinas e Tromboxanos

As ciclooxigenases (COXs) são um grupo de enzimas muito importantes na fisiologia do organismo humano, sendo que elas contêm duas formas principais, a primeira é a COX-1 bastante encontrada na maioria dos tecidos, vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins e por isso é dita constitutiva. Seus produtos estão envolvidos na proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal (ABELLA *et al.*, 2017; DVASH *et al.*, 2015; RAMANAN *et al.*, 2017).

Já a COX-2 está presentes nos locais de inflamação, sendo por isso o nome de enzima indutiva, e é expressa por células inflamatórias ativadas, como macrófagos e monócitos. Também pode ser encontrada em outros tecidos e órgãos. É induzida pelas citocinas - IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$  e por outros mediadores como os fatores de crescimento e as endotoxinas. Há estudos onde descrevem a descoberta da COX-3 que pode ser um produto do mesmo gene que codifica a COX-1, entretanto a prova de sua existência permanece intangível (HEADLAND; NORLING, 2015; SEVINSKY; STEWART; HARIRFOROOSH, 2017).

As etapas adjacentes da ação das ciclooxigenases diferem de acordo com as células. Nas plaquetas haverá a síntese de tromboxano A<sub>2</sub>, no endotélio vascular à glicolípido fenólico - 2 (PGI<sub>2</sub>), nos macrófagos à formação principalmente de PGE<sub>2</sub> e nos mastócitos de prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>). (VARAS-LORNENZO *et al.*, 2013). As prostaglandinas desempenham papéis fisiopatológicos como o eritema e aumento do fluxo sanguíneo local, hiperalgesia, elevação da temperatura corpórea no hipotálamo através de citocinas (RAMANAN *et al.*, 2017).

Existem diversas enzimas celulares que inativam as prostaglandinas logo após estas serem captadas por transportadores, sendo que foram inativas pela passagem no pulmão e pelo metabolismo de primeira passagem. Os receptores para prostanóides são típicos acoplados à proteína G (GHOLIPOUR *et al.*, 2018; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011; RAMÍREZ-ATEHORTÚA *et al.*, 2018).

O prostanóide de predominância no processo inflamatório é a PGE<sub>2</sub>, a qual tem importância por sua ação pirogênica e no aumento da sensibilidade à dor, e a PGI<sub>2</sub> que é raramente encontrada. Nas regiões de inflamação aguda, estas prostaglandina são produzidas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais enquanto que os mastócitos liberam PGD<sub>2</sub> e o tromboxano A<sub>2</sub>. Já na inflamação crônica os monócitos/macrófagos liberam também a PGD<sub>2</sub> e

o tromboxano A<sub>2</sub>. Estes agem estimulando algumas respostas e diminuindo outras (SEVINSKY; STEWART; HARIRFOROOSH, 2017).

A PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> agem em sinergismo com a histamina e a bradicinina para alcançar o efeito poderoso de vasodilatação intrínseca, contribuindo para a formação do eritema e aumento do fluxo sanguíneo nas áreas inflamadas. Essas prostaglandinas não causam a dor, mas potencializam o efeito da histamina e da bradicinina ao sensibilizarem as fibras C aferentes (RAMANAN *et al.*, 2017).

As plaquetas possuem a enzima tromboxano sintase que sintetiza o seu principal produto eicosanóide, o Tromboxano. Este é um potente vasoconstritor e promotor da aderência e agregação plaquetária. Como o endotélio não tem a enzima tromboxano sintase, ele expressa a prostaciclina sintase e produz a PGI<sub>2</sub>, que é o principal eicosanóide do endotélio vascular. A PGI<sub>2</sub> atua como vasodilatador, venodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Resumindo, a PGI<sub>2</sub> é um antagonista fisiológico do tromboxano, porém este último é mais potente que o primeiro. Qualquer desequilíbrio entre as duas moléculas pode acarretar em hipertensão, isquemia, trombose, coagulopatia, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (SEVINSKY; STEWART; HARIRFOROOSH, 2017).

A ação dos fármacos AINEs está baseado na inibição das enzimas ciclooxigenases, com consequente diminuição da produção de prostaglandinas, combatendo, assim, a inflamação, a dor e a febre. Existem substâncias que são seletivas para a COX-1 ou para a COX-2. A ação sobre a enzima constitutiva acarretará na inibição da formação de tromboxanos e também no aumento do risco de sangramento e de danos no trato gastrointestinal (GHOLIPOUR *et al.*, 2018).

#### **1.4.5 Leucotrienos, autacóides e histamina**

Os mediadores lipídicos, como os eicosanoides são derivados de fosfolipídeos, presentes na membrana celular. Após a ativação por íons Ca<sub>+2</sub> intracelular, a fosfolipase A2 (PLA2) citosólica gera ácido araquidônico (AA) e ácido lisofosfatídico, a partir da fosfatidilcolina. O AA é metabolizado em eicosanoides, quer por ação das ciclo-oxigenases (COX1 e COX2), geram as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX), ou por atividade das lipoxigenases (LOX), que catalisam a produção dos leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) (NAKAMURA; SHIMIZU, 2011; SINGH *et al.*, 2010).

Os leucotrienos, assim como as PGs, têm ação vasodilatadora e edematogênica. Em especial os cisteinil-leucotrienos, LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>, causam intensa vasoconstrição. São

produtos derivados da ação das lipoxigenases que catalisam a inserção do oxigênio no ácido araquidônico e localizam-se no citosol das células nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. Quando a célula é ativada, a enzima 5-lipoxigenase vai para a membrana celular se associar à “proteína de ativação da 5-lipoxigenase” (SINGH *et al.*, 2010).

A lipoxigenase é designada de acordo com a posição da inserção da molécula de oxigênio no ácido araquidônico, sendo as 3 principais: 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX. O produto da reação dessa enzima são os ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE) que podem ser reduzidos à ácido hidroxieicosatetraenóicos (HETE). A enzima 5-LOX forma o 5-HPETE que é o precursor direto do receptor LTA4, o qual é o precursor de todos os leucotrienos bioativos potentes (NAKAMURA; SHIMIZU, 2011).

A síntese dos leucotrienos começa quando forma-se LTA4, que foi convertido em LTB4 ou LTC4. A síntese de LTB4 ocorre nos neutrófilos e nos eritrócitos e atua ao se ligar em um dos receptores BLT1 ou BLT2. A ligação ao BLT1, que é expresso em tecidos de defesa do hospedeiro, leva à quimiotaxia dos neutrófilos, agregação e migração através do endotélio, dentre outras. O LTB4 também regula a função lisossômica e a produção de radicais livres dos neutrófilos, aumenta a produção de citocinas e potencializa as ações das células de natural killer (NK). O receptor BLT2 ainda é desconhecido sua fisiologia (GHOLIPOUR *et al.*, 2018).

A síntese do receptor LTC4 ocorre nos mastócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos, e representam os cisteinil leucotrienos. Esses, causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular ao se ligarem aos receptores CysLT1. Também, são responsáveis pela atividade a estímulos e contração das vias aéreas e do endotélio vascular que ocorrem nos processos alérgicos e asmáticos (GHOLIPOUR *et al.*, 2018; TRENHAPI; VYAS 2017).

A histamina é uma amina formada pela histidina descarboxilase, está presente na maioria dos tecidos e celularmente é encontrada nos mastócitos, basófilos e nos neurônios em forma de grânulos intracelulares (THURMOND *et al.*, 2017). Essa amina é liberada pelos mastócitos por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas e irá ativar os receptores H1 nos músculos lisos e células endoteliais do sistema vascular, aumentando o fluxo sanguíneo local e a permeabilidade vascular, facilitando o acesso dos macrófagos e de outras células inflamatórias nos tecidos lesionados (ELY *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2010).

Em um processo inflamatório, a dilatação provocada nas vênulas pela histamina faz com que aumente a com concentração de sangue no local, conseqüentemente aumentando o

acesso das células inflamatórias que ocasionarão em reparo da área, sendo este o processo de formação de rubor (BARATA-ANTUNES *et al.*, 2017). Outra atividade da histamina é a contração provocada nas células endoteliais vasculares que irá distanciá-las permitindo o extravase de proteínas plasmáticas e líquidas, formando assim o edema (THURMOND *et al.*, 2017). As sensações de prurido e de dor são derivadas das ações da histamina sobre as fibras nervosas aferentes, como acontece na picada de inseto (HALLIWELL *et al.*, 2013).

#### 1.4.6 Óxido nítrico

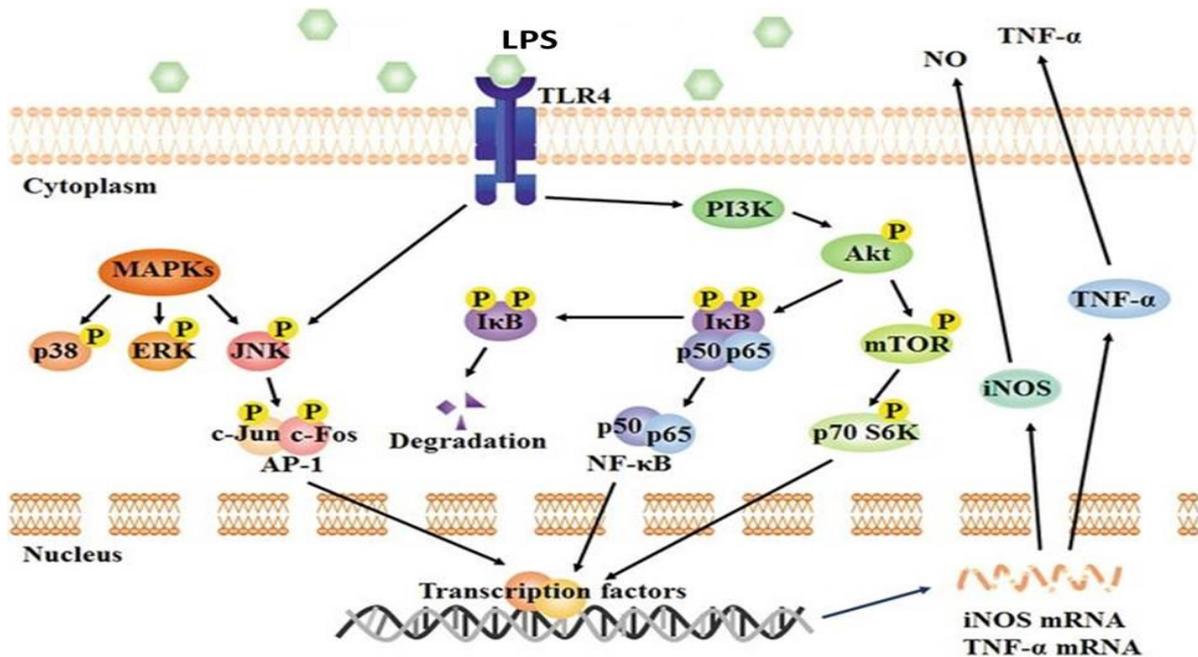
O óxido nítrico, produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora, o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos (BRABCOVA *et al.*, 2014; HAMEISTER *et al.*, 2018; SACRAMENTO *et al.*, 2017).

O óxido nítrico pode ser produzido fisiologicamente pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) onde servirá como molécula mensageira no sistema cardiovascular e nervoso, respectivamente. Já no que tange a inflamação, é produzido pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a partir do oxigênio molecular e da L-arginina (KHOYRATTY; UDALOVA, 2018; SINGH *et al.*, 2014). O NO está relacionado com a regulação da permeabilidade vascular e da morte celular durante o processo inflamatório (SACRAMENTO *et al.*, 2017), atua como um importante mediador da inflamação (HSU *et al.*, 2017), dado que após a sua formação ocorre dilatação dos vasos sanguíneos e aumento do volume do exsudato (BRABCOVA *et al.*, 2014).

A enzima iNOS está relacionada com processos inflamatórios. Todas as células inflamatórias expressam essa enzima em resposta às citocinas, como IFN- $\gamma$ . O NO possui funções pró-inflamatórias, onde induz a uma potente vasodilatação que aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas e funções citotóxicas que atacam os microrganismos as células alvo. Também, pode atuar ligando-se à enzimas envolvidas na respiração celular, impedindo o funcionamento adequado. Quando liberadas pelas células endoteliais, inibe a adesão dos neutrófilos e das plaquetas (HSU *et al.*, 2017; SACRAMENTO *et al.*, 2017).

Segundo Hameister *et al.* (2018) a geração do NO é um dos principais processos de ativação de macrófagos sendo de extrema importância para o controle de diversos processos fisiopatológicos incluindo a destruição de microrganismos infecciosos. IFN- $\gamma$  e

Lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos são alguns dos principais ativadores de macrófagos e indutores de NO (ALLEY; MURPHY; RUSSELL, 1995). Mediadores inflamatórios e citocinas produzidas por macrófagos ativados iniciam uma sinalização bioquímica levando à ativação do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) e ao aumento da expressão de óxido nítrico sintase isoforma 2 (NOS2) e arginase (ALLEY; MURPHY; RUSSELL, 1995; SINGH *et al.*, 2014).



**FIGURA 3.** Vias de sinalização envolvidas na produção de NO pela ativação de macrófagos induzida por LPS e expressão de citocinas inflamatórias. [LPS: lipopolissacarídeo, TLR4: Receptores Toll-like – 4, NO: Óxido nítrico, MyD88: Resposta primária de diferenciação mieloide proteína 88, MyD-88 como, IRAK: quinase associada ao receptor da interleucina-1, TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , p50, p65, p70, p38: subunidade proteína P, P13K, TRAF: Fator associado ao receptor de TNF, TAK 1: Quinase 1 ativada pelo fator de crescimento de transformação beta, NF $\kappa$ B: Fator nuclear  $\kappa$ B, I $\kappa$ B: Inibidor de  $\kappa$ B, IKK: I $\kappa$ B cinase, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, MKK: MAPK cinase, MEKK: Mitogênio / sinal extracelular quinase quinase regulada, ERK: quinases reguladas por sinais extracelulares].

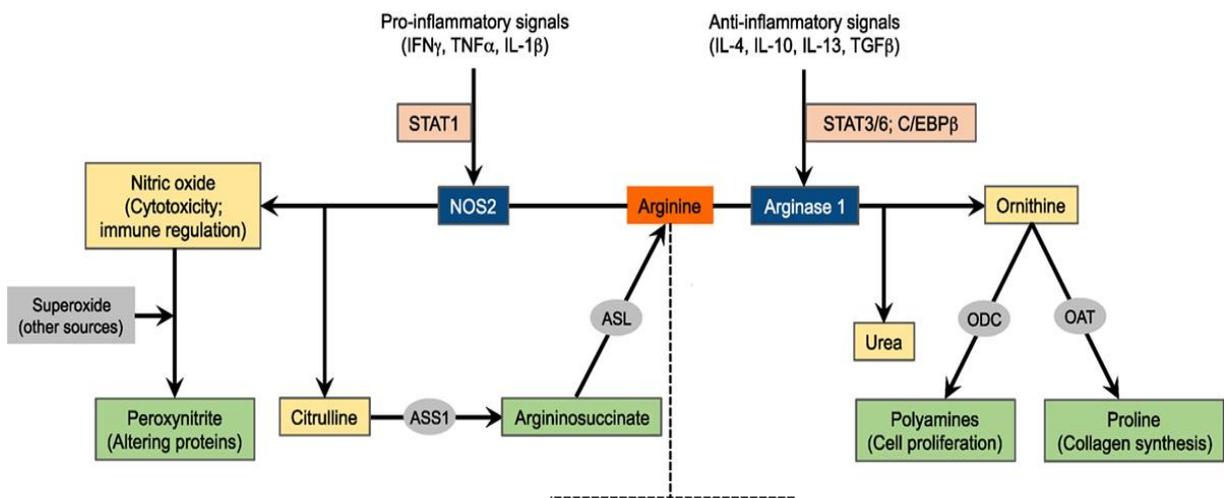
Fonte: FANG *et al.*, 2017

### 1.5 Arginase

Arginase é uma enzima muito importante na fisiologia de muitos organismos, incluindo os humanos, sendo que sua atuação ocorre expressivamente no ciclo da ureia, no

entanto, sua maior atividade também está relacionada com alguns processos patológicos, como no caso dos distúrbios cardiológicos, tais como a aterosclerose (PERNOW; JUNG, 2013). Outros trabalhos também relacionam a maior atividade desta enzima com o desencadeamento de processos oxidativos no organismo, sendo um mecanismo relacionado a biossíntese de EROs (HSU *et al.*, 2017).

De acordo com Buga, *et al.*, (1998) a NOS2, converte a L-arginina e citrulina em NO. A arginase também metaboliza a L-arginina e a ornitina, no entanto, seu produto final é a ureia (SINGH *et al.*, 2014). A arginase é a última enzima no ciclo da uréia, responsável pela hidrólise da arginina em uréia e ornitina. Podem ser encontradas duas formas de arginase no organismo, a arginase I e II, a forma I está diretamente relacionada ao processo de ureagenesis, enquanto que a forma II está envolvida em todas as outras funções que esta enzima possa ter, como por exemplo, a biossíntese de poliaminas, glutamato, prolina e a modulação da síntese do NO, particularmente pela NOS2 em vários órgãos (HSU *et al.*, 2017).



**FIGURA 4.** Esquema do metabolismo da arginina: as principais enzimas catabolizadoras de arginina envolvidas nas respostas imunes inflamatórias, NOS2: óxido nítrico sintase 2; ASS1: argininosuccinato sintase 1; ASL: argininosuccinato liase; ODC: ornitina descarboxilase; OAT: ornitina aminotransferase, NO: Óxido nítrico, TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL13: Interleucinas.

Fonte: RODRIGUEZ *et al.*, 2017.

As investigações de Buga *et al.*, (1998) sugerem que a forma II da arginase tem importante papel em funções citoplasmáticas como modulação da síntese de NO, atuando na regulação da atividade da NOS2 pela competição direta por L-arginina. Arginase II é ativada

em macrófagos estímulos por LPS, esta ativação se dá concomitantemente a fosforilação de NOS2, este dado sugere que a arginase funciona na regulação da NOS, modulando a produção de NO citotóxico (HSU *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2014). Vale citar que investigações de Buga, *et al.*, (1998) mostraram que a expressão de arginase reduz efetivamente a produção de NO.

A arginase está associada aos mecanismos de biossíntese de poliaminas, glutamato e prolina, sendo uma enzima presente em muitos órgãos do organismo humano, nesse sentido ela está relacionada aos mecanismos de proliferação celular, podendo estar sendo associada aos mecanismos de desenvolvimento do câncer (BUCKLEY; GILROY; PERNOW; JUNG, 2013; SERHAN, 2014; ZHANG; ZHU; LI, 2017).

## 1.6 Espécies reativas de oxigênio

A resposta inflamatória pode ser induzida pelo zymosan, um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, quando administrado intradérmica, intraperitoneal ou intra-articularmente (WENZEL *et al.*, 2017). De acordo com Alajmi e Alam (2014), o zymosan é um potente indutor da biossíntese de EROs em macrófagos.

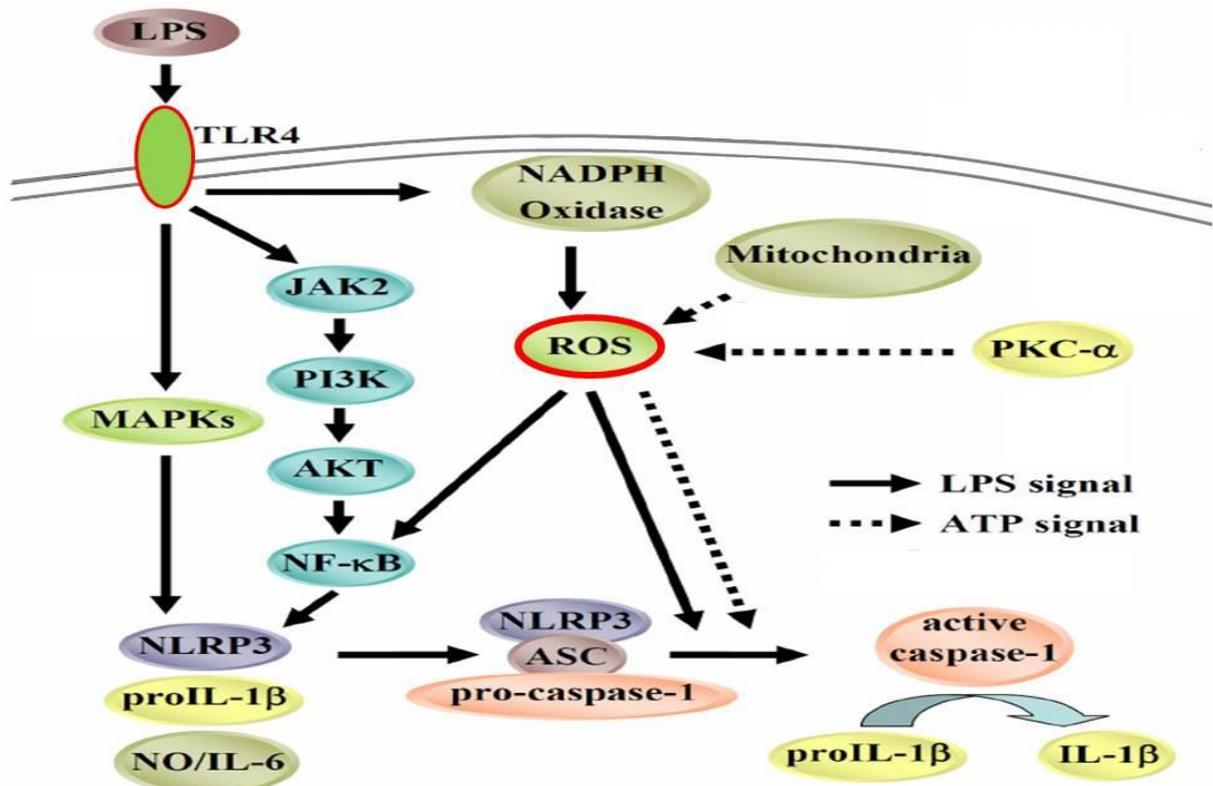
O estresse oxidativo é um distúrbio que ocorre no equilíbrio entre a produção de EROs também denominados radicais livres e as defesas antioxidantes. Os radicais livres são espécies químicas altamente reativas que podem causar danos no DNA e nas células (FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011; HSU *et al.*, 2017). As EROs constituem o principal tipo de radicais livres relacionados a mecanismos patogênicos. Ainda de acordo com Farina; Aschner e Rocha (2011) os radicais livres podem causar mutações no DNA e induzir alterações conformacionais nas proteínas envolvidas no processo de produção e manutenção do DNA, tais como as enzimas de reparo e DNA polimerase.

As EROs são produzidas no metabolismo intermediário de várias células, incluindo as de defesa, devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio, elas atuam auxiliando na resposta a microrganismos invasores, agindo na propagação da resposta inflamatória, no acionamento de células de defesa, na ativação da apoptose e fagocitose (FORMISANO *et al.*, 2015). As EROs são formadas pela redução incompleta do oxigênio, gerando radicais como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, que são comuns na ativação máxima de células de defesa como macrófagos, altamente reativas para com outras

biomoléculas, como lipídios e proteínas das membranas celulares e, até mesmo, o DNA (ELMASTAS; ABOUL-ENEINA, 2015; WENZEL *et al.*, 2017).

De acordo com trabalhos de (FORMISANO *et al.*, 2015), a geração de EROs pode causar danos teciduais e promover doenças inflamatórias caracterizadas pelo aumento de sua produção e diminuição do sistema antioxidante, resultando em estresse oxidativo. Existem mecanismos fisiológicos de controle das EROs produzidas, estes se baseiam em enzimas constitucionais e outros compostos endógenos, também existem algumas substâncias exógenas capazes de intervir na atividade das EROs, dentre os quais destaca-se a potente atividade antioxidante dos fenóis (flavonoides) de algumas espécies de plantas (ELMASTAS; ABOUL-ENEINA, 2015; GUPTA *et al.*, 2013; WENZEL *et al.*, 2017).

Estudos anteriores demonstraram que diferentes doenças inflamatórias são dependentes diretas do aumento do metabolismo oxidativo. Podemos citar o exemplo da doença de Parkinson, onde ocorre um demasiado aumento da produção de EROs, principalmente pela ativação da enzima NADPH oxidase presente nas células da micróglia (PETERSON; FLOOD 2012). Também podemos citar o caso da doença inflamatória intestinal, onde são encontrados níveis elevados de EROs como o  $H_2O_2$  e de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez também estão associadas a outros distúrbios metabólicos como o diabetes tipo 2 (BELTRAN *et al.*, 2009).



**FIGURA 5.** Mecanismo inflamatório associado a EROs em macrófagos ativados por LPS. [LPS: lipopolissacarídeo, TLR4: Receptores Toll-like – 4, ROS: Espécies Reativas de Oxigênio, NO: Óxido nítrico, MyD88: Resposta primária de diferenciação mieloide proteína 88, MyD-88 como, IRAK: quinase associada ao receptor da interleucina-1, TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , p13, p50, p65, p70, p38: subunidade proteína P, P13K, TRAF: Fator associado ao receptor de TNF, TAK 1: Quinase 1 ativada pelo fator de crescimento de transformação beta, NF $\kappa$ B: Fator nuclear  $\kappa$ B, I $\kappa$ B: Inibidor de  $\kappa$ B, IKK: I $\kappa$ B cinase, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno].

Fonte: HUA *et al.*, 2013.

## 1.7 O câncer

A multiplicação celular para renovação de tecidos e homeostase da função biológica requer um refinado processo de controle e manutenção para a realização da coordenação do comportamento das células envolvidas, no entanto, é claro que quando se trata de um organismo complexo não há um dano significativo se apenas uma célula apresentar comportamento anormal. Ademais quando ocorre de uma única célula sofrer alterações genéticas que lhe propiciem a maior capacidade de sobrevivência e proliferação isso se torna uma complicação com potencial devastador, pois ela irá gerar novas células e estas por sua vez também foram anômalas (ANDRADE; BRAGA; CESAR; TRENTTO; ESPÓSITO; SILVA & MARCUSSI, 2018).

A estrutura do tecido e consequentemente dos órgãos, pode então, tornar-se alterada pela expansão de um clone de células anormais. Essa série de eventos fisiológicos e bioquímicos ocorre no câncer, essa patologia é considerada um problema de saúde grave, a segunda causa mais comum de mortalidade em humanos na maioria dos países desenvolvidos (ALLAVENA *et al.*, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SINN; KREIPE, 2013).

O câncer é considerado uma das maiores causas de morte no mundo, é uma doença genômica, surgindo como consequência de alterações cumulativas no material genético de células normais, as quais sofrem transformações até se tornarem malignas (ANDRADE; BRAGA; CESAR; TRENTTO; ESPÓSITO; SILVA & MARCUSSI, 2018). É uma doença genética que pode vir a ocorrer em todos os tipos de tecidos do organismo. É resultante de mudanças patológicas que surgem nas informações contidas no DNA, ou seja, tem sua origem em mutações, que alteram a expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular, ou nos mecanismos de reparo do DNA

(ALLAVENA *et al.*, 2011; SINN; KREIPE, 2013). Ainda que visto como uma única doença o câncer na verdade se trata de um complexo grupo de doenças com envolvimento de distúrbios metabólicos (ALLAVENA *et al.*, 2011).

O câncer tem por definição o crescimento desordenado de células, que entram nos tecidos e órgãos, podendo se alastrar para outras regiões do corpo, o que constitui metástase. Especificamente, o câncer de mama é um tumor maligno que se desenvolve no tecido mamário, sendo o mais incidente na população feminina mundial e brasileira, tornando um grave problema de saúde pública e gerando elevados índices de mortalidade (INCA 2018).

Esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma, com estimativas para o biênio de 2018 - 2019, de 59.700 novos casos de câncer de mama no Brasil, com 17,90 casos para cada 100 mil mulheres. Sendo o primeiro mais incidente nas Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil casos) (INCA, 2018).

O câncer é uma doença com elevado índice de mortalidade, que atinge anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo, ultrapassando 9 milhões de casos em 2018 (OMS). Embora tenha havido muito progresso na quimioterapia do câncer, muitos tumores ainda são de difícil remissão, tornando necessária a procura de novos agentes antitumorais (ALLAVENA *et al.*, 2011). Neste cenário, as plantas superiores constituem uma rica fonte de produtos naturais que podem ser úteis contra neoplasias (PAN *et al.*, 1996).

A estimativa mundial mostra que, em 2012, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia) (KRANZ *et al.*, 2016). Taxas intermediárias são vistas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático (incluindo a China). As menores taxas são vistas em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (incluindo a Índia). Enquanto, nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimento, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado). Além disso, apesar da baixa incidência, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (TORRE; SIEGEL; JEMAL, 2016).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências foram encontradas na mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (TORRE; SIEGEL; JEMAL, 2016).

A relação da atividade anti-inflamatória e antiproliferativa são evidentes quando observamos a ligação pró-inflamatória de citocinas como o TNF- $\alpha$  e interleucinas com seus receptores ou a ativação de qualquer um dos receptores do tipo Toll. Esse mecanismo ocorre pelo reconhecimento de antígenos componentes de microrganismos invasores, que provoca a atividade do fator nuclear kB (NF-kB)/I $\kappa$ B quinase (IKK) e ativa proteínas quinases ativada por mitógeno (MAPKs). Isto conduz à ativação da proteína ativadora 1 (AP-1), outro fator de transcrição que é crítico para a indução de genes de citocina. Assim, a ativação de NF-kB e de proteína quinase ativada por mitógeno 3 (MAPKs-3) conduz a um resposta inflamatória (ALLAVENA *et al.*, 2011; GHOLIPOUR *et al.*, 2018; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TORRE; SIEGEL; JEMAL, 2016).

Atualmente está bem estabelecido que a inflamação induzida por agentes patogênicos é um fator potencial de risco elevado para o desenvolvimento do câncer. Para melhor esclarecer essa relação podemos citar a infecção persistente por *Helicobacter pylori* que de acordo com muitas investigações está altamente associada com o adenocarcinoma gástrico e o linfoma (ALLAVENA *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2015), a infecção pelo vírus do papiloma humano aumenta o risco de câncer cervical (ZHANG; ZHU; LI, 2017), as infecções pelo vírus da hepatite B e C aumentam a incidência de carcinoma hepatocelular (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010), a infecção pelo vírus Epstein-Barr também está intimamente relacionada ao carcinoma nasofaríngeo (CHUA *et al.*, 2016). Estes agentes causais levam a infecções persistentes associadas a baixos níveis de inflamação crônica. Além disso, algumas doenças auto-imunes também se correlacionam com o desenvolvimento do câncer (ZHANG; ZHU; LI, 2017).

### **1.7.1 Drogas antineoplásicas**

Existem três enfoques principais para o tratamento do câncer já estabelecido, são a excisão cirúrgica, irradiação e a quimioterapia, o papel de cada um desses tratamentos vai depender de alguns fatores como o tipo de tumor, a localização e o estágio de desenvolvimento. A quimioterapia pode ser empregada como terapia de fato ou ainda como

adjuvante de outras formas de tratamento (MELERO *et al.*, 2014; TORRE; SIEGEL; JEMAL, 2016).).

Os agentes farmacológicos empregados na terapêutica contra o câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de várias formas diferentes, alguns interferem nos mecanismos celulares de sobrevivência, proliferação e migração (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Ainda no que tange a esses fármacos, observa-se que mesmo com todos os estudos e pesquisas da indústria para torna-los capazes de agir seletivamente contra as células cancerosas nos tecidos neoplásicos, esses permanecem apresentando um grau de citotoxicidade elevado, levando o paciente a ter complicações em seguir o tratamento devido aos efeitos colaterais (SINN; KREIPE, 2013).

Os mecanismos de ação dos agentes antiproliferativos está diretamente associado a duplicação do DNA e subsequente multiplicação celular. Em geral os agentes farmacológicos impedem a duplicação celular por impedimento da duplicação do DNA, levando a morte celular. O grande problema em relação ao tratamento está no fato dos agentes farmacológicos não serem seletivos, podendo levar as células saudáveis a morte, em contrapartida, os compostos de origem natural são uma fonte muito ampla de pesquisa no que tange a atividade antiproliferativa do câncer, podendo vir a ser uma alternativa viável na redução dos efeitos indesejados e com uma terapêutica eficaz (CRAGG; NEWMAN, 2009).

Os produtos naturais são conhecidos como as maiores e mais importantes fontes de moléculas usadas na quimioterapia. Além disso, aproximadamente 60% das drogas usadas para tratar e prevenir o câncer são derivados de produtos naturais como o Taxol isolado de *Taxus brevifolia*. A vincristina e vinblastina também foram isoladas de *Catharantus roseus* assim como a camptotecina isolada de *Camptotheca acuminata* ambas com ação anti-câncer (NEWMAN; CRAGG 2012).

Ainda falando a respeito dos alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina, vale ressaltar que foram os primeiros compostos derivados de plantas que avançaram em uso clínico como drogas anticâncer (CRAGG; NEWMAN, 2009). A vincristina foi aprovada pelos Estados Unidos Food and Drug Administration em julho 1963 sob o nome comercial Oncovin. Nos últimos anos, as propriedades anti-câncer dos sesquiterpenos têm sido alvo de muitos estudos. Extensas pesquisas têm sido realizadas para caracterizar os mecanismos moleculares bem como o seu potencial na utilização como agentes quimioterapêuticos e quimiopreventivos, no entanto, muitas dessas pesquisas, deixam de lado o potencial do efeito

sinérgico sobre as vias metabólicas (KREUGER *et al.*, 2012; NORTHCOTT *et al.*, 2018; ZHANG; ZHU; LI, 2017).

As substâncias naturais com atividade biológica são frequentemente utilizadas na síntese ou isolamento de novas estruturas que possuem propriedades farmacológicas (KO *et al.*, 2018) Também nesse sentido, espécies usadas na medicina tradicional têm motivado a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos quimiopreventivos contra câncer (CRAGG; NEWMAN, 2009). Mais de 80.000 dos 250.000 espécies da maioria das plantas conhecidas são utilizados para fins de saúde, e mais de 60% das recentes drogas anticâncer são originários de fonte natural. A grande variedade de compostos naturais biologicamente ativos e sua ampla diversidade estrutural tem relevância na instalação e separação de compostos bioativos que poderiam ser úteis como quimiopreventivos do câncer e/ou agentes quimioterapêuticos (CRAGG; NEWMAN, 2009). A busca de inibidores tumorais efetiva em plantas superiores para uso humano exige um sistema eficaz, econômico e rápido para a avaliação inicial de plantas com potencial para atividade antitumoral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Na Amazônia existem muitas espécies usadas na medicina tradicional com finalidade terapêutica. As plantas medicinais compõem uma importante fonte de recursos terapêuticos, inclusive no tratamento do câncer, conforme demonstram diversos medicamentos oriundos de substâncias de origem vegetal ou inspirados neles (CRAGG; NEWMAN, 2009). Entretanto, comumente, extratos de plantas medicinais exibem atividades biológicas mais pronunciadas que seus constituintes isolados. Devido, frequentemente, às interações sinérgicas entre tais componentes, envolvendo, no geral, a atuação sobre múltiplos alvos (CASANOVA; COSTA 2017).

A combinação de diferentes substâncias biologicamente ativas demonstra-se particularmente promissora no tratamento de doenças com elevado grau de complexidade, pois permite a atuação simultânea sobre diversos alvos diferentes, garantindo maior eficácia e menor chance de resistência aos fármacos utilizados. Nesse contexto as plantas medicinais e seus metabólitos têm sido objeto de crescente interesse (CASANOVA; COSTA 2017; KO *et al.*, 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

A Amazônia tem grande biodiversidade, sendo que muitas espécies vegetais que nela habitam não são encontradas em nenhum outro lugar do planeta, no entanto, pouco se sabe sobre as possíveis propriedades biológicas dessas espécies, desta forma, existe a necessidade de estudos farmacológicos dos diferentes produtos naturais de nossa região, contribuindo então para o desenvolvimento de novos compostos ativos que possam ser utilizados na terapêutica. Os laboratórios farmacêuticos precisam de modelos naturais de componentes biológicos extraídos especialmente de plantas medicinais para desenvolver novos medicamentos, logo pesquisas neste setor são de grande importância e uma área de estudo muito promissora.

Na região amazônica a influência cultural, principalmente da cultura indígena tem grande impacto sobre a saúde da população, os povos indígenas foram os primeiros habitantes amazônicos. De acordo com pesquisas antropológicas, esses nativos utilizavam as plantas como remédios, ou seja, servia para fins profiláticos e terapêuticos. Muitas plantas apresentavam o efeito previsto. Essa cultura, com o passar dos anos, foi sendo transmitida para as próximas gerações, hoje sendo uma grande referência para a descoberta de novas drogas. Devido a esta característica recebeu o nome de planta medicinal.

Os resultados terapêuticos obtidos variam de acordo com a espécie de escolha e a finalidade de seu uso, geralmente as plantas medicinais são empregadas com as mais variadas finalidades como anti-inflamatórios, antibióticos, anticonvulsivantes dentre outros. A indústria farmacêutica reconhece o valor do conhecimento tradicional, fato que corrobora com essa afirmação é que laboratórios de primeiro mundo se basearem em pesquisas etnofarmacológicas na busca de novas drogas patenteáveis.

A extração industrial do óleo essencial da *Cyperus articulatus* L. para finalidades cosméticas gera resíduos sólidos sem finalidade comercial, podendo o mesmo vir a ser até uma fonte de poluição. Esse material sólido resultante de constituição química desconhecida, aparentemente desprovido de qualquer serventia é o foco deste trabalho. Qual seriam os componentes presentes? Mantêm as mesmas moléculas encontradas no óleo? Teria alguma atividade biológica?

Tendo em vista o potencial dessa espécie e a escassez de estudos relacionados às suas atividades biológicas, avistamos a possibilidade de realização de uma pesquisa que vise avaliar a atividade farmacológica apresentada pela espécie *Cypeus articulatus* L. Reitero que até o presente momento não existe na literatura nenhum trabalho que tenha realizado a

pesquisa quanto a atividade anti-inflamatória e antiproliferativa do extrato etanólico do material sólido resultante da extração do óleo essencial dessa espécie.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliação da atividade anti-inflamatória, antiproliferativa e produção de espécies reativas de oxigênio do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L. em modelo experimental *in vitro* em macrófagos peritoneais.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterização química do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L. por Cromatógrafo acoplado a detector de massas;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L., *in vitro*, sobre viabilidade celular de macrófagos peritoneais;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L., *in vitro*, sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio, em culturas de macrófagos peritoneais, estimuladas por zymosan;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L., *in vitro*, sobre a produção de óxido nítrico, interleucina 1- $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e prostaglandinas tipo-2 em cultura de macrófagos peritoneais, estimuladas por LPS+INF- $\gamma$ ;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L., *in vitro*, sobre a atividade da enzima arginase, em culturas de macrófagos peritoneais estimulados por LPS+INF- $\gamma$ .
- Avaliar o efeito do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L., *in vitro*, sobre a atividade proliferativa de células tumorais humanas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material botânico

Foram utilizados rizomas da espécie *Cypeus articulatus* L., que foram coletados no cultivo experimental vinculado a projetos da Universidade Federal do Oeste do Pará, na comunidade de Tabocal/Santarém-PA (-54°43'00,10"W e -02°37'41,10"S), Km 23. A espécie foi identificada pelo botânico Msc. Antônio Elielson Sousa da Rocha, do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Uma exsicata foi depositada no herbário do MPEG e registrada sob o número de exsicata MG: 207174 em Belém-PA.

### 4.2 Preparação do extrato etanólico da *Cypeus articulatus* L.

Foram coletados 3 Kg de rizomas da *Cypeus articulatus* L., após a coleta os rizomas foram submetidos à limpeza, secos em ambiente aberto por 3 dias consecutivos em seguida moídos. Após o período de secagem o material triturado foi submetido à hidrodestilação por arraste a vapor, em uma dorna de 150 L, com uma duração de 02 horas e 30 minutos para a obtenção de óleo essencial. Após a extração do óleo essencial por arraste a vapor, resulta um resíduo sólido vegetal denominado de borra, alíquotas de 40 g foram retiradas e submetidas à extração a quente via Soxhlet usando etanol desodorizado a 96 %. O solvente da solução resultante da extração à quente, foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se um concentrado do extrato etanólico dos rizomas da *Cypeus articulatus* L.

### 4.3 Análise cromatográfica da *Cyperus articulatus* L.

A análise da composição química do extrato etanólico foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrícolas; Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, coluna = 80°C, taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C (20 min) e detector = 300°C. foi utilizado hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min e detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z =30 a 500 u.m.a. O extrato da *Cyperus articulatus* L. foi solubilizado em acetato de etila na concentração de 20 mg/mL e a identificação dos compostos majoritários do extrato foi realizada através da comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-11).

#### 4.4 Animais

Foram utilizados 8 camundongos, machos, adultos da linhagem C57BL/6. Estes animais foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais, campus de Belo Horizonte. Os animais foram mantidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, em temperatura ambiente controlada ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Todos os animais tiveram acesso à água e comida à vontade. Os experimentos realizados foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética animal (CEUA/UFOPA), com o número de protocolo (07004/2013).

#### 4.5 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos

Foram utilizados 6 camundongos C57BL/6 que foram estimulado por via intraperitoneal com 2 mL de tioglicolato (3 %) 4 dias antes do experimento. As células foram coletadas por lavagem peritoneal com PBS gelado. A cultura de macrófagos peritoneais começou com lavagem peritoneal, a qual foi realizada com uma injeção, através da agulha e uma seringa estéril, de 10 mL de PBS estéril gelada no peritônio. Depois de uma massagem suave, o conteúdo injetado no peritônio foi aspirado através do mesmo sistema de aplicação, o que resulta em uma suspensão com diferentes tipos de células, em que predominam os macrófagos. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos e, após ressuspensão dos macrófagos obtidos em meio rpmi sem fenol e suplementado com 10 % de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina, as células foram contadas na câmara de Neubauer, as quais foram ajustadas para  $5 \times 10^5$  macrófagos por cavidade da placa de cultura. Em seguida, distribuído o volume correspondente a cada poço da placa, que foi em seguida incubada durante 2 horas a  $37^\circ \text{C}$  em 5% de atmosfera de  $\text{CO}_2$ , para permitir a aderência de macrófagos. Em seguida, três lavagens foram realizadas com PBS estéril para remover as células que não aderiram, seguido de nova incubação durante 24 h nas mesmas condições. As células foram cultivadas durante um período de 24 h e 48 h para a avaliação da viabilidade celular, EROs, a produção de NO e determinação da atividade enzimática da arginase.

#### 4.6 Drogas e soluções

As drogas e soluções utilizadas neste estudo foram: Extrato etanólico de *Cypeus articulatus* L., Zimosan (Sigma), Tioglicolato (3 %), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), L-arginina (Sigma-Aldrich), reagente de Griess e nitrito sódico (Sigma),  $\alpha$ -isonitrosopropilfenol (Sigma-aldrich), dextran, *Escherichia coli* lipopolysaccharide (sero-types 055: B 5 e 055: B8), ethylenediaminetetraacetic acid (sodium-EDTA), ureia (Sigma-aldrich), interferon- $\gamma$  from

Preprotec, dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Chemical, EUA), Luminol (Sigma-Aldrich), Solução de Turk e etanol 96 GL da empresa (Sigma-Aldrich).

#### **4.7 Análise da viabilidade celular**

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o método MTT modificado (MOSMANN, 1983). As culturas de macrófagos mantidas durante 24 h, submetidas a estímulo por LPS+IFN- $\gamma$  (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), zymosan (1x10<sup>7</sup> partículas/30  $\mu\text{L}$ ) e tratamento com *Cyperus articulatus* L., 1 h antes, nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em seguida foram lavadas com tampão PBS (pH: 7,4). Após a lavagem, foi adicionado MTT diluído em PBS e os macrófagos foram incubados durante 3 h a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação o MTT foi retirado para adição de isopropanol diluído com PBS, e em seguida as células foram coletadas e transferidas para microtubos. A coloração obtida foi avaliada por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 590 nm.

#### **4.8 Análise da capacidade antioxidante.**

##### **4.8.1 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

Para avaliar o efeito da *Cyperus articulatus* L. na produção de EROs por macrófagos peritoneais estimulados por zymosan (1x10<sup>7</sup> partículas/30 $\mu\text{L}$ ), tratados ou não com *Cyperus articulatus* L. foi utilizado o método modificado de dosagem de EROs de (RHEE, *et al.*, 2010), que consiste na ativação de macrófagos mediante à estímulo (zymosan) e marcação da produção de ROS por Luminol (5x10<sup>-4</sup>M) (Sigma-Aldrich), seguida de uma posterior leitura em aparelho luminômetro (contador de fótons) projetado que possui um tubo fotomultiplicador (que incorpora uma superfície de gálio), resfriado a -20 °C e possui uma eficiência quântica acima de 10 % (aproveitamento do sinal luminoso incidente), alta sensibilidade e detecta luz de comprimentos de onda variando entre 200 e 900 nm. O sinal emitido pelo tubo fotomultiplicador é detectado diretamente por uma unidade contadora que transforma uma variação de corrente elétrica em uma contagem digital. Os dados são foram coletados como média de contagens/segundo correspondendo aos fótons/segundo emitidos na reação de luminescência. As células foram pré tratadas ou não com *Cyperus articulatus* L. 1h antes, nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## 4.9 Análise anti-inflamatória.

### 4.9.1 Determinação da produção de Óxido nítrico (NO)

A quantidade de óxido nítrico produzida foi estimada através da dosagem de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tratados ou não com *Cyperus articulatus* L., 1 h antes, nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O método empregado foi o método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Este método consiste em uma reação colorimétrica no qual o sobrenadante da cultura é incubado com igual volume dos reagentes de Griess. Este reagente é preparado pela mistura de volume de solução de naftil-etileno a 0,1 % com a solução de sulfanilamida a 1 % em ácido fosfórico a 5 %. Um volume de 500  $\mu\text{L}$  de amostra é misturada com o mesmo volume de reagente de Griess. O resultado da reação é a coloração rosa púrpura do meio. Este foi posteriormente medido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, contra a um branco constituído por um meio de cultura (RPMI suplementado) e reagentes de Griess em volumes iguais. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de NO. As concentrações de nitrito foram determinadas pela comparação com os resultados obtidos pela curva padrão de diluições seriadas de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) dissolvidos em meio de cultura. Para as dosagens em sobrenadantes, as amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços (TPP), 50  $\mu\text{L}$  de amostra/poço. O padrão de nitrito de sódio (250 mM) foi adicionado em duplicata e diluído 1:2 nos poços posteriores em meio RPMI. Logo após adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de Griess sobre as amostras, a placa foi mantida em escuro por 10 minutos e a densidade óptica foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System, model SPECTRAmax 340, Molecular devices, Sunnyvale, California).

### 4.9.2 Determinação dos níveis de Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), Fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) e Prostaglandinas tipo 2 (PGE $_2$ ).

Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE $_2$  foram quantificados por este método baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A enzima mais comumente utilizada é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Para a realização destes testes, foram utilizados Kits adquiridos comercialmente. A quantificação desses mediadores foi determinada no sobrenadante obtido da cultura de macrófagos peritoneais.

Após a coleta do sobrenadante da cultura, o mesmo foi centrifugado a 3000 rpm

(rotações por minuto) a 4°C durante 5 minutos. Coletamos o sobrenadante resultante e estocamos a -20 °C até a realização da dosagem.

Para a dosagem do IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> foi utilizado kit de imunoenensaio seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante (Sigma). As placas foram inicialmente sensibilizadas com o anticorpo de captura espécie-específico (1:250) durante 18 horas a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada com uma solução de PBS 0,05% Tween-20 e incubada com a solução de bloqueio (PBS, SFB 5%) por mais uma hora. Em seguida, após uma nova série de lavagens, as amostras foram adicionadas aos poços por um período de duas horas em temperatura ambiente. Paralelamente, para diluição da curva-padrão, são utilizadas diferentes diluições dos padrões de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>.

Após a incubação das amostras, uma solução do anticorpo de detecção foi adicionada por mais uma hora, seguida da solução de avidina ligada a peroxidase (HRP). Após a adição do substrato TMB, a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2N). A quantidade de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> no sobrenadante da amostra de cada grupo foi determinada com auxílio do leitor de microplaca em um comprimento de onda de 540 nm, sendo que a concentração referente a cada amostra é calculada a partir da curva padrão correspondente em pg/ml e expressa em percentagem em relação ao controle.

#### **4.10 Análise antiproliferativa.**

##### **4.10.1 Dosagem da atividade da enzima arginase**

Para avaliar o efeito inibitório da *Cyperus articulatus* L. na atividade da enzima arginase em macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS (1  $\mu$ g/mL), a metodologia empregada foi de CORRALIZA *et al.* (1994). As células foram pré tratadas ou não com *Cyperus articulatus* L., 1 h antes, nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu$ g/mL. A atividade de arginase foi medido nos lisados celulares como descrito por Corraliza *et al.* (1994). Resumidamente, as células foram lisadas com 50  $\mu$ l de 0,1 % de Triton X-100 (Sigma Chemicals Co.). Após 30 min, num agitador, 50  $\mu$ l de 10 mmol de MnCl<sub>2</sub> (Merck), e 50  $\mu$ L de Tris-HCl (Merck) foram adicionados, e a enzima foi ativada por aquecimento durante 10 min a 55 °C. Arginina hidrólise foi realizada por incubação de 25  $\mu$ l de lisado ativado com 25 mL de L-arginina 0,5 mol / L (Merck; pH 9,7) a 37 °C durante 60 min. A reação foi parada com 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96 %) / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %) / H<sub>2</sub>O (1/3/7, v/v/v). Como um grau de atividade de arginase, a concentração de ureia foi medida a 540 nm depois da adição de 25  $\mu$ L de um-isonitrosopropiophenono (Sigma Chemical Co.) dissolvido em etanol a 100%, durante

45 min a 95° C. Uma unidade de atividade de arginase estará definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de ureia por minuto. A curva padrão foi preparada com quantidades crescentes de ureia entre 1,625 e 100 LG.

#### 4.10.2 Ensaio de atividade antiproliferativa

O ensaio de actividade antiproliferativa *in vitro* foi realizado como descrito por Monks *et al.* (1991). Utilizaram-se linhas celulares de tumor humano U251 (glioblastoma, SNC), MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma do pulmão) para efectuar rastreio *in vitro*. Essas linhas celulares, fornecidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI/EUA). As amostras também foram avaliadas contra um queratinócito humano transformado espontaneamente de pele histologicamente normal (linhagem HaCaT) gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (Universidade de Campinas, UNICAMP).

As culturas em estoque foram cultivadas em 5 mL de RPMI-1640 suplementado com 5 % de soro bovino fetal (RPMI/FBS 5 %) em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C e ambiente úmido. Uma mistura de penicilina e estreptomicina (1µg/mL: 1 UI/mL) foi adicionada às culturas experimentais. As células (100 µL de suspensão celular por compartimento, densidade de inoculação entre 3 x 10<sup>4</sup> e 6,5 x 10<sup>4</sup> células/mL) foram expostas a diferentes concentrações de EECA (0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL, amostras dissolvidas em DMSO/RPMI/FCS 5 %) e doxorubicina (controle positivo) nas mesmas concentrações e incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ambiente úmido por 48 h. A concentração final de DMSO (0,25 %) não afetou a viabilidade celular. Todas as amostras foram testadas em triplicado.

As células foram fixadas com ácido tricloroacético a 50 % e a proliferação celular foi determinada por espectrofotometria (540 nm) do conteúdo de proteína celular utilizando o teste sulforrodamina B. Três medidas foram obtidas no início da incubação (tempo zero, T<sub>0</sub>) e 48 horas após a incubação para células sem composto (C) e testadas (T). A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação  $100 \times [(T - T_0) / C - T_0]$ , para  $T_0 < T < C$ , e  $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ , para  $T \leq T_0$  e uma concentração- curva de resposta para cada linha celular foi plotada. A concentração efectiva TGI (concentração que produz 100 % de inibição do crescimento celular ou efeito citostático) foi calculada a partir da curva concentração-resposta por regressão não linear usando o software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).

#### **4.11 Análise estatística**

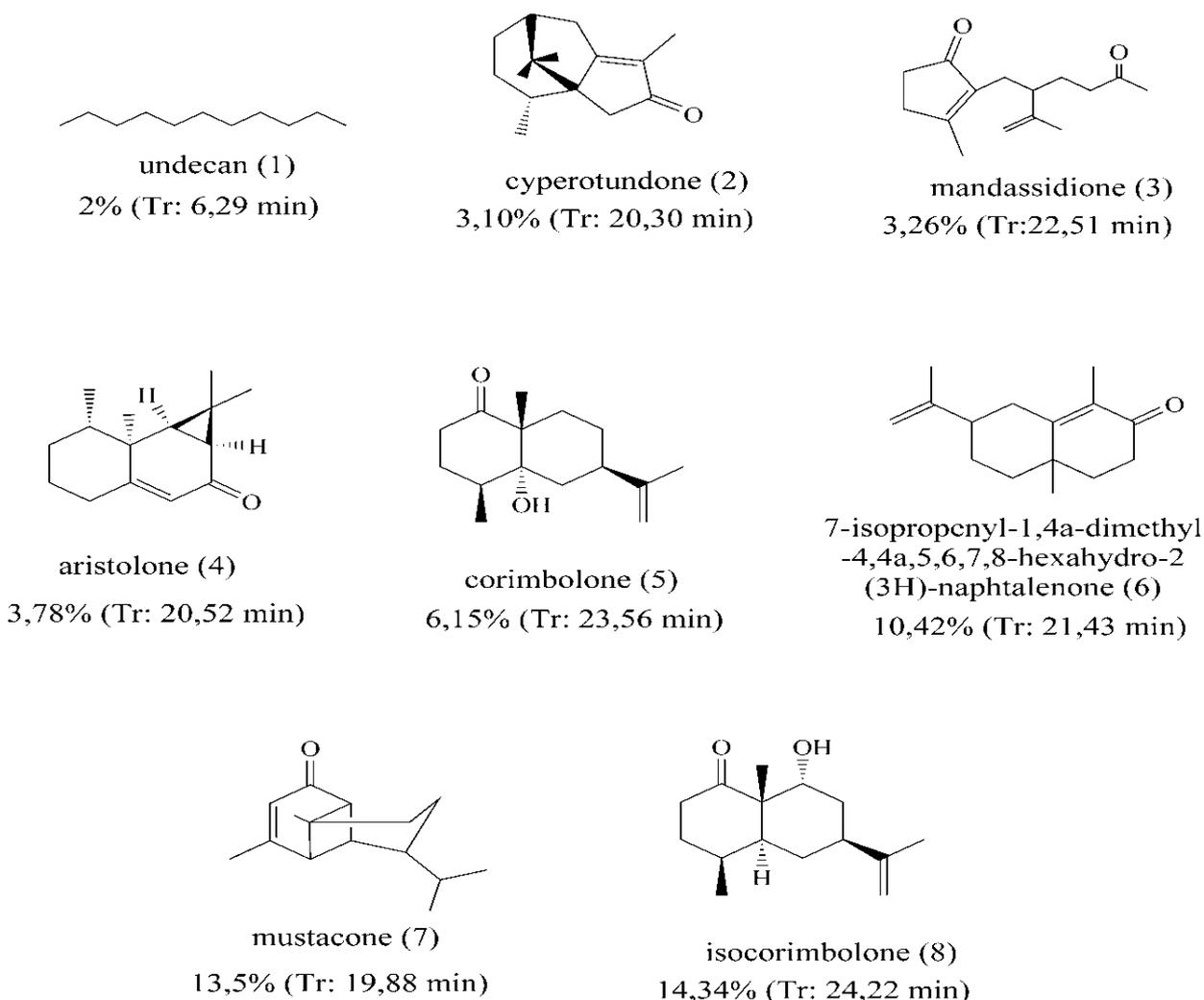
A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism 5.0 (Prism software, Irvine, CA, USA). Os resultados foram expressos como a média +/- desvio padrão (SD) a partir de pelo menos três experiências diferentes. Análise de variância (ANOVA two-way) seguida pelo teste tukey (T), teste de Dunnett foram aplicado para avaliar a significância estatística das diferenças entre os grupos de estudo. Um valor de  $p < 0,01$  foi escolhido como o critério para a significância estatística.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise da composição química da *Cyperus articulatus* L.

O rendimento do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L. foi de 7 % g/g a partir de 40 g do resíduo sólido (Massa úmida). A análise da composição química da *Cyperus articulatus* L. revelou a presença de oito compostos majoritários, que pertencem ao grupo químico dos terpenóides, correspondendo a 56.5 % de constituintes totais da *Cyperus articulatus* L., dos quais três apresentaram percentuais de concentração maiores que 10 %: isocorimbolona, 7-Isopropenil-1,4a-dimetil-4,4a,5,6,7,8-hexahidro-2(3H)-naftalenona, e mustacona (QUADRO 1 e TABELA 1).

**QUADRO 1.** Constituintes majoritários identificados e respectivas concentrações encontradas na *Cyperus articulatus* L.



**TABELA 1** - Composição química do extrato etanólico da *Cyperus articulatus* L.

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Identificação</b>	<b>%</b>
24,22	Isocorimbolone	14,34
19,88	Mustacone	13,50
21,43	7-isopropenil-1,4a-dimetil-4,4a,5,6,7,8-hexahidro- 2(3H)-naftalenona	10,42
23,56	Corimbolone	6,15
20,53	Aristolone	3,78
22,51	Mandassidione	3,26
20,30	Cyperontundone	3,10
6,29	Undecan	2,00
<b>Total de constituintes identificados</b>		<b>56,5%</b>

Fonte: Silva, *et al.*, 2019. t<sub>R</sub> = Tempo de retenção; % = Porcentagem relativa.

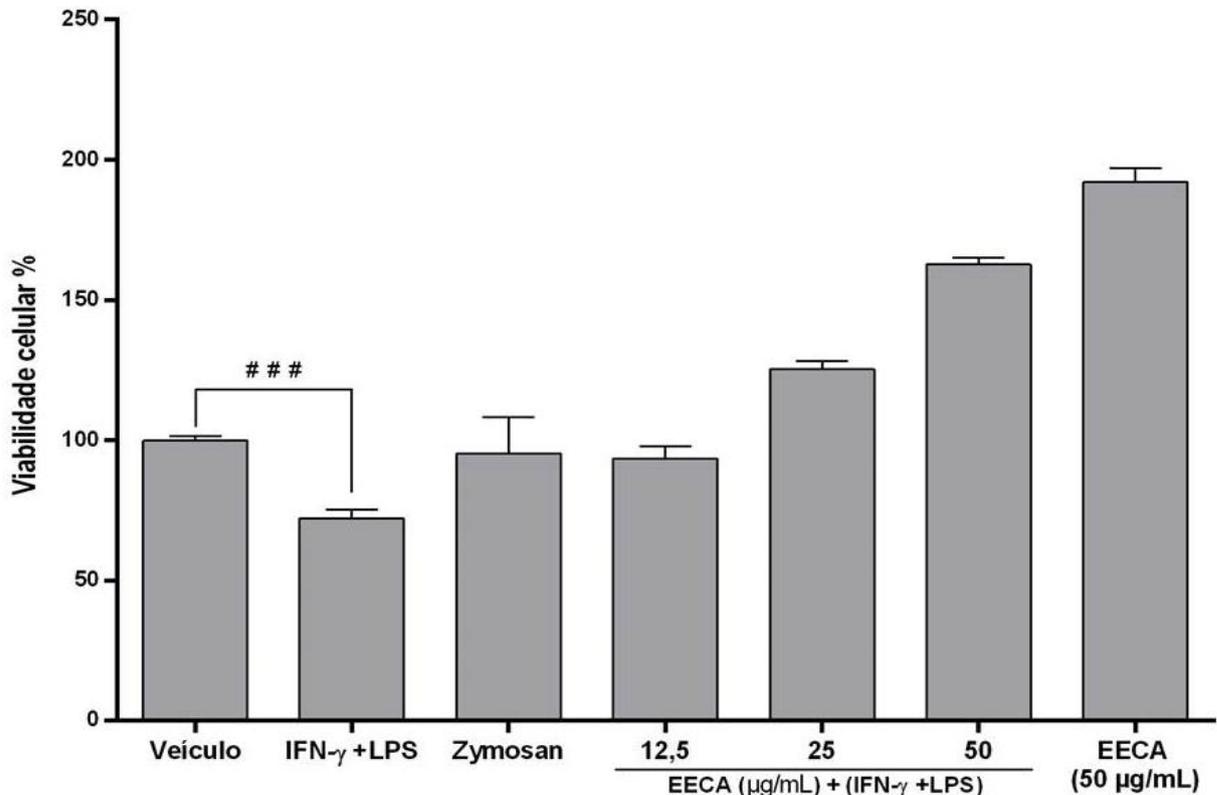
## 5.2 Viabilidade celular

No modelo experimental de viabilidade celular realizado pelo método MTT (9), os resultados demonstram que a *Cyperus articulatus* L. nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL não afetou de maneira significativa a viabilidade dos macrófagos peritoneais estimulado por LPS + IFN-γ (1 µg/mL) e zymosan (1x10<sup>7</sup> partículas/30µL), uma vez que a porcentagem de viabilidade celular dos grupos tratados com *Cyperus articulatus* L. ultrapassou 100 % (**FIGURA 6**).

Os resultados obtidos demonstram que as concentrações da *Cyperus articulatus* L. testadas aqui não afetaram negativamente a viabilidade dos macrófagos (F (5, 12) = 60,93, P <0,0001). Além disso, há um aumento na atividade metabólica dessas células, medida pelo aumento da formação de cristais de formazan no MTT, quando expostos às concentrações do extrato (*Cyperus articulatus* L. 25 e 50 (µg/mL) + LPS + IFN -γ (1 µg/mL)) e (*Cyperus articulatus* L. 50 (µg / mL)), com exceção de 12,5 µg/mL (F (6, 14) = 100,5, P <0,0001, one-way ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey).

No teste de viabilidade celular observamos que houve eficiência no método aplicado, o grupo estímulo (LPS + IFN-γ (1 µg/mL)) apresentou efeito negativo (-27,8 %) sobre o percentual de células viáveis. O grupo que recebeu o Zymosan também apresentou redução (-

5 %) no percentual de viabilidade. Os grupos que foram tratados com a *Cyperus articulatus* L. não apresentaram redução significativa no percentual de células viáveis, mesmo no grupo com maior concentração da *Cyperus articulatus* L. o percentual ficou em 192 % (**FIGURA 6**).



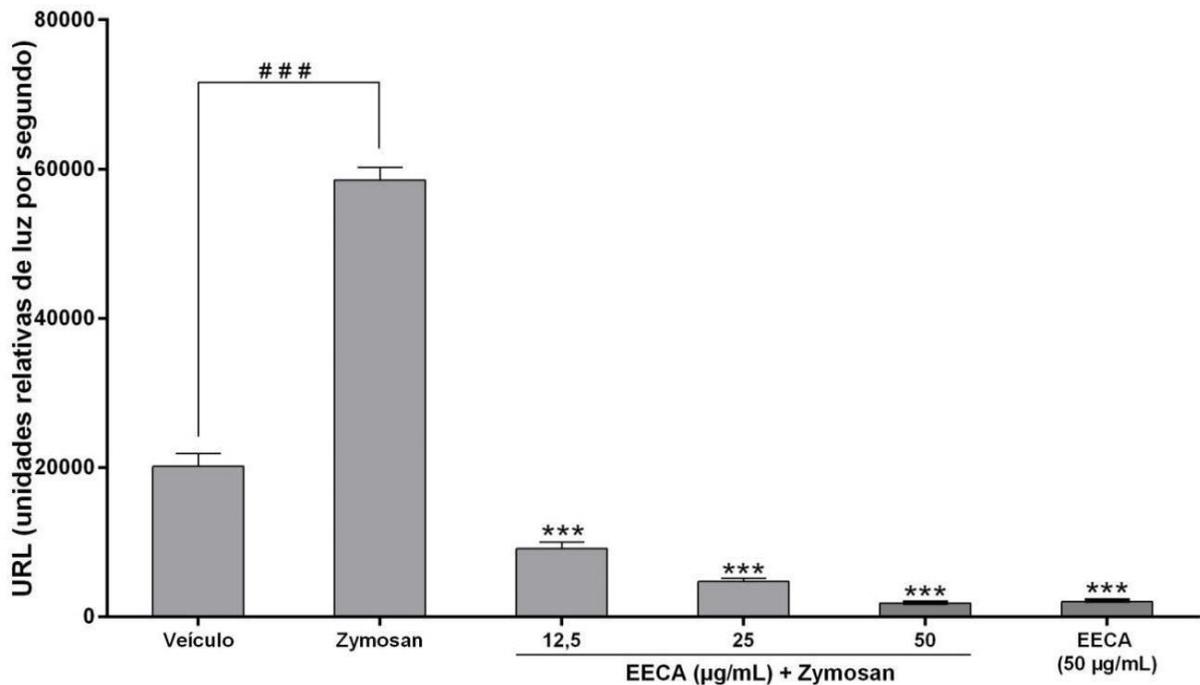
**FIGURA 6.** O efeito da *Cyperus articulatus* L. sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  + LPS (1  $\mu$ g/mL) e zymosan ( $1 \times 10^7$  partículas/30 $\mu$ L). Os dados foram obtidos a partir de pelo menos três experiências independentes e estão resumidos como média  $\pm$  DP. \*\*\*  $P < 0,001$  indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$  e tratada com *Cyperus articulatus* L. #  $P < 0,1$  representa uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$ .

### 5.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por macrófagos peritoneais estimulados por zymosan.

No modelo experimental de avaliação da produção de EROs, os resultados obtidos demonstraram que a *Cyperus articulatus* L. nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu$ g/mL reduz de maneira significativo a produção de EROs em macrófagos peritoneais estimulados por zymosan, de modo que, o índice de produção de EROs nos grupos somente estimulados com zymosan foi maior 500 % em relação aos grupos estimulados e tratados com a *Cyperus articulatus* L. (**FIGURA 7**).

Os resultados demonstram que o zymosan teve um potente efeito indutor de produção de EROs, visto que, na presença desta substância houve um aumento de 250 % em relação ao

grupo veículo, onde os níveis permaneceram em basais. Também podemos destacar que o extrato da *Cyperus articulatus* L. sozinho não promoveu atividade oxidante sobre a linhagem celular testada. O efeito antioxidante da *Cyperus articulatus* L. foi dependente da concentração. Na concentração de 12,5 µg/mL o extrato inibiu a produção de EROs 500 % RLU em relação ao grupo estimulado por zymosan, na concentração de 25 µg/mL, a inibição foi de 750 % e na concentração de 50 µg/mL reduziu 1200 %, conforme demonstrado na FIGURA 7.



**FIGURA 7.** *Cyperus articulatus* L. inibe a produção de EROs em macrófagos peritoneais estimulados por zymosan. Os grupos teste foram pré tratados 1h antes do estímulo zymosan ( $1 \times 10^7$  partículas/30µL) com as concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL de *Cyperus articulatus* L. Os dados foram obtidos a partir de pelo menos três experiências independentes e estão expressos como média  $\pm$  DP. \*\*\*  $P < 0,001$  indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por zymosan e o grupo tratado com *Cyperus articulatus* L. ###  $P < 0,001$  indica uma diferença significativa entre o grupo de controle (meio + 2% de DMSO) e o grupo estimulado por zymosan. RLU: unidades relativas de luz por segundo.

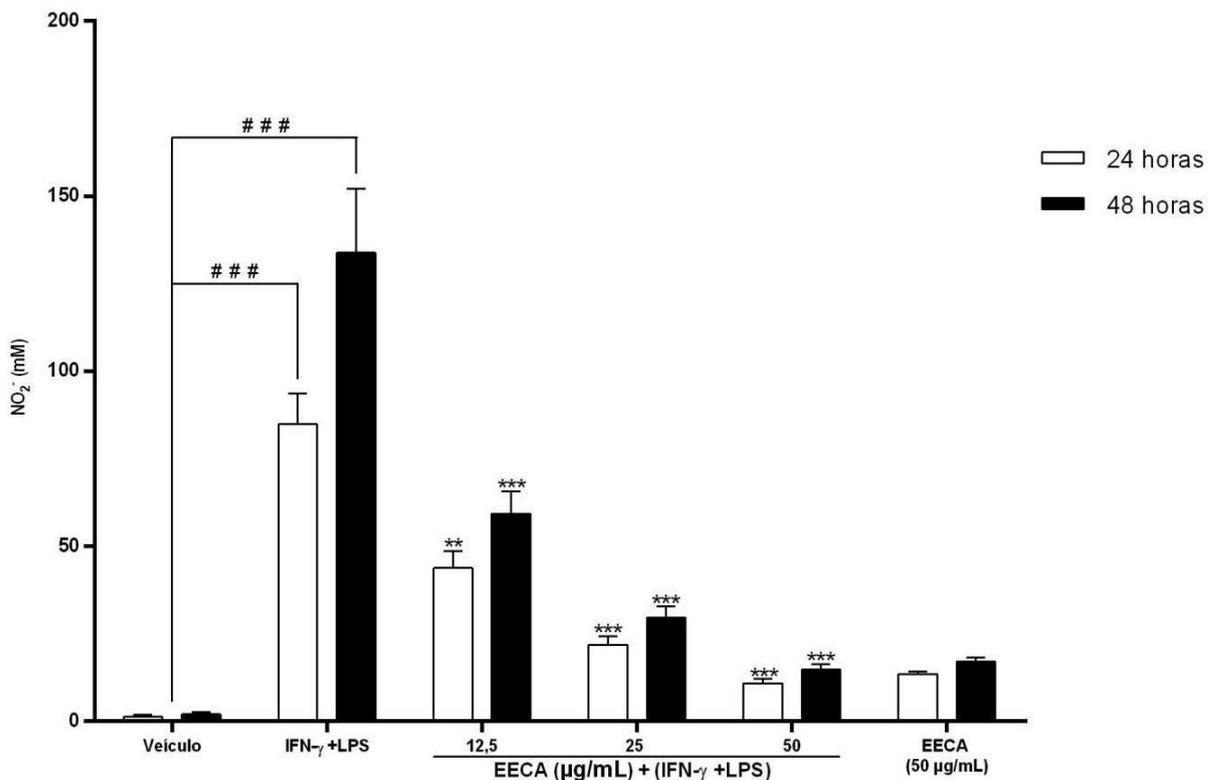
#### 5.4 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais estimulados por LPS+IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  e LPS promoveu um aumento significativo na produção de NO, tanto em 24 h (630 %) como em 48 h (980%) comparado com o grupo controle.

O tratamento com *Cyperus articulatus* L. (12,5, 25 ou 50 µg/mL) reduziu de forma significativa a concentração de nitrito para  $48,3 \pm 4,7$  µM,  $31,8 \pm 4,7$  µM e  $12,8 \pm 3,5$  µM, em 24 h respectivamente. Já no tempo de 48 h o tratamento com *Cyperus articulatus* L. (12,5, 25 ou

50  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu significativamente a produção de nitrito para  $60,7 \pm 5,1 \mu\text{M}$ ,  $38,9 \pm 4,2 \mu\text{M}$  e  $15,8 \pm 4,3 \mu\text{M}$  em relação ao grupo estimulado respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que a *Cyperus articulatus* L. nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  reduz a produção de NO em macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS, de modo que, em 24 horas o índice de produção de NO nos grupos estimulados ultrapassou os 80  $\mu\text{M}$ , enquanto que nos grupos estimulados e tratados com a *Cyperus articulatus* L. os índices de produção de NO se mantiveram basais, não atingindo os 15  $\mu\text{M}$ . Já nos experimentos realizados em 48 horas o índice de produção de NO nos grupos estimulados ultrapassou os 130  $\mu\text{M}$ , enquanto que nos grupos estimulados e tratados com a *Cyperus articulatus* L. os índices de produção de NO se mantiveram basais, não atingindo os 20  $\mu\text{M}$  (FIGURA 8).

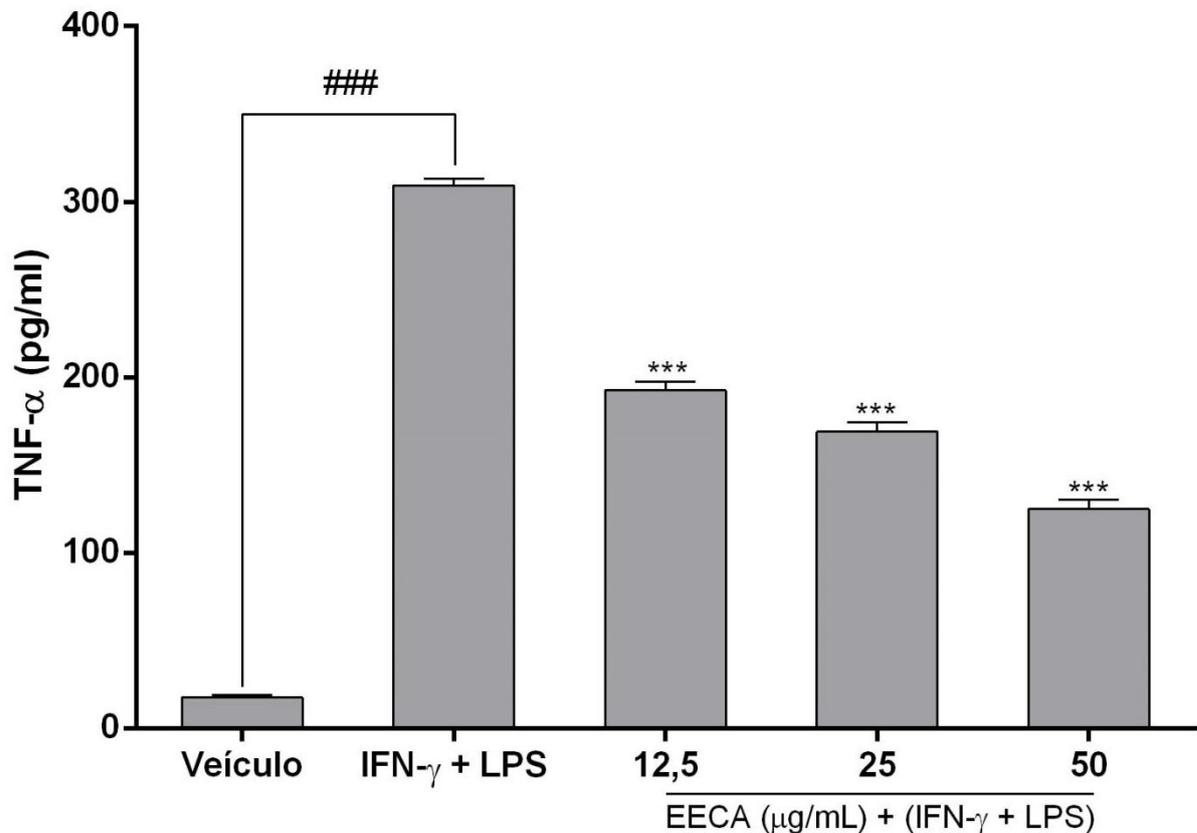


**FIGURA 8.** O efeito de *Cyperus articulatus* L. sobre a produção de nitrito em macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) nos tempos de 24 e 48 horas. Os grupos teste foram pré tratados 1h antes do estímulo IFN- $\gamma$  e LPS com as concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de *Cyperus articulatus* L. Os dados foram obtidos a partir de pelo menos três experiências independentes e estão expressos como média  $\pm$  DP. \*\*\*  $P < 0,001$  indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$  e o grupo tratado com *Cyperus articulatus* L. ####  $P < 0,001$  indica uma diferença significativa entre o grupo de controle (meio + 2% de DMSO) e o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$ .

Os níveis de produção de nitrito são maiores no tempo de 24 h, provavelmente pelo maior tempo em contato com o estímulo e pela redução do efeito da droga teste na amostra.

### 5.5 Avaliação da produção de fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos peritoneais estimulados por LPS+IFN- $\gamma$ .

*Cyperus articulatus* L. promoveu nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  uma diminuição significativa na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos, representando uma redução de 37,7, 45,4 e 59,6 %, respectivamente, das concentrações testadas quando comparadas com o grupo tratado somente com o estímulo. Observamos também que a produção de TNF- $\alpha$  aumentou significativamente comparado com o controle (FIGURA 9).

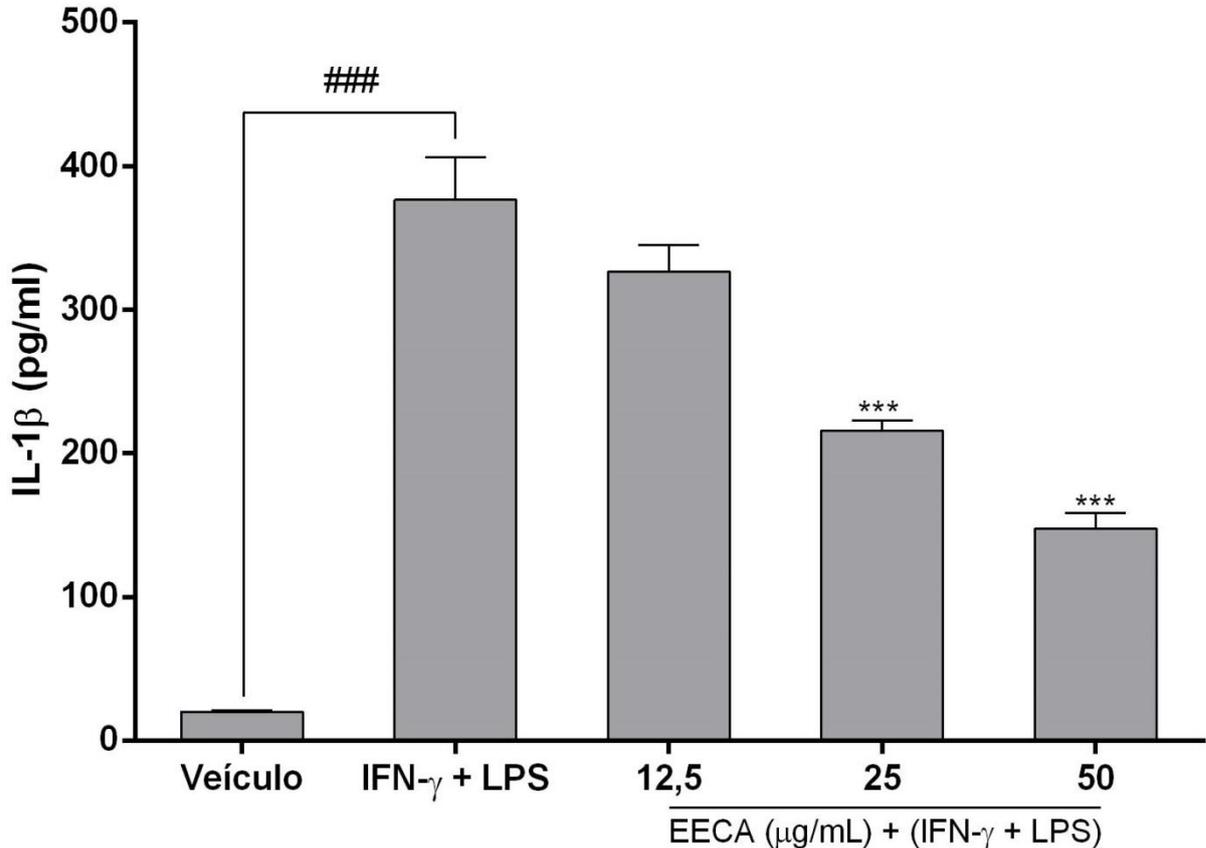


**FIGURA 9.** Efeito da *Cyperus articulatus* L. sobre a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL). Dados representados por média  $\pm$  DP (n=3). \*\*\*p<0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$  e o grupo tratado com *Cyperus articulatus* L. ### P < 0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo de controle negativo e o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$ ; ANOVA One-way, Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

### 5.6 Avaliação da produção de Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) por macrófagos peritoneais estimulados com LPS+IFN- $\gamma$ .

O tratamento com *Cyperus articulatus* L. promoveu nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  uma diminuição significativa na produção de IL-1 $\beta$  em cultura de macrófagos,

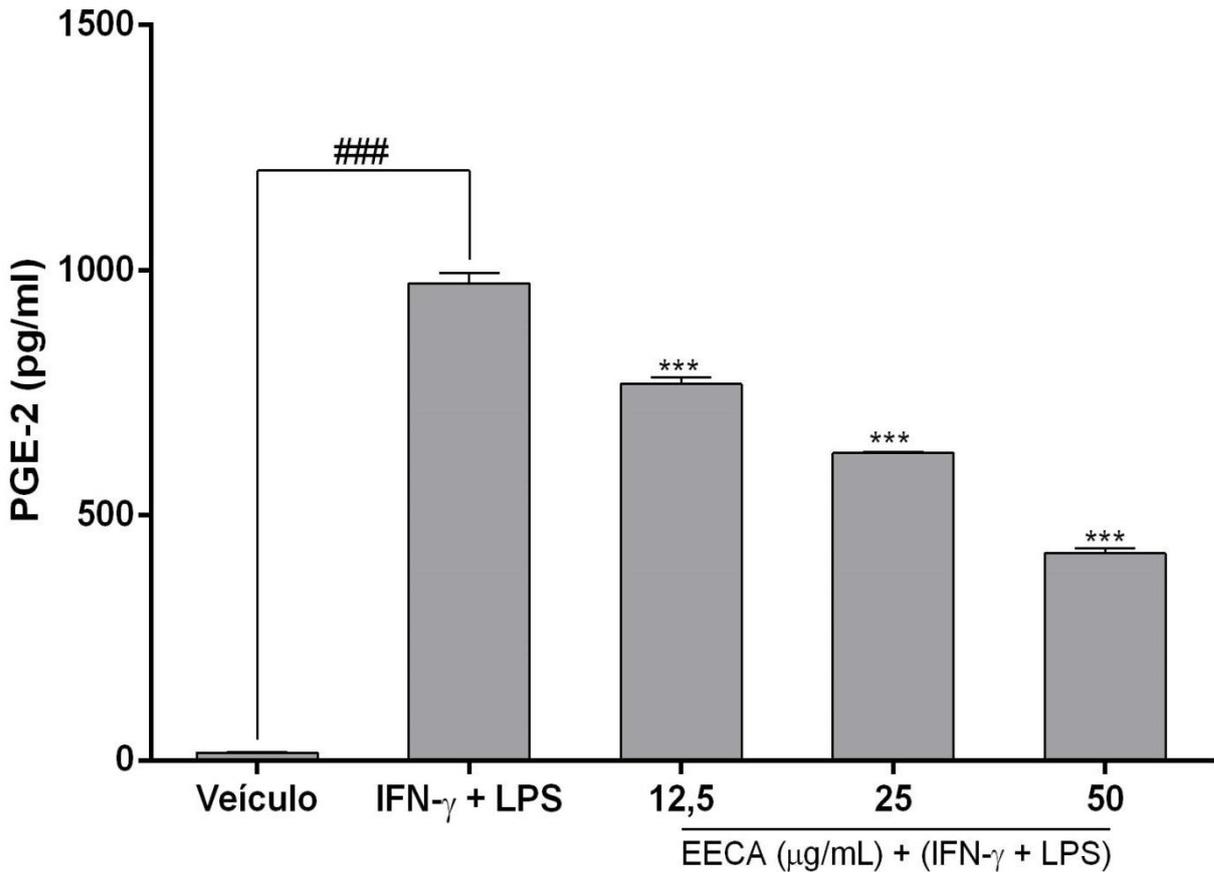
representando uma redução de 13,3, 42,7 e 61 %, respectivamente, das concentrações testadas quando comparadas com o grupo tratado somente com o estímulo. A produção de IL-1 $\beta$  também foi elevada significativamente pelo estímulo, comparado com o grupo controle (FIGURA 10).



**FIGURA 10.** Efeito da *Cyperus articulatus* L. sobre a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- $\gamma$  (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL). Dados representados por média  $\pm$  DP (n=3). \*\*\*p<0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$  e o grupo tratado com *Cyperus articulatus* L. ### P < 0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo de controle negativo e o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$ ; ANOVA One-way, Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

### 5.7 Avaliação da produção de prostaglandina tipo 2 (PGE<sub>2</sub>) por macrófagos murinos estimulados com LPS+IFN- $\gamma$ .

As diferentes concentrações (12,5, 25 e 50  $\mu$ g/mL) da *Cyperus articulatus* L. reduziram de maneira significativa a produção de PGE<sub>2</sub> em cultura de macrófagos, quando comparados com o controle positivo (apenas o grupo estimulado), representando uma redução de 21,1, 35,6 e 56,6%, respectivamente (FIGURA 11). A produção de PGE<sub>2</sub> também foi elevada significativamente pelo estímulo, comparado com o grupo controle.



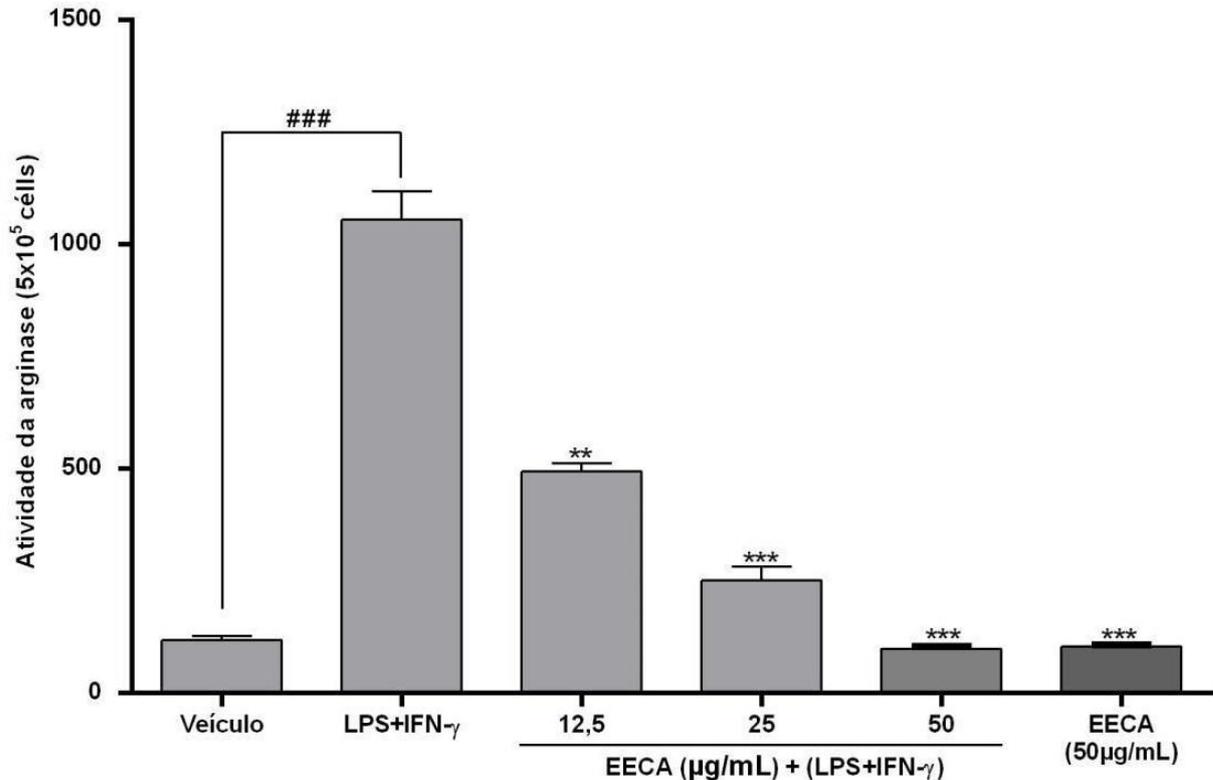
**FIGURA 11.** Efeito da *Cyperus articulatus* L. sobre a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL). Dados representados por média  $\pm$  DP (n=3). \*\*\*p<0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$  e o grupo tratado com *Cyperus articulatus* L. ### P < 0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo de controle negativo e o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$ ; ANOVA One-way, Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

### 5.8 Determinação da atividade da arginase

Os resultados obtidos neste modelo experimental *in vitro* demonstram que o tratamento com *Cyperus articulatus* L. nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu$ g/mL reduz de modo significativo a atividade da arginase em macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS (1  $\mu$ g/mL), de modo que, o índice de atividade da arginase nos grupos estimulados ultrapassou os 1.100 enquanto que nos grupos estimulados e tratados com a *Cyperus articulatus* L. os índices de atividade da arginase se mantiveram basais (**FIGURA 12**).

Observamos também que a *Cyperus articulatus* L. apresentou efeito dependente da concentração sobre a atividade da enzima arginase, nas concentrações maiores 25 e 50  $\mu$ g/mL o *Cyperus articulatus* L. manteve os níveis de atividade da arginase em aproximadamente 250 e 100 respectivamente. Além disso, testamos a *Cyperus articulatus* L. sozinho nessas células

sem estímulo, a fim de determinar se o extrato poderia agir como indutor da atividade desta enzima, o resultado obtido demonstrou que sozinho a *Cyperus articulatus* L. não induz a atividade da enzima, os níveis de atividade da enzima neste grupo ficou em torno de 100, próximo aos níveis basais de atividade desta enzima, não demonstrando diferença significativa em relação ao grupo veículo (**FIGURA 12**).



**FIGURA 12.** O efeito da *Cyperus articulatus* L. sobre a atividade da enzima arginase em macrófagos peritoneais estimulados por IFN- $\gamma$  e LPS (1  $\mu$ g/mL). Atividade de enzima arginase foi avaliada tal como descrito em materiais e métodos. Os grupos teste foram pré tratados 1h antes do estímulo IFN- $\gamma$  e LPS com as concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu$ g/mL da *Cyperus articulatus* L. Os dados foram obtidos a partir de pelo menos três experiências independentes e estão expressos como média  $\pm$  DP. \*\*\*  $P < 0,001$  indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- $\gamma$  e o grupo tratado com *Cyperus articulatus* L.

### 5.9 Determinação da atividade antiproliferativa

Nos resultados da avaliação da atividade antiproliferativa, foi observada uma diferença significativa do tipo celular utilizado e das concentrações da *Cyperus articulatus* L. testadas na proliferação celular ( $F(12, 80) = 1911$ ,  $P < 0,0001$  ANOVA de dois fatores (Concentrações *Cyperus articulatus* L. vs linhagens celulares) com teste de múltiplas comparações de Tukey).

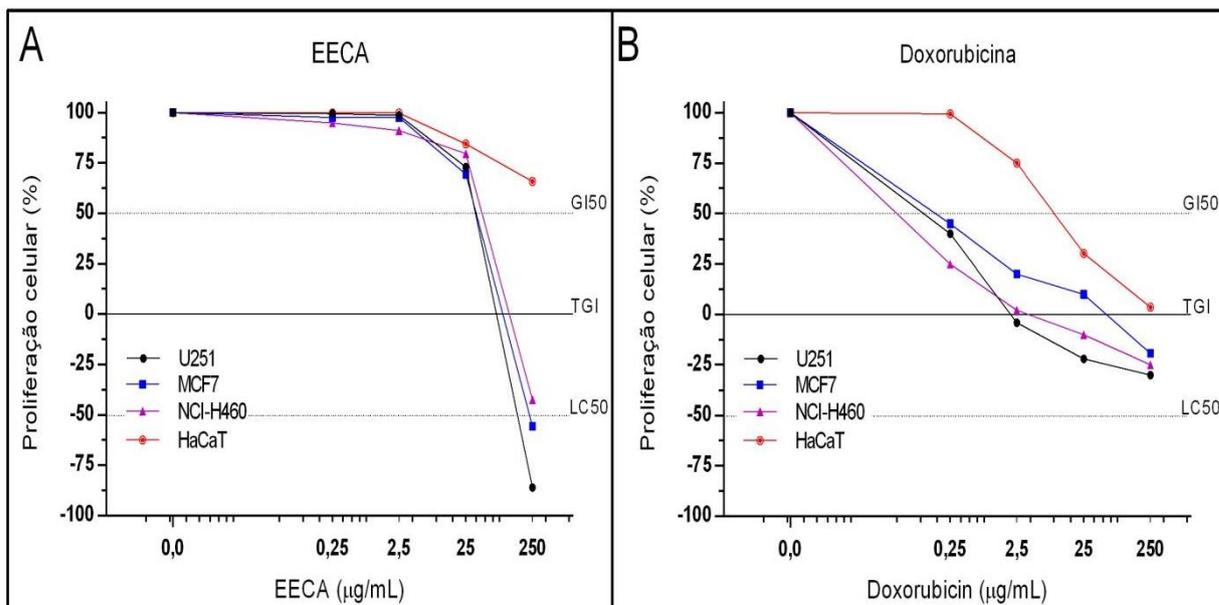
O extrato da *Cyperus articulatus* L. nas concentrações utilizadas mostrou um efeito de redução significativo na proliferação das diferentes linhagens celulares testadas ( $F(4, 80) =$

25995,  $P < 0,0001$ ). Na menor concentração, que corresponde a  $0,001 \mu\text{g/mL}$  da *Cyperus articulatus* L., não houve diferença significativa em relação à inibição da proliferação celular das diferentes cepas. Por sua vez, houve uma redução significativa na proliferação celular nas concentrações  $0,250$  e  $2,5 \mu\text{g/mL}$  da *Cyperus articulatus* L., apenas na linhagem NCI-H460 em relação à linhagem celular saudável HaCat quando expostos à mesma concentração do extrato ( $P < 0,0001$ ).

Nas concentrações mais altas testadas, correspondendo a  $25$  e  $250 \mu\text{g/mL}$  da *Cyperus articulatus* L., houve uma redução significativa na proliferação celular em todas as linhagens testadas (NCI-H460, U251 e MCF7) em relação à linha celular HaCat quando expostas às mesmas concentrações do extrato ( $< 0,0001$ ) (**FIGURA 13**).

O extrato da *Cyperus articulatus* L. em concentrações acima de  $10^2 \mu\text{g/mL}$  inibiram o crescimento celular das células tumorais do glioma U251, mama MCF7 e pulmão NCI-H460 respectivamente. Além disso, o valor da Inibição Total do Crescimento (TGI) na atividade antiproliferativa para o extrato foi de  $62,7 \mu\text{g/mL}$  atuando em células tumorais do glioma U251, para as demais células tumorais como as da mama MCF7 e pulmão NCI-H460, o TGI do extrato etanólico foi de  $100$  e  $135,7 \mu\text{g/mL}$  (**FIGURA 13**).

Os resultados obtidos revelam que a *Cyperus articulatus* L. demonstrou um efeito concentração dependência sobre a proliferação das células tumorais, em comparação com a doxorrubicina, utilizada como controle positivo, observamos que a *Cyperus articulatus* L. demonstrou um efeito inferior nas menores diluições, sendo que os efeitos mais significativos encontrados foram a partir de  $25 \mu\text{g/mL}$ . Na concentração de  $250 \mu\text{g/mL}$  observamos que a *Cyperus articulatus* L. apresentou um potente efeito sobre a proliferação celular das três linhagens celulares tumorais testadas. No teste de citotoxicidade, realizado em concomitância, a *Cyperus articulatus* L. não apresentou efeito tóxico sobre linhagem de células normais.



**FIGURA 13.** (A) Curva de proliferação celular em função da concentração *Cyperus articulatus* L. dissolvidos em DMSO/meio RPMI/FCS a 5%. As concentrações utilizadas foram 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL. (B) Curva de proliferação celular em função da concentração de Doxorubicina. As concentrações utilizadas foram 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL. A concentração eficaz resultando em TGI (inibição total de crescimento, concentração necessária para uma inibição total da proliferação celular) foi calculada por regressão não-linear, tipo sigmoidal, utilizando o software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).

## 6. DISCUSSÃO

O foco do estudo foi o resíduo sólido gerado após o processo de obtenção do óleo essencial dos rizomas da *Cyperus articulatus* L. não foram encontrados na literatura estudos sobre a composição química de extratos obtidos a partir de resíduos sólidos derivados da extração do óleo essencial da *Cyperus articulatus* L., objeto deste estudo. Adicionalmente, realizou-se análise da atividade biológica do extrato do resíduo da *Cyperus articulatus* L. em relação à sua capacidade potencial de intervir na proliferação celular de algumas linhas celulares de câncer, assim como, sua atividade anti-inflamatória e inibição da produção das espécies reativas de oxigênio.

A análise cromatográfica, permitiu a caracterização química do extrato da *Cyperus articulatus* L. da Amazônia brasileira, os resultados deste estudo levaram à identificação das substâncias listadas na **TABELA 1**. A composição encontrada neste estudo demonstrou a presença de algumas substâncias sesquiterpênicas semelhantes às encontradas em outras espécies estudadas, inclusive em outros países (VICTOR; TCHIYAMBA; OTOUNGOU, 2014). Os resultados demonstraram que a substância isocorimbolona é o composto majoritário presente na amostra, seguido pela mustacona e pela substância 7-isopropenil-1,4a-dimetil-

4,4a, 5,6,7,8-hexa - hidro-2(3H)-naftalenona, estas substâncias têm percentagens de composição superiores a 10% do total das substâncias identificadas (**TABELA 1**). Estudos da composição do extrato hexânico da *Cyperus articulatus* L. e de outras espécies de *Cyperus*, coletados na República de Camarões e no Congo, mostraram a presença de corimboneína,  $\alpha$ -corimbolol, mandassidiona, mustacona,  $\alpha$ -ciperona e isopatchoulenona (NYASSE *et al.*, 1988; VICTOR; TCHIYAMBA; OTOUNGOU, 2014). Os resultados obtidos corroboram com esses estudos anteriores referentes a composição química da *Cyperus articulatus* L.

Os Sesquiterpenos constituem uma classe de substâncias encontradas em plantas medicinais e aromáticas, tendo potencial farmacológico devido à sua lipofilicidade e baixo peso molecular (GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012). Essas foram uma das primeiras substâncias derivadas de plantas que foram desenvolvidas para uso clínico como drogas anticâncer, como os alcalóides de vinca vinblastina e vincristina (CRAGG; NEWMAN, 2009). Nos últimos anos, a propriedade anticâncer dos sesquiterpenos tem sido objeto de vários estudos. Diversos trabalhos têm sido conduzidos para caracterizar seus mecanismos moleculares, bem como seu potencial como agentes quimioterápicos e quimiopreventivos (KREUGER *et al.*, 2012).

Identificamos que a corimbolona e a mustacona, dois compostos químicos do grupo dos sesquiterpenos, foram as principais substâncias encontradas. Tem sido demonstrado na literatura que a composição química da *Cyperus articulatus* L. contém substâncias sesquiterpênicas como mustacona e corimbolona, sendo que esta última é a principal substância do extrato da planta (ZOGHBI *et al.*, 2006). A ciperotundona, que foi identificada no extrato da *Cyperus articulatus* L. (ZOGHBI *et al.*, 2006) também foi encontrada na *Cyperus articulatus* L. em proporções relativamente baixas (Tabela 1). Outros estudos descrevem a identificação de ciperotundona no óleo essencial de outras espécies de *Cyperus*, como *Cyperus papyrus* L. (MEKEM SONWA, 2000) e *Cyperus rotundus* L. (MEENA *et al.*, 2010; SONWA; KONING, 2001).

Conforme os resultados demonstram a composição química do resíduo da *Cyperus articulatus* L. é constituída basicamente de sesquiterpenos, semelhante ao óleo essencial, no entanto, os percentuais variam. Na literatura, não existem estudos da composição química do resíduo resultante da extração do óleo essencial para nos basearmos. Os sesquiterpenos são substâncias químicas dotadas de potencial biológico e baixa atividade tóxica (GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Os resultados mostraram que *Cyperus articulatus* L. não apresentou citotoxicidade em concentrações menores ou iguais a 50 µg/mL, e está de acordo com a literatura onde concentrações em torno de 50 µg/mL de extratos herbários aromáticos não mostram ação citotóxica (BUM *et al.*, 2003). O efeito da *Cyperus articulatus* L. na concentração de até 50 µg/mL, além de não apresentar citotoxicidade aos macrófagos peritoneais, surpreendentemente, também apresenta características citoprotetoras, aumentando a porcentagem de viabilidade das células cultivadas, evidenciada pelo aumento da produção de cristais de formazam em macrófagos (**FIGURA 13**). Inferimos que resultado que expressa citoproteção pode estar relacionado à atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, que tem relação com o metabolismo do reagente de Mosman (MOSMANN, 1983).

Outra enzima muito importante fisiologicamente é a arginase, uma enzima diretamente relacionada a proliferação celular, não encontramos na literatura estudos que relatem a influência de qualquer produto da *Cyperus articulatus* L. sobre a atividade desta enzima. Avaliamos o efeito da *Cyperus articulatus* L. na atividade da arginase, sabe-se que essa enzima, além de suas ações fisiológicas, também está relacionada a processos patológicos como o câncer e a inflamação (BUGA *et al.*, 1998). A proliferação celular é um processo mediado pela ação da arginase tipo 2, uma enzima induzível que, quando ativada, catalisa a biossíntese de poliaminas, glutamato, prolina (CORREA; GUTIÉRREZ; LOPERA, 2013). A atividade da enzima arginase sofre uma redução na presença da *Cyperus articulatus* L. nas concentrações testadas, esse resultado corrobora com o teste de proliferação celular de linhagens tumorais, também realizados no presente estudo (**FIGURA 12**). Em nossa pesquisa, usamos linhagens celulares conhecidas que permitiram uma avaliação adequada da ação do extrato da *Cyperus articulatus* L. nessas células. Utilizamos três diferentes linhagens de células tumorais: de glioblastoma (U251), mama (MCF7) e pulmão (NCI-H460) (HOGENESCH; NIKITIN *et al.*, 2012; SCHMIEDER *et al.* 2012).

Segundo Correa; Gutiérrez; Lopera (2013) a presença de arginina, um metabólito produzido pela ação da arginase, está relacionada a alterações no metabolismo do câncer, por pelo menos dois mecanismos que mostram a ação da arginase no processo tumoral. O primeiro mecanismo é a regulação negativa da resposta imune contra o tumor (CORREA; GUTIÉRREZ; LOPERA, 2013; BRONTE *et al.*, 2003), regulando a atividade e diminuindo a proliferação de linfócitos. O segundo mecanismo provável, seria promover o crescimento do tumor, a proliferação celular descontrolada, através da biotransformação da arginina em precursores da poliamina (PERANZONI *et al.*, 2008; BRONTE *et al.*, 2003). Outros estudos

relatam encontrar dois a três vezes maiores níveis de poliamina em tecidos de câncer de mama em comparação com tecidos saudáveis (SCHMIEDER *et al.* 2012; ZEA *et al.*, 2005;).

Os fármacos utilizados na quimioterapia são capazes de induzir a citotoxicidade nas células tumorais por diversos mecanismos, atuando principalmente na sinalização celular (HOSHINO *et al.*, 1989). Atualmente, existe uma grande necessidade de procurar novas drogas antineoplásicas com a capacidade de realizar citotoxicidade seletiva em células cancerígenas com baixa toxicidade em células saudáveis (HOGENESCH; NIKITIN *et al.*, 2012; CHAUDHARY *et al.*, 2014).

Dando continuidade a avaliação da atividade antiproliferativa o extrato do resíduo da *Cyperus articulatus* L. foi testado contra linhagens tumorais humanas. Em concentrações superiores a 102 µg/mL o extrato inibiu o crescimento celular de células tumorais de glioblastoma (U251), adenocarcinoma de mama (MCF7) e carcinoma de pulmão, carcinoma do pulmão (NCI-H460), sem apresentar toxicidade às células saudáveis (HaCat). Entretanto, nas células tumorais do glioblastoma (U251), a atividade antiproliferativa foi maior com o valor de TGI de 62,7 µg/mL.

Ressaltamos que em pesquisas na literatura, não foram encontradas outros estudos que realizassem a avaliação da atividade antiproliferativa de células tumorais humanas com qualquer produto derivado da *Cyperus articulatus* L., no entanto, outros autores realizaram experimentos semelhantes com espécies do mesmo gênero, em sua pesquisa Mazzio e Soliman (2009), demonstraram que o extrato etanólico de rizomas da *Cyperus rotundus* apresentou atividade anticancerígena moderada em células Neuro-2a (LC50 = 2.528 a 4.939 mg/mL calculada a partir de morte celular dependente da concentração) (MEENA *et al.*, 2010).

Riva *et al.* (2012) testaram o extrato etanólico de tubérculos de *S. allagophylla* contra oito linhagens celulares tumorais, encontrando resultados de atividade antiproliferativa reduzida, exceto pela linhagem de células K-562 (leucemia), cujo crescimento foi completamente inibido com a concentração de TGI 5,13 µg/mL. Em resumo, os principais compostos identificados no extrato da *Cyperus articulatus* L. pertencem ao grupo sesquiterpenos (por exemplo, isocorimbolona e Mustacona) e demonstraram atividade antiproliferativa significativa contra as linhagens de células tumorais testadas (**FIGURA 13**).

Conforme demonstrado na **FIGURA 13**, o extrato nas concentrações testadas demonstrou influência significativa sobre a proliferação das células tumorais humanas, exercendo toxicidade diretamente sobre essas células, no entanto, nas mesmas condições e

concentrações testadas não foi observada essa citotoxicidade sobre as células HaCat, sendo assim, este resultado está de acordo com os dados obtidos no ensaio de citotoxicidade.

Outro dado relevante relacionado ao extrato foi a determinação da atividade antioxidante, por meio da mensuração dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio, houve aumento da produção de ROS pela ativação com zimosan, as concentrações testadas do extrato conseguiram reverter o aumento dos ROS, evidenciando que o tratamento com *Cyperus articulatus* L. inibiu a produção de ROS por macrófagos (**FIGURA 7**). Portanto, diante dos resultados obtidos neste trabalho podemos inferir que a *Cyperus articulatus* L. possui potencial atividade antioxidante, intervindo na cascata bioquímica do metabolismo intermediário, o que leva à produção de ROS, impedindo os efeitos inflamatórios e oxidativos exercidos por esses mediadores, com diversos efeitos importantes sobre o organismo, tanto patológicos quanto fisiológicos.

Os radicais livres são substâncias que possuem elétrons desemparelhados, por isso, são muito instáveis e quimicamente reativos, podendo reagir com algumas biomoléculas. Como exemplos de radicais livres podemos citar: (1) os derivados do oxigênio molecular ( $O_2$ ), as espécies reativas de oxigênio; (2) o radical hidroxila e o (3) óxido nítrico (NO) (HALLIWELL, 2007). Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar as reações de oxidação e estão relacionados a propagação da resposta inflamatória (JARDINI, 2010). Não foram encontrados na literatura trabalhos que demonstrassem a atividade antioxidante da *Cyperus articulatus* L. No entanto, outras pesquisas avaliaram o efeito antioxidante de outras espécies do gênero *Cyperus articulatus* L., em seu trabalho Livi, (2015) avaliou a atividade antioxidante do óleo essencial das folhas e tubérculos da *Cyperus rotundus* e demonstrou que apresenta baixa atividade antioxidante. Outras 3 espécies da *Cyperus*: *Cyperus luzulae*, *Cyperus diffusus* e *Cyperus odoratus* também foram testadas, os resultados apontaram efeito antioxidante para todas as espécies (VELÁSQUEZ; GARCÍA, 2012).

Sabe-se que macrófagos ativados produzem e secretam NO,  $PGE_2$  e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e interleucinas, como a IL-1 $\beta$ . Mediadores pró-inflamatórios, como NO e  $PGE_2$ , são produtos dos metabolismos das enzimas iNOS e COX-2, respectivamente. iNOS é uma enzima que catalisa a produção de NO a partir de L-arginina. A produção exacerbada destes mediadores pode resultar em consequências deletérias na patogênese de muitas doenças inflamatórias, como choque séptico e artrite reumatoide (Zamora *et al.*, 2000).

Demonstramos que o extrato da *Cyperus articulatus* L. inibiu a produção de nitrito, que é um metabólito do NO (**FIGURA 8**). Assim, pode-se inferir que um dos mecanismos de ação dos compostos presentes no extrato da *Cyperus articulatus* L. seria bloquear a produção de um importante mediador do processo oxidativo e inflamatório, o óxido nítrico. Mais estudos são necessários para examinar se o efeito sobre o sistema nitrérgico está associado à atividade da enzima iNOS ou à inibição da expressão da proteína iNOS.

O NO é um mediador inflamatório que também é reconhecido por seu potencial oxidante. O NO é citotóxico, vasodilatador e modula reações inflamatórias (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). O NO também pode ser responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica, como no caso de tumores (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Em seu trabalho Ferreira (2018) testou *in vitro* a atividade do óleo essencial da *Cyperus articulatus* L. sobre a produção de NO, seus resultados apontam potente atividade inibitória da produção de NO por macrófagos estimulados. Jung *et al.* (2013) testaram *in vitro*, a atividade de  $\alpha$ -Cyperone, isolado dos rizomas da *Cyperus rotundus*, que impediu a maior produção de NO, mesmo quando os macrófagos foram expostos a estimulação por LPS.

Outra importante classe de mediadores inflamatórios são as prostaglandinas, na inflamação, ocorre à ampliação da produção deste mediador inflamatório, processo crucial para a hiperalgesia. A ciclo-oxigenase (COX), também denominada de prostaglandina H2 sintetase é a enzima que catalisa os dois primeiros passos na biossíntese de prostaglandinas. A COX-1 é encontrada em muitos tecidos incluindo o estômago e fígado. A COX-2 é responsável pelo aumento da produção de prostaglandinas no sítio de ação (JUNG *et al.*, 2013; MURI, 2009). Demonstramos que o extrato da *Cyperus articulatus* L. reduziu significativamente a produção da PGE<sub>2</sub> em macrófagos estimulados (**FIGURA 11**). No entanto, seu mecanismo de não foi possível determinar, mas, podemos inferir que seu efeito pode estar relacionado ao bloqueio da atividade da enzima COX-2 ou bloqueando em algum ponto a via de sinalização celular que leva a expressão da proteína COX-2, impedindo dessa forma a produção e liberação de PGE<sub>2</sub>.

Algumas substâncias presentes em plantas medicinais tem comprovado efeito inibitório sobre a produção das prostaglandinas, atuando na via metabólica de sua biossíntese, podemos citar o flavonoide rutina, encontrado na *Alpinia zerumbet*, que age na bioquímica da via do ácido araquidônico, impedindo a síntese de prostaglandinas por inibição da prostaglandina sintetase e da ciclooxigenase (GUARDIA, 2001). Trabalhos anteriores revelam que sesquiterpenos semelhantes aos encontrados no extrato da *Cyperus articulatus*

L. são capazes de impedir o aumento da produção das prostaglandinas, atuando diretamente no controle da inflamação. Como o  $\alpha$ -Cyperone, isolado dos rizomas da *Cyperus rotundus*, que inibiu a produção de PGE<sub>2</sub> (JUNG *et al.*, 2013; PUGH; SAMBO, 1988).

O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER; CERAMI, 1989). Produzida principalmente por macrófagos ativados, tem numerosas funções biológicas, incluindo necrose hemorrágica de tumores transplantados, citotoxicidade, papel importante no choque endotóxico e em respostas inflamatórias, imunorreguladoras e proliferativas (TARTAGLIA; GOEDDEL, 1992). Não há na literatura pesquisas publicadas que revelem a atividade do extrato de *Cyperus articulatus* L. sobre a produção de TNF- $\alpha$  em estudos *in vivo* ou *in vitro*. Jung *et al.* (2013) testaram substâncias isoladas dos rizomas da *Cyperus rotundus*, resultando na redução da produção de TNF- $\alpha$ . SHIN *et al.* (2015) também testaram componentes químicos da *Cyperus rotundus* e caracterizou os efeitos anti-inflamatórios da espécie.

Avaliamos *in vitro* a atividade do extrato da *Cyperus articulatus* L. sobre a produção do TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados, conforme demonstra a **FIGURA 9**, houve uma redução concentração dependente da produção desta citocina na presença do extrato, provavelmente em decorrência da ação de algum dos sesquiterpenos que compõem o mesmo. Resultado similar foi encontrado por SEO *et al.* (2016) que em sua pesquisa demonstraram que o sesquiterpeno isocyperol, isolado dos rizomas da *Cyperus rotundus*, é capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que quando liberada no tecido leva a estimulação da síntese de prostaglandinas induzindo a hiperalgisia inflamatória, sendo classificada como importante marcador da ativação das vias inflamatórias (ARALDI, 2012). Neste trabalho, avaliamos também *in vitro* a atividade do extrato da *Cyperus articulatus* L. sobre a produção do IL-1 $\beta$  por macrófagos estimulados, conforme demonstra a **FIGURA 10** e observamos que houve também uma redução concentração dependente da produção desta citocina na presença do extrato. Em sua pesquisa, Ferreira (2018) obteve resultados que comprovam a atividade inibitória do óleo essencial da *Cyperus articulatus* L. na produção da IL-1 $\beta$  por macrófagos RAW 264.7.

Os resultados demonstraram uma ação inibitória na atividade dos macrófagos e, conseqüentemente, na redução da produção e liberação dos mediadores inflamatórios avaliados. Assim, esses dados corroboram com a hipótese de que a *Cyperus articulatus* L. tem

uma ação específica sobre a via pró-inflamatória e, portanto, pode modular o processo inflamatório. Os dados obtidos também evidenciam que os compostos químicos presentes no resíduo resultante da extração do óleo essencial da *Cyperus articulatus* L. são capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas humanas. Estudos adicionais são necessários para esclarecer qual componente químico presente no *Cyperus articulatus* L. é responsável por essas atividades biológicas, e qual é o mecanismo molecular de ação exercido por esses princípios ativos, ou se esta atividade potente é observada devido à ação sinérgica dos metabólitos secundários presentes na *Cyperus articulatus* L.

## 7. CONCLUSÃO

A caracterização química evidenciou majoritariamente a presença de compostos sesquiterpênicos.

*Cyperus articulatus* L. não apresentou citotoxicidade celular sobre linhagens de macrófagos e em células normais humanas.

Em modelos de inflamação *in vitro*, o extrato inibiu a produção de nitrito, metabólito do óxido nítrico. Bem como, também constatamos redução da produção de outros importantes mediadores inflamatórios, como: de Interleucina 1- $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e prostaglandinas tipo 2.

Na avaliação antioxidante, *Cyperus articulatus* L. reduziu significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio.

No que tange a atividade a atividade antiproliferativa, o extrato nas concentrações aqui testadas além de inibir a maior atividade da enzima arginase também conseguiu conter a proliferação de células tumorais humanas.

Diante dos resultados aqui elencados, este trabalho evidencia o efeito farmacológico do extrato resultante do resíduo sólido produzido durante a extração do óleo essencial da planta *Cyperus articulatus* L. e ainda contribui para a fundamentação de seu uso na medicina popular.

Considerando a produção industrial crescente dos produtos cosméticos com base no óleo essencial da planta *Cyperus articulatus* L. como incremento de sua produção em larga escala e maior geração de resíduos sólidos decorrentes do processo de extração deste óleo

essencial, o aproveitamento do resíduo se faz necessário, se apresentando como uma alternativa na busca de produtos naturais com potencial farmacológico, embora sejam necessários estudos mais aprofundados para caracterizar o mecanismo de ação farmacológico do extrato.

## 8. REFERÊNCIAS:

ABELLA, V.; SCOTECE, M.; CONDE, J.; PINO, J.; GONZALEZ-GAY, M.A.; GOMEZ-REINO, J.J.; MERA, A.; LAGO, F.; GÓMEZ, R.; GUALILLO, O. **Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders**. *Rheumatology*, 2017.

ALAJMI, M. F.; ALAM, P. **Anti-inflammatory activity and qualitative analyses of different extracts of *Maytenus obscura* (RICH) by high performance thin layer chromatography method**. *Asian Pac. Journal Tropical Biomedical*, 4(2): 152-157, 2014.

ALBUQUERQUE, U.D.; LUCENA, R.D.; CUNHA, L.V.F.C. **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica**, Livro Rápido/NUPEEA, Recife, p. 19, 2004.

ALLAVENA, P.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; MANTOVANI, A. **Chemokines in câncer related inflammation**. *Exp. Cell Reseach*. 317, 664–673, 2011.

ALLEY, E.W.; MURPHY, W.J.; RUSSELL, S.W. **Classical enhancer element responsive to both lipopolysaccharide and interferon and interferon-  $\gamma$  augments induction of the iNOS gene in mouse macrophages**. *Gene*, 158, 247-25, 1995.

ANDRADE, M.A.; BRAGA, M.A.; CESAR, P.H.; TRENTO, M.V.C.; ESPÓSITO, M.A.; SILVA, L.F.; MARCUSSI, S. **Anticancer properties of essential oils: an overview**. *Current cancer drug targets*, 18(10), pp.957-966, 2018.

ARALDI, D. **O papel da interleucina-1'beta' produzida no gânglio da raiz dorsal no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória**. 79 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2012.

BANDEIRA-MELO, C.; PAIVA, L.A.; AMORIM, N.R.; WELLER, P.F. & BOZZA, P.T. **EicosaCell: An Imaging-Based Assay to Identify Spatiotemporal Eicosanoid Synthesis.** *Signal Transduction Immunohistochemistry*. *Methods and Protocols*, 127-141, 2017.

BARATA-ANTUNES, S.; CRISTÓVÃO, A. C.; PIRES, J.; ROCHA, S. M.; BERNARDINO, L. **Dual role of histamine on microglia-induced neurodegeneration**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1863, n. 3, p. 764-769, 2017.

BELTRAN, B.; NOS, P.; DASÍ, F.; IBORRA, M.; BASTIDA, G.; MARTÍNEZ, M. PONCE, J. **Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in**

**immune cells of naive and treated Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 1, p. 78-86, 2009.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. **The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response.** Annual Review of Immunology 7, 625–655, 1989.

BRABCOVÁ, E.; KOLESÁR, L.; THORBURN, E.; STRIZ, I. **Chemokines induced in human respiratory epithelial cells by IL-1 family of cytokines.** Folia Biol. (Praha) 60, 180–186, 2014.

BRONTE, V.; SERAFINI, P.; MAZZONI, A.; SEGAL, D. M.; ZANOVELLO, P. **L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions.** Trends in immunology, 24(6), 301-305, 2003.

BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; SERHAN, C.N. **Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation.** Immunity, 40:315–27. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.009, 2014.

BUGA, G. M.; SINGH, R. A. J. A. N.; PERVIN, S. H. E. H. L. A.; ROGERS, N. E.; SCHMITZ, D. A.; JENKINSON, C. P.; IGNARRO, L. J. **Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxyarginine during high output NO production,** Am. J. Physiol. p.11, 1998.

BUM, E. N.; RAKOTONIRINA, A.; RAKOTONIRINA, S. V.; HERRLING, P. **Effects of *Cyperus articulatus* compared to effects of anticonvulsant compounds on the cortical wedge.** Journal of Ethnopharmacology, 87, p. 28, 27-34, 2003.

CASANOVA, L. M.; COSTA S. S. **Interação sinérgica em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios.** Revista virtual de química. 2017.

CASTELLANI, D.C.; DOMENICO, C.I.; RONCOLETTA, L.M.A.; SILVA, A.C.; TOZAKI, R.M.; OLIVEIRA, D.H. **Technical coefficients of propiolic production (*Cyperus articulatus* L.) in organic system at the region of Belém (PA).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 13(SPE), pp.606-611, 2011.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. **Óxido nítrico: revisão.** Acta Cirúrgica Brasileira, p. 417-423, 2002.

CHAUDHARY, B.; KHALED, Y. S.; AMMORI, B. J.; & ELKORD, E. **Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(2), 81-99, 2014.

CHEN, D.; PAN, D.; TANG, S.; TAN, Z.; ZHANG, Y.; FU, Y.; LÜ, G.; HUANG, Q. **Administration of chlorogenic acid alleviates spinal cord injury via TLR4/NF- $\kappa$ B and p38 signaling pathway anti-inflammatory activity.** *Molecular medicine reports*, 17(1), pp.1340-1346, 2018.

CHUA, M. L.; WEE, J. T.; HUI, E. P.; CHAN, A. T. **Nasopharyngeal carcinoma.** *Lancet*. **387 (10022): 1012–24.** doi:10.1016/S0140-6736(15)00055-0, 2016.

CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; & MODOLELL, M. **Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod.** *Journal of Immunological Methods*. 174, 231–5, 1994.

CORREA, J. M. I.; GUTIÉRREZ, C. M. V.; LOPERA, M. M. V. **Arginina y cáncer: implicaciones en la regulación de la respuesta antitumoral.** *Iatreia*, 27(1), 63-72, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Nature: a vital source of leads for anticancer drug development.** *Phytochem Rev.* 8 (2):313–331, 2009.

DAVIDSE, G.; SOUSA, S.M.; CHATER, A.O.; LARSEN, K. **Flora Mesoamericana 6- Alismataceae a Cyperaceae.** *Nordic Journal of Botany*, 15(5), 512-512. 1995.

DE LA CRUZ, M.G.; MALPARTIDA, S.B.; SANTIAGO, H.B.; JULLIAN, V.; BOURDY, G. **Hot and cold: medicinal plant uses in QueChua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú).** *J. Ethnopharmacol.* 155:1093–1117. , 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.042>.

DE OLIVEIRA, C.R.; MENEZES, A.C.S.; DE MORAES, M.O.; DE MELO VIEIRA, L.; PEREIRA, A.G.; LIMA, R.S.; DOS SANTOS, M.L. **Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART).** *Revista Ciência Química e Farmácia*, 41(2): 133-142, 2012.

DEWNJEE, S.; DUA, T. K. SAHU R. **Potential of anti-inflammatory effect of *Leea macrophylla* Roxb. Leaves: A wild edible plant.** *Food Them toxicol.* 59; 514-520. doi: 10.1111/sji.12524, 2013. doi:[10.1038/nrrheum.2016.209](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.209) Published online 5 Jan 2013.

DUNCAN, B.B.; CHOR, D.; AQUINO, E.M.; BENSENOR, I.M.; MILL, J.G.; SCHMIDT, M.I.; LOTUFO, P.A.; VIGO, Á. AND BARRETO, S.M. **Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Prioridade para enfrentamento e investigação.** *Revista de saúde pública*, v. 46, p.126-134, 2012.

DVASH, E.; HAR-TAL, M.; BARAK, S.; MEIR, O.; RUBINSTEIN, M. **Leukotriene C4 is the major trigger of stress-induced oxidative DNA damage.** *Nat Commun* 6:10112, 2015.

ELMASTAS, M.C.S.; ABOUL-ENEINA, H.Y. **Antioxidant Capacity and Determination of Total Phenolic Compounds in Daisy (*Matricaria chamomilla*, Fam. *Asteraceae*).** *World Journal of Analytical Chemistry*, 3(1A), 9-14, (2015).

ELY, M. R.; ROMERO, S. A.; SIECK, D. C.; MANGUM, J. E.; LUTTRELL, M. J.; HALLIWILL, J. R. **A single dose of histamine-receptor antagonists prior to downhill running alters markers of muscle damage and delayed onset muscle soreness.** *J. Appl. Physiol*, 2016.

EVERETT, J. R. **Academic drug discovery: current status and prospects.** *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 10, n. 9, p. 937-944, 2015.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B. **Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 256(3):405-17, 2011.

FANG, W.; BI, D.; ZHENG, R.; CAI, N.; XU, H.; ZHOU, R.; XU, X. **Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264. 7 macrophages.** *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1663, 2017.

FERREIRA, J.C.C. **Avaliação in vitro da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Cyperus articulatus* L.** Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de pós-graduação em biociências, Santarém, PA, 2018.

FORERO-DORIA, O.; ASTUDILLO, L.; CASTRO, R. I.; LOZANO, R.; DIAZ, O.; GUZMAN-JOFRE, L.; GUTIERREZ, M. **Antioxidant activity of bioactive extracts**

**obtained from rhizomes of *Cyperus digitatus* Roxb.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 13(4) 344-350, 2014.

FORMISANO, C.; DELFINE, S.; OLIVIERO, F.; TENORE, G. C.; RIGANO, D.; SENATORE, F. **Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy).** Industrial Crops and Products, Volume 63, January. 63, 256-263, 2015.

GHOLIPOUR, S.; SEWELL, R.D.; LORIGOOINI, Z.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. **Medicinal plants and atherosclerosis: A review on molecular aspects.** Current pharmaceutical design, 24(26), pp.3123-3131, 2018.

GOLAN, D.; JUNIOR, T.; ARMEN, H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. **Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity.** Current medicinal chemistry, 19(31), 5319-5341, 2012.

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

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, inflammation, and cancer.** Cell, 140(6):883–99, 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. **Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout.** In: Brunton L.; Chabner B.; Knollman B. Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 12. ed. cap. 34, 2011.

GU, R.; WANG, Y.; LONG, B.; KENNELLY, E.; WU, S.; LIU, B.; LI, P.; LONG, C. **Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches.** Bio. Pharm. Bull. 37, 903-915, 2014.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. **Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat.** *Il farmaco*, 56(9), pp.683-687, 2001.

GUOYA, W.U.; MORRIS, S.M. **Arginine metabolismo: nitric oxide and beyond.** *Biochemical Journal*, v. 336, n1, p. 1-17, 1998.

GUPTA, S. K.; BHATT, P.; JOSEPH, G. S.; NEGI, P. S.; VARADARAJ, M. C. **Phenolic constituents and biological activities of leaf extracts of traditional medicinal plant *Plectranthus amboinicus* Benth (Lamiaceae).** *TANG. Humanitas Medicine*, 3(4), 32.1-32.6, 2013.

HALLIWELL, B. **Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? British.** *Journal of Clinical Pharmacology*. V. 75, n. 3, p. 637-644. 2007.

HALLIWELL, R. E. W.; & GILBERT, S. **Allergy testing revisited. Advances in Veterinary Dermatology**, 7, 305-312, 2013.

HALLIWILL, J. R.; BUCK, T. M.; LACEWELL, A. N.; & ROMERO, S. A. **Postexercise hypotension and sustained postexercise vasodilatation: what happens after we exercise?** *Exp. Physiol.* 98:7–18, 2013.

HAMEISTER, R.; DHEEN, S.T.; LOHMANN, C.H.; KAUR, C.; SINGH, G. **Macrophage activation and hypoxia-associated factors in osteoarthritis and aseptic loosening. In Orthopaedic Proceedings** (Vol. 100, No. SUPP\_4, pp. 83-83). The British Editorial Society of Bone; Joint Surgery, 2018.

HANAHAN, D.; WINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell*, v.144, n. 5, p.646-674, 2011.

HEADLAND, S. E.; NORLING L. V. **The resolution of inflammation: Principles and challegens.** *Seminars in imunology*, v. 27, n. 3, p. 149-160, 2015.

HEBA, D. H.; NAGLAA, M. N.; ABDELAATY, A. S.; FAIZA, M. H.; EL-SAYED A. A.; MAHMOUD A. S. **Diversidade Química dos Óleos Essenciais de *Cyperus articulatus*, *Cyperus esculentus* e *Cyperus papyrus*.** *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2014.

HOGENESCH, H.; NIKITIN, A. Y. **Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models.** Journal of controlled release, 164(2), 183-186. 2012.

HOSHINO, T.; NAGASHIMA, T.; CHO, K. G.; DAVIS, R. L.; DONEGAN, J.; SLUSARZ, M.; WILSON, C. B. **Variability in the proliferative potential of human gliomas.** Journal of neuro-oncology, 7(2), 137-143, 1989.

HSU, S.W; CHANG, T.C; WU, Y.K; LIN, K.T; SHI, L.S. AND LEE, S.Y. **Rhodiola crenulata extract counteracts the effect of hypobaric hypoxia in rat heart via redirection of the nitric oxide and arginase 1 pathway.** BMC Complementary and Alternative Medicine. 17:29, 2017. doi 10.1186/s12906-016-1524-z.

HUA, K. F.; CHOU, J. C.; LAM, Y.; TASI, Y. L.; CHEN, A.; KA, S. M.; CHIU, Y. C. **Polyenylpyrrole derivatives inhibit NLRP3 inflammasome activation and inflammatory mediator expression by reducing reactive oxygen species production and mitogen-activated protein kinase activation.** PloS one, v. 8, n. 10, p. e76754, 2013.

HUANG, C.C.; LIN, K.J.; CHENG, Y.W.; HSU, C.A.; YANG, S.S.; HYUR, L.F. **Hepatoprotective effect and mechanistic insights of deoxyelephantopin, a phytosesquiterpene lactone, against fulminant hepatitis.** The Journal of Nutritional Biochemistry. Doi: ISSN 09552863, 10.1016, 2012.

INCA. **Controle do câncer de mama: histórico das ações.** s/d. Disponível: . Acesso: 16 de junho de 2018

JARDINI, F.A. **Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Púnica granatum* L.) avaliação in vivo e em culturas de células.** Tese (doutorado). Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas – São Paulo, 2010.

JUNG, S.H.; KIM, S.J.; JUN, B.G.; LEE, K.T.; HONG, S.P.; OH, M.S.; JANG, D.S.; CHOI, J.H.  **$\alpha$ -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF $\kappa$ B signalling in RAW 264.7 cells.** Journal of ethnopharmacology, 147(1), pp.208-214, 2013.

KHOYRATTY, T.E.; UDALOVA, I.A. **Diverse mechanisms of IRF5 action in inflammatory responses.** The international journal of biochemistry; cell biology, 99, pp.38-42, 2018.

KO, E.Y.; NILE, S.H.; JUNG, Y.S.; KEUM, Y.S. **Antioxidant and antiplatelet potential of different methanol fractions and flavonols extracted from onion (*Allium cepa* L.).** 3 Biotech, 8(3), p.155, 2018.

KRANZ, L. M.; DIKEN, M.; HAAS, H.; KREITER, S.; LOQUAI, C.; REUTER, K. C.; GRUNWITZ, C. **Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defense for cancer immunotherapy.** Nature, v. 534, n. 7607, p. 396-401, 2016.

KREUGER, M.R.O.; GROOTJANS, S.; BIAVATTI, M.W.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. **Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide.** Anti-Cancer Drugs, 1-14, 2012.

KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, S.K.; DAROKAR, M.P.; GARG, A.; KHANUJA, S.P. **Cytotoxic activities of xanthochymol and isoxanthochymol substantiated by LC-MS/MS.** Planta Med, 73(14): 1452-6, 2014.

LAWAL, O.A.; OGUNWANDE, I.A.; OPOKU, A.R.; OYEDEJI, A.O. **Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from the rhizomes of *Cyperus papyrus* L. grown in South Africa.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 15 (3), 2016.

LIVI, A. **Atividade antioxidante do óleo essencial das folhas e tubérculos da tiririca (*Cyperus rotundus*).** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. **In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives,** 23(3), 385-398, 2009.

MEENA AK, YADAV AK, NIRANJAN US, SINGH B, NAGARIYA AK, VERMA M. **Review on *Cyperus rotundus*-A potential herb.** International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. Jan;2(1):20-2, 2010.

MEKEM SONWA, M. **Isolation and structure elucidation of essential oil constituents: comparative study of the oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus* and *Cyperus rotundus*.** 2000.

MELERO, I.; GAUDERNACK, G.; GERRITSEN, W.; HUBER, C.; PARMIANI, G.; SCHOLL, S.; MELLSTEDT, H. **Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials.** Nat Rev Clin Oncol, v. 11, n. 9, p. 509-524, 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; GRAY-GOODRICH, M. **Feasibility of a high-flux anticancer drug screen utilizing a diverse panel of human tumor cell lines in culture.** J. Nat. Cancer Inst. 83:757-766, 1991.

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Methods, 65, 55, 1983.

MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M.; METSAVAHT, L. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their local pharmacology.** Acta Fisiatr. v. 16, n.4, p. 186-190, 2009.

NAKAMURA, M.; SHIMIZU, T. **Leukotriene receptors.** Chem. Rev. 111, 6231–6298, 2011. doi: 10.1021/cr100392s

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014.** Journal of Natural Products, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.** J Nat Prod 75:311–335, 2012.

NÓBREGA DE ALMEIDA, R.; AGRA, M.D.F.; NEGROMONTE SOUTO MAIOR, F.; DE SOUSA, D.P. **Essential oils and their constituents: anticonvulsivant activity.** Molecules, v.16, p. 2726-2742, 2011.

NORTHCOTT, J. M.; DEAN, I. S.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. **Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression.** Frontiers in cell and developmental biology, 6, 17, 2018.

NYASSE, B.; GHOGOMU, R.; SONDEGAM, T. B.; MARTIN, M. T.; & BODO, B. **Mandassidione and other sesquiterpenic ketones from *Cyperus articulatus*.** Phytochemistry, 27(10), 3319-3321, 1988.

OLIVEIRA, S.G.D.; DE MOURA, F.R.R.; DEMARCO, F.F.; DA SILVA NASCENTE, P.; DEL PINO, F.A.B.; LUND, R.G. **An ethnomedicinal survey on phytotherapy with**

**professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System.** *Journal of Ethnopharmacology*. 140: 428-437, 2012.

PAN, Z. K.; ZURAW, B. L.; LUNG, C. C.; PROSSNITZ, E. R.; BROWNING, D. D.; YE, R. D. **Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts.** *The Journal of clinical investigation*, 98(9), 2042-2049, 1996.

PARADKAR, P. H.; MISHRA, L. S.; JOSHI, J. V.; DANDEKAR, S. P.; VAIDYA, R. A.; VAIDYA, A. B. **In vitro macrophage activation: A technique for screening anti-inflammatory, immunomodulatory and anticancer activity of phytomolecules.** *Indian journal of experimental biology*. Vol. 55, March 2017, p. 131-141. 2017.

PENOW J.; JUNG, C. **Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal?** *Cardiovasc Res*. 98(3):334–43, 2013.

PERANZONI, E.; MARIGO, I.; DOLCETTI, L.; UGEL, S.; SONDA, N.; TASCHIN, E.; ZANOVELLO, P. **Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology.** *Immunobiology*, 212(9-10), 795-812, 2008.

PETERSON, L. J.; FLOOD, P. M. **Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease.** *Mediators of inflammation*, p. 401264, 2012.

PIMM, S.L.; JENKINS, C.N.; ABELL, R.; BROOKS, T.M.; GITTLEMAN, J.L.; JOPPA, L.N.; RAVEN, P.H.; ROBERTS, C.M.; SEXTON, J.O. **The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection.** *Science* 344, 987-996, 2014.

PINHEIRO, P.F.; COSTA, A.V.; ALVES, T.D.A.; GALTER, I.N.; PINHEIRO, C.A.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.M.R.; FONTES, M.M.P. **Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays.** *J. Agric. Food Chem*, 63(41), 8981–8990, 2015.

POTIGUARA, R.C.D.V.P. *Priprioca: um recurso aromático do Pará*. MPEG: UEPA. 2008.

PUGH, W.J.; SAMBO, K. **Prostaglandin synthetase inhibitors in feverfew.** *Journal of pharmacy and pharmacology*, 40(10), pp.743-745, 1988.

RAKOTONIRINA, V.S.; BUM, E.N.; RAKOTONIRINA, A.; BOPELET, M. **Sedatives properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus***. *Fitoterapia*, 72, 22–29, 2001.

RAMANAN, M.; PILLI, V.S.; ARADHYAM, G.K.; DOBLE, M. **Transcriptional regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 by the proto-oncogene, c-myc, in the pathogenesis of inflammation and cancer**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482.4: 556-562, 2017.

RAMÍREZ-ATEHORTÚA, A.M.; MORALES-AGUDELO, L.; OSORIO, E.; LARAGUZMÁN, O.J. **The Traditional Medicinal Plants *Cuphea calophylla*, *Tibouchina kingii*, and *Pseudelephantopus spiralis* Attenuate Inflammatory and Oxidative Mediators**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

RHEE, S. G.; CHANG, T. S.; JEONG, W.; KANG, D. **Métodos para a detecção e medição do peróxido de hidrogênio no interior e exterior das células**. *Células Mol*, 29: 593-549, 2010.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. É. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. D.; SALVADOR, M. J. **Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa**. *Química Nova*, 2012.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **Traditional medicines: Global Situation, issues and challenges**. Geneva, p. 1-12, 2011.

RODRIGUEZ, P. C.; OCHOA, A. C.; AL-KHAMI, A. A. **Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity**. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 93, 2017.

SACRAMENTO, L.A.; DA COSTA, J.L.; DE LIMA, M.H.; SAMPAIO, P.A.; ALMEIDA, R.P.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S.; CARREGARO, V. **Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Process Development during *Leishmania infantum* Infection**. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.

SCHMIEDER, A.; MICHEL, J.; SCHÖNHAAR, K.; GOERDT, S.; SCHLEDZEWSKI, K. **Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages**. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 22, No. 4, pp. 289-297). Academic Press. 2012.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines and phytotherapy. In: Schulz V, Hänsel R, Blumenthal M, Tyler VE (eds) **Rational phytotherapy: a reference guide for physicians and pharmacists**, 5th edn. Springer, Berlin, 2013.

SEO, Y.J.; JEONG, M.; LEE, K.T.; JANG, D.S.; CHOI, J.H. **Isocyperol, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced inflammatory responses via suppression of the NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways and ROS stress in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** International immunopharmacology, 38, pp.61-69, 2016.

SEVINSKY, R.E.; STEWART, D.W.; HARIRFOROOSH, S. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Is there a link between cardiovascular and renal adverse effects?** Journal of Integrative Nephrology and Andrology, v. 4, n. 1, p. 1, 2017.

SHIN, J.S.; HONG, Y.; LEE, H.H.; RYU, B.; CHO, Y.W.; KIM, N.J.; JANG, D.S.; LEE, K.T. **Fulgidic Acid isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus* suppresses LPS-Induced iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 expression by AP-1 inactivation in RAW264. 7 macrophages.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, 38(7), pp.1081-1086, 2015.

SINGH, M.; PADHY, G.; VATS, P.; BHARGAVA, K.; SETHY, N.K. **Hypobaric hypoxia induced arginase expression limits nitric oxide availability and signaling in rodent heart.** Biochim Biophys Acta. 1840(6):1817–24, 2014.

SINGH, R.K.; GUPTA, S.; DASTIDAR, S.; RAY, A. **Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics.** Pharmacology, 85, 336–349, 2010.

SINN, H.; KREIPE, H. **A brief overview of the WHO classification of the breast tumor, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition.** Breast Care, v. 8, p. 149-154, 2013.

SONWA, M.M.; KÖNIG, W.A.; Wilfried A. **Chemical study of the essential oil of *Cyperus rotundus*.** Phytochemistry, v. 58, n. 5, p. 799-810, 2001.

SOUSA, G.F.; DUARTE, L.P.; ALCÂNTARA, A.F.; SILVA, G.D.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, R.R.; OLIVEIRA, D.M.; TAKAHASHI, J.A. **New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations.** Molecules, 17(11): 1349-1356, 2012.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern recognition receptors and inflammation**. *Cell*, 140:805–820, 2010.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDDEL, D.V. **Two TNF receptors**. *Immunology today*, 13(5), pp.151-153, 1992.

TEGELER, C.; O'SULLIVAN, J.L.; BUCHOLTZ, N.; GOLDECK, D.; PAWELEC, G.; STEINHAGEN-THIESSEN, E.; DEMUTH, I. **The inflammatory markers CRP, IL-6, and IL-10 are associated with cognitive function—data from the Berlin Aging Study II**. *Neurobiology of aging*, 38, pp.112-117, 2016.

THURMOND, R. L.; VENABLE, J.; SAVALL, B.; LA, D.; SNOOK, S.; DUNFORD, P. J.; EDWARDS, J. P. **Clinical Development of Histamine H<sub>4</sub> Receptor Antagonists**. Springer, p. 301-320. 2017.

TOLOZA, L.B.; MARTÍNEZ, H. AND PATIÑO, O.B. **Hematoma intraparenquimatoso del sistema nervioso central asociado con dasatinib en el tratamiento de leucemia mieloide crónica en fase acelerada. Presentación de dos casos y revisión de la literatura**. *Revista Colombiana de Cancerología*, 22(4), pp.151-156, 2018.

TORRE, L. A.; SIEGEL, R. L.; JEMAL, A. **Lung cancer statistics**. In *Lung cancer and personalized medicine* (pp. 1-19). Springer, Cham 2016.

TREHANPATI, N.; VYAS, A. K. **Immune regulation by T regulatory cells in HBV related Inflammation and cancer**. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 85, n. 3. 2017.

VARAS-LORENZO, C.; RIERA-GUARDIA, N.; CALINGAERT, B.; CASTELLSAGUE, J.; SALVO, F.; NICOTRA, F.; STURKENBOOM, M.; PEREZ-GUTTHANN, S. **Myocardial infarction and individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs meta-analysis of observational studies**. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 22:559-7, 2013.

VELÁSQUEZ, H.; GARCÍA, P.G. **Evaluación fotoquímica y de actividad antioxidante de los rizomas de tres especies del género *Cyperus***. *Momentos de Ciencia*, v. 9, n. 1, 2012.

VICTOR, N. G.; TCHIYAMBA, P. L.; OTOUNGOU, F. V. F. **Composition of the essential oils of three *Cyperus* species from Congo**. *African Journal of Plant Science*, 8(11), 473-481, 2014.

WENZEL, P.; KOSSMANN, S.; MUENZEL, T.; DAIBER, A. **Redox regulation of cardiovascular inflammation-immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species.** Free Radical Biology and Medicine, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.027>.

YANG, Z.; MARSHALL, J.S. **Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation.** Immunobiology, v. 214, n. 4, p. 321-330, 2009.

YAU, W.P.; GOH, C.H.; KOH, H.L. **Quality control and quality assurance of phytochemicals: Key considerations, methods, and analytical challenges.** Phytotherapies: efficacy, safety, and regulation, v. 18, 2015.

ZAMORA, R.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T.R. **Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases.** Molecular Medicine 6, 347–373, 2000.

ZEA, A. H.; RODRIGUEZ, P. C.; ATKINS, M. B.; HERNANDEZ, C.; SIGNORETTI, S.; ZABALETA, J.; MIER, J. **Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion.** Cancer research, 65(8), 3044-3048. 2005.

ZENG, M.; MAO, X. H.; LI, J. X.; TONG, W. D.; WANG, B.; ZHANG, Y. J.; LU, D. S. **Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.** Lancet. 386(10002):1457–64, 2015. doi:10.1016/S0140-6736(15)60310-5.

ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. **Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy.** Frontiers in Immunology, v. 8, 2017.

ZOGHBI, M.D.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L.M.M.; GUILHON, G.M.S. **Yield and chemical composition of the essential oil of the stems and rhizomes of *Cyperus articulatus* L. cultivated in the state of Pará, Brazil.** Journal of Essential Oil Research, 18: 10-12, 2006.

**ANEXO 1**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA  
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Farmacologia de produtos naturais da Amazônia”, protocolado sob o numero Nº 07004/2013, utilizando 120 (cento e vinte) camundongos isogênicos e 88 (oitenta e oito) ratos isogênicos, sob a responsabilidade do professor Dr. **Waldiney Pires Moraes**, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.



Santarém, 19 de dezembro de 2013.

*Antonio F. M. M. Moraes*  
**PRESIDENTE CEUA - UFOPA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA**

*Antonio D. Moraes*  
 Antonio D. Moraes  
 Professor/UFOPA  
 SIAPE: 1043993

CEUA/UFOPA Instituída pela portaria nº 15 de 11 de janeiro de 2013 e credenciada junto ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Deferimento publicado no Diário oficial da União Nº 187, 26 de setembro de 2013. CIAEP: 01.0065.2013

ANEXO 2



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico intitulado “ATIVIDADE ANTINOCEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Cyperus articulatus* L. (PRIPRIOCA), EM MODELO EXPERIMENTAL DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS IN VIVO” de autoria de Julyanne de Avila Ferreira; Éden Bruno Sousa da Silva; Maxwell Barbosa de Santana, foi apresentado em forma de banner durante o II SEMINÁRIO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS DA UFOPA, realizado nos dias 21, 22 e 23 de fevereiro de 2018 na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

Santarém, 24 de fevereiro de 2018

**Guilherme Augusto Barros Conde**  
Coordenador do PPG-Biociências

**Sergio de Melo**  
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e  
Inovação Tecnológica

**Jaíne Gabriela da Silva Rodrigues**  
Representante da Comissão Científica do  
Evento/Discente

Para verificar a autenticidade deste documento acesse <http://www.ufopa.edu.br/certificados/> informando o código de verificação **2768f12ce260b5cc3b31ebbc6702701**

# 47<sup>o</sup> BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS

# CERTIFICATE

We certify that the work Pharmacological activity extract ethanolic cyperus articulatus var. Nodosus., authorship of Silva EBS, Machado IR, Barata LES, Arévalo MR, Silva AS, Vieira LQ, Castro W, Ruiz ALTG, Torre AD, Castro KCF, Moraes WP, was presented as poster at the 47th Annual Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), held in Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil, from September 28 to October 01, 2015.



MARIA CRISTINA W. DE AVELLAR  
PRESIDENT SBFTE



28/09-01/10/2015

Emerging challenges in drug discovery and therapy

Águas de Lindoia SP - Brazil



We certify that the poster PT. 10012: "INDUSTRIAL RESIDUE OF *Cyperes articulatus* L. (CYPERACEAE) RHIZOMES AS A SOURCE OF ANTIPROLIFERATIVE COMPOUNDS" by *Silva EBS, Barata ES, Vieira LQ, Castro KCF, Almeida JS, Sartoratto A, Barato LC, Moraes WP, de Santana MB, Pires Moraes TM*, was presented at the 50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), held in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, from September 25 to 28, 2018.

  
André S. Pupo  
Congress President



Centro de Convenções  
de Ribeirão Preto, SP

September  
**25-28**  
**2018**



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico intitulado “RESÍDUO INDUSTRIAL DOS RIZOMAS DE *Cyperes articulatus* L. (CYPERACEAE) COMO FONTE DE COMPOSTOS ANTIPROLIFERATIVOS” de autoria de “Éden Bruno Sousa da Silva; Maxwell Barbosa de Santana.”, foi apresentado na modalidade oral durante o II SEMINÁRIO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS DA UFOPA, realizado nos dias 21, 22 e 23 de fevereiro de 2018 na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

Santarém, 24 de fevereiro de 2018

**Guilherme Augusto Barros Conde**  
Coordenador do PPG-Biociências

**Sergio de Melo**  
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e  
Inovação Tecnológica

**Jaíne Gabriela da Silva Rodrigues**  
Representante da Comissão Científica do  
Evento/Discente

Para verificar a autenticidade deste documento acesse <http://www.ufopa.edu.br/certificados/> informando o código de verificação 060a9ea8c7f5f96292888e6c7f70fe5

Elsevier Editorial System(tm) for  
Phytomedicine  
Manuscript Draft

Manuscript Number: PHYMED-D-16-01058

Title: Pharmacological activity of the ethanol extract of *Cyperus articulatus* L.

Article Type: Original Article

Section/Category: Inflammation

Keywords: *Cyperus articulatus* L., antioxidante, anticâncer, terpenes, inflammation.

Corresponding Author: Mr. Éden Bruno Silva, Jr.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

First Author: Éden Bruno Silva, Graduate

Order of Authors: Éden Bruno Silva, Graduate; Inês R Machado, Doctor; Lauro E Barata, Doctor; Michelly R Arévalo, Doctor; Amanda S Silva, Graduate; Leda Q Vieira, Doctor; Waldionê Castro, Doctor; Ana L Ruiz, Doctor; Adriana D Torre, Master; Kelly C Castro, Doctor; Adilson Sartoratto, Doctor; Waldiney P Moraes, Doctor

Abstract: Background: Priprioca (*Cyperus articulatus* L.) is a medicinal plant Cyperaceae family traditionally used against inflammation. Studies conducted with the essential oil of this species have identified many terpene compounds. However, little is known about the possible uses of solid waste generated by extraction of the essential oil. Purpose: This study aimed to investigate the chemical composition and evaluate the anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of the ethanolic extract of solid waste generated by extraction of essential oil from *C. articulatus* L. on in vitro experimental models of peritoneal macrophages from mice and human tumor cell lines. Study design: Evaluation of anti-inflammatory effect, antioxidant and anti-cancer of the ethanol extract of *Cyperus articulatus* L. in experimental models in vitro of peritoneal macrophages of mice and human tumor cell lines. Methods: The chemical composition analysis indicated the presence of monoterpenes, sesquiterpenes and particularly sesquiterpenic ketones as major constituents. Results: The results demonstrated that treatment with ethanolic extract of *C. articulatus* L. (EECA) decreases production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide, activity of the arginase enzyme and proliferation of cancer cells. EECA also showed no cytotoxicity in macrophages at concentrations between 50 and 25 mg/ml. Conclusion: The results indicated that EECA exerts a potent antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activity, inhibiting inflammatory mediators in vitro experimental models.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

- S586a Silva, Éden Bruno Sousa da  
Avaliação da atividade, anti-inflamatória e antiproliferativa do extrato etanólico de *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) / Éden Bruno Sousa da Silva. - Santarém : UFOPA, 2019.  
75 f. : il.  
Inclui bibliografias.
- Orientador: Maxwell Barbosa da Santana.  
Co-orientador: Waldiney Pires Moraes.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. *Cyperus articulatus*. 2. Anti-inflamatório. 3. Câncer. 4. Antioxidante. I. Santana, Maxwell Barbosa da, Orient. II. Moraes, Waldiney Pires, Co-orient. III. Título.

CDD: 23 ed. 615.535

---