



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



BEATRIZ GODOY MARTINS MOREIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE FRAÇÕES DO EXTRATO
n-BUTANÓLICO DO TUBÉRCULO CARÁ-MOELA (*Dioscorea
bulbifera*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
CITOTÓXICA.**

Dissertação de Mestrado

Pato Branco, 2021.

BEATRIZ GODOY MARTINS MOREIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE FRAÇÕES DO EXTRATO
n-BUTANÓLICO DO TUBÉRCULO CARÁ-MOELA (*Dioscorea bulbifera*) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTÓXICA.**

**Phytochemical study of fractions of the *n*-butanolic extract
of cará-moela tuber (*Dioscorea bulbifera*) and evaluation of antitumor and
cytotoxic activity.**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Dr. Edimir Andrade Pereira.
Coorientadora: Dra. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Atribuição – Uso Não Comercial (CC BY-NC) - Permite que outros remixem, adaptem e criem obras derivadas sobre a obra licenciada, sendo vedado o uso com fins comerciais. As novas obras devem conter menção ao autor nos créditos e também não podem ser usadas com fins comerciais. Porém as obras derivadas não precisam ser licenciadas sob os mesmos termos desta licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco



BEATRIZ GODOY MARTINS MOREIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE FRAÇÕES DO EXTRATO N-BUTANÓLICO DO TUBÉRCULO CARÁ-MOELA
(DIOSCOREA BULBIFERA) E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAIS E CITOTÓXICA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 30 de Agosto de 2021

Prof. Edimir Andrade Pereira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Sirlei Dias Teixeira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Rodrigo Hinojosa Valdez, Doutorado - Instituto Federal do Paraná

Prof.a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

RESUMO

A biodiversidade do planeta é imensa e pode ser observada em todos os ambientes, está relacionada à quantidade de animais, plantas e micro-organismos de uma área, incluindo-se também aspectos de diversidade genética entre os organismos, e portanto, tem um enorme potencial, quanto à exploração medicinal no desenvolvimento da indústria farmacêutica. Contudo, um grande entrave existente é a insuficiência de informações científicas que correlacionem, por exemplo para uma dada espécie vegetal, a atividade biológica e a sua constituição química, de forma a garantir a eficácia e segurança da utilização de uma planta. A *Dioscorea bulbifera* é uma planta alimentícia nativa da Ásia e África, mas está presente em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, se desenvolvendo facilmente em diversas regiões do Brasil. Estudos recentes apontam uma diversidade de atividades biológicas exercidas pelo tubérculo cará-moela (*D. bulbifera*), tais como, ação imunomoduladora, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. Os medicamentos utilizados na atualidade para o tratamento do câncer são pouco seletivos, sendo tóxicos para as células tumorais e células normais, causando uma série de efeitos colaterais aos pacientes em tratamento. Com isso, surge a expectativa em encontrar substâncias provenientes de plantas com potencial ação antitumoral e que não sejam tóxicas à células saudáveis. O objetivo do presente estudo é estudar fitoquimicamente as frações obtidas do extrato *n*-butanólico da *D. bulbifera* e investigar a atividade antitumoral *in vitro* frente à células leucêmicas e a citotoxicidade em células renais. Inicialmente os tubérculos liofilizados foram submetidos à extração a frio com etanol 75%. Uma vez obtido o extrato, o mesmo foi particionado sucessivamente com os solventes clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol e água, em ordem crescente de polaridade, visando a pré-purificação. O extrato *n*-butanólico foi fracionado por coluna de sílica flash dando origem a 11 frações denominadas de F1 a F11. As frações F5, F6, F7 e F8 foram purificadas através de diferentes técnicas cromatográficas, dando origem a 16 compostos que foram submetidas a análise de RMN ¹H em espectrômetro Bruker Avance III, 500 MHz, utilizando DMSO deuterado como solvente. Os espectros obtidos foram avaliados e seus dados correlacionados com os dados da literatura de compostos isolados anteriormente da *D. bulbifera*. Por meio dessa comparação, foi possível propor a estrutura da diobulbinona A, diosbulbina I, diosbulbina J, diosbulbiol B e um composto aromático *para*-substituído. A atividade antitumoral *in vitro* das frações obtidas foi avaliada frente às células leucêmicas Raji e Jurkat, bem como a citotoxicidade contra as linhagens celulares renais Vero e LLC-MK₂. As frações F3, F4 e F10 apresentaram bons resultados frente a linhagem celular Jurkat com valores de CI₅₀ inferiores a 100 µg mL⁻¹. Já as subfrações F8S2-1 e F8S2-2 apresentaram excelentes resultados com valores de CI₅₀ de 0,0133 e 21,2332 µg mL⁻¹ respectivamente. No que se refere a linhagem celular Raji, as frações F5, F6, F7, F8 e F11 apresentaram bons resultados, já a subfração F8S2-2 apresentou um excelente resultado, com valor de CI₅₀ de 0,3700 µg mL⁻¹. Dentre elas a F7 apresentou altos índices de Seletividade (IS) para as linhagens celulares Raji e Jurkat quando avaliado frente as duas linhagens renais (Vero e LLC-MK₂). No que se refere às células Raji, as amostras F5, F6, F7 apresentaram valores de IS notavelmente elevados. A fração F8 se mostra bastante promissora, pois apresentou alto rendimento e deu origem a duas subfrações com excelente resultados antitumorais. Com a continuidade dos estudos com a *D. bulbifera*, espera-se uma

possível aplicação de constituintes da planta em fármacos que poderão atuar de forma seletiva no combate ao câncer.

Palavras-chave: Produtos Naturais; Fitoquímica; Atividades Biológicas; Metabólitos Secundários.

ABSTRACT

The planet's biodiversity is immense and can be observed in all environments, it is related to the amount of animals, plants and microorganisms in an area, including aspects of genetic diversity among organisms, and therefore has enormous potential, regarding medicinal exploration in the development of the pharmaceutical industry. However, a major obstacle is the lack of scientific information that correlates, for example, for a given plant species, the biological activity and its chemical constitution, in order to guarantee the efficiency and safety of the use of a plant. *Dioscorea bulbifera* is a food plant native to Asia and Africa, but it is present in tropical and subtropical regions around the world, developing easily in several regions of Brazil. Recent studies point to a diversity of biological activities exerted by the tubercle cará-moela (*D. bulbifera*), such as immunomodulating, antioxidant, anti-inflammatory and antitumor action. The drugs currently used to treat cancer are poorly selective, being toxic to tumor cells and normal cells, causing a series of side effects to patients undergoing treatment. With this, there is the expectation of finding substances from plants with potential antitumor action and that are not toxic to healthy cells. The aim of the present study is to study phytochemically the fractions obtained from the *n*-butanolic extract of *D. bulbifera* and to investigate the *in vitro* antitumor activity against leukemic cells and the cytotoxicity in renal cells. Initially, the lyophilized tubers were subjected to cold extraction with 75% ethanol. Once the extract was obtained, it was successively partitioned with the solvents chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol and water, in increasing order of polarity, aiming at pre-purification. The *n*-butanolic extract was fractionated by a silica flash column giving rise to 11 fractions called F1 to F11. Fractions F5, F6, F7 and F8 were purified through different chromatographic techniques, giving rise to 16 compounds that were submitted to ¹H NMR analysis in a Bruker Avance III 500 MHz spectrometer, using deuterated DMSO as solvent. The spectra obtained were evaluated and their data correlated with literature data on compounds previously isolated from *D. bulbifera*. Through this comparison, it was possible to propose the structure of diobulbinone A, diosbulbin I, diosbulbin J, diosbulbinol B and a para-substituted aromatic compound. The *in vitro* antitumor activity of the obtained fractions was evaluated against Raji and Jurkat leukemic cells, as well as cytotoxicity against Vero and LLC-MK₂ renal cell lines. Fractions F3, F4 and F10 showed good results against the Jurkat cell line with IC₅₀ values below 100 µg mL⁻¹. The F8S2-1 and F8S2-2 subfractions have excellent results with IC₅₀ values of 0.0133 and 21.2332 µg mL⁻¹. With regard to the Raji cell line, the F5, F6, F7, F8 and F11 fractions showed good results, while the F8S2-2 subfraction showed an excellent result, with an IC₅₀ value of 0.3700 µg mL⁻¹. Among them, the F7 showed high Selectivity Index (SI) for the Raji and Jurkat strains when evaluated against the two renal strains (Vero and LLC-MK₂). With respect to Raji cells, samples F5, F6, F7 had remarkably high IS values. Fraction F8 is very promising, as it presented high yield and gave rise to two subfractions with excellent antitumor results. With the continuity of studies with *D. bulbifera*, a possible application of the plant's constituents in drugs that can act selectively in the fight against cancer is expected.

Key words: Natural products; Phytochemistry; Biological Activities; Secondary metabolites.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por ser minha esperança e direção em tempos tão difíceis.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira e Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira que não mediram esforços em me orientar, auxiliar, ensinar e apoiar. E que em todas as circunstâncias permaneceram ao meu lado, me dando forças, incentivo, segurança e sempre buscando alternativas e soluções para desafios encontrados ao longo do caminho. Vocês foram mais que professores e orientadores realizando um trabalho de excelência, vocês são exemplos de profissionais e seres humanos a serem seguidos.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Sol Brasseco, à Profa. Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi, ao Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez, Mariana e Karina pela parceria e disponibilidade em realizar análises importantes para esse trabalho e por disporem da infraestrutura de suas universidades. São pessoas como vocês que tornam possível a realização de projetos em universidades menores como a que faço parte.

Agradeço aos meus pais Dulcineia e Eduardo por terem me presenteado quando criança com um jogo chamado alquimia, foi através dele que nasceu no meu coração um sonho de ser cientista. Obrigada por sempre lutarem pela minha educação e abdicarem dos seus próprios sonhos e desejos para que os meus sonhos e desejos pudessem se tornar realidade.

Agradeço as minhas irmãs Bianca e Maria Clara por todo carinho, amizade e apoio, vocês são pessoas incríveis e inspiradoras.

Agradeço ao meu esposo Jaziel que escolheu me amar e se permitiu ser amado por mim. Obrigada porque quando nem eu achei que seria possível ir para outro estado estudar você me mostrou que era. Sou muito grata pela família que temos hoje e pelo parceiro e amigo que você é pra mim.

As minhas amigas Mariane, Cleidiane e Kamyla por estarem presentes durante todo esse percurso, por serem conselheiras e apoiadoras fieis. Sou muito grata por ter encontrado vocês.

A cada cidadão brasileiro, que torna possível a manutenção da educação superior pública.

A UTFPR e Central de Análises, que disponibilizaram seus laboratórios e recursos para que esta pesquisa pudesse ocorrer.

A todos os professores que passaram por minha vida e que me transformaram na pessoa que sou hoje.

Sou grata por cada oportunidade que tive, por cada amigo que fiz, por cada pessoa que me conectei, por cada momento de alegria, por cada manhã de sol que me fez sorrir, por cada desafio que me fez crescer e principalmente por ter vida em um ano em que muitas foram perdidas.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Produtos naturais	17
3.2 Plantas Alimentícias Não Convencionais	17
3.3 Cará-Moela (<i>Dioscorea bulbifera</i>)	18
3.3.1 Substâncias isoladas da <i>D. bulbifera</i>	19
3.3.2 Ação antitumoral de extratos da <i>D. bulbifera</i>	23
3.4 Atividade antitumoral	23
3.4.1 Medicamentos antitumorais de origem vegetal	24
3.4.2. Isolamento de substâncias com atividade antitumoral da <i>D.bulbifera</i>	25
3.5 Citotoxicidade	26
3.6 Técnicas de separação e identificação de compostos orgânicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Coleta e preparo do material botânico	29
4.2 Preparo do material vegetal	29
4.3 Obtenção dos extratos	30
4.3.1 Extrato etanólico 75%	30
4.3.2 Partição	30
4.4 Fracionamento cromatográfico em coluna flash de sílica gel	31
4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	32
4.6 Atividade antitumoral	34
4.7 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT	35
4.8 Índice de seletividade	35
4.9 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Processo de extração	36
5.2 Fracionamento	37
5.3 Purificação	39

5.4 Identificação das substâncias isoladas	44
5.5 Atividade antitumoral.....	55
5.6 Atividade citotóxica.....	57
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A: Folhas do cará-moela; B: Tubérculo cará-moela.	19
Figura 2 – A: <i>Dioscorea bulbifera</i> in natura; B: <i>Dioscorea bulbifera</i> liofilizada e triturada	29
Figura 3 – Fluxograma das etapas do processo de extração	31
Figura 4 – Coluna flash	32
Figura 5 – Fluxograma do processo de fracionamento e purificação	34
Figura 6 – Frações coletadas a partir da coluna flash Fonte: Autoria própria	37
Figura 7 – Banda visualizada no UV-365 nm	37
Figura 8 – Coloração das frações obtidas	39
Figura 9 – CCDP da fração F5	40
Figura 10 - CCDP da fração F6	40
Figura 11 – CCDP da fração F7	41
Figura 12– Coluna aberta com Sephadex LH-20	42
Figura 13 – Subfrações provenientes da coluna aberta com Sephadex LH-20	42
Figura 14 – CCDP da subfração F8S2	43
Figura 15 – A: Cristais formados nos tubos de ensaio, B: Cristais após o agrupamento	44
Figura 16 – Fluxograma do processo de purificação	44
Figura 17 - Diobulbinona A	46
Figura 18 - Sistemas A_2X_2 de dois anéis <i>para</i> -substituídos	47
Figura 19 – Sistema ABX	47
Figura 20 – Diosbulbina I	49
Figura 21 – Multipletos correspondentes aos átomos de H ligados aos C-12 e C-14	50
Figura 22 - Diosbulbina J	51
Figura 24 – A: 4,6-dihidroxi-2- <i>o</i> - (4'-hidroxibutil) acetofenona B: Estrutura proposta para a amostra F78S2-2	52
Figura 25 – Deslocamentos atribuídos aos átomos de H ligados aos C-2 e C-6 (A) e C-3 e C-5 (B)	53
Figura 26 - diosbulbiol B	54
Figura 27 – Sinais correspondentes aos átomos de H ligados aos C-4, C-6 e C7	54

Figura 28 – Viabilidade celular das células Vero (Comparação entre as amostras na mesma concentração).....	57
Figura 29 – Viabilidade celular das células Vero (Comparação entre as concentrações de cada amostra).....	59
Figura 30 - Viabilidade celular das células LLC-MK ₂ (Comparação entre as amostras na mesma concentração).....	60
Figura 31 - Viabilidade celular das células LLC-MK ₂ (Comparação entre as concentrações de cada amostra).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos isolados de diferentes partes da espécie <i>D.bulbifera</i>	20
Tabela 2 – Rendimento do extrato <i>n</i> -butanólico	36
Tabela 3 – Rendimento das frações obtidas	38
Tabela 4 – Comparação entre os espectros de RMN ¹ H proposto por Liu et al. (2011) e da substância F5S1	45
Tabela 5- Comparação entre os espectros de RMN ¹ H proposto por Wang et al. (2009) e da substância F5S2	48
Tabela 6 - Comparação entre os espectros de RMN ¹ H proposto por Wang et al. (2009) e da substância F5S2	50
Tabela 7 - Comparação entre os espectros de RMN ¹ H proposto por Gupta e Singh (1989) e da substância F78S2-2	52
Tabela 8 - Comparação entre os espectros de RMN ¹ H proposto por Wang et al. (2018) e da substância F7S3	53
Tabela 9 – Atividade antitumoral de frações do extrato <i>n</i> -butanólico da <i>D.bulbifera</i> .	55
Tabela 10 - CI_{50} frente as linhagens celulares renais Vero e LLC-MK ₂	62
Tabela 11 – Índice de Seletividade (IS) para atividade antitumoral em relação às células Jurkat e Raji	63

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade há milhares de anos, as civilizações mais antigas já utilizavam ervas e folhas para a cura de doenças e alívio de dores. A ingestão de ervas e folhas foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras a sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Na atualidade muitos medicamentos em todo o mundo são produzidos a partir de substâncias orgânicas oriundas de produtos naturais, cerca de 60% dos medicamentos modernos e antitumorais são provenientes direta ou indiretamente de plantas (BOUCHER et al., 2017).

Um grupo de plantas ainda pouco exploradas cientificamente são as chamadas plantas alimentícias não convencionais (Panc). São plantas de grande relevância, podendo ser fontes de vitaminas, fibras, minerais, carboidratos e proteínas. Pelo fato de serem consideradas rústicas, necessitam de pouco manejo, se desenvolvendo facilmente em ambientes naturais e sem a necessidade de cuidados rigorosos (VIANA et al., 2015; BARREIRA et al., 2015).

A *Dioscorea bulbifera*, também conhecida como cará-moela é uma planta alimentícia não convencional nativa da Ásia e África e presente em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (JIMÉNEZ e AGUILAR, 2017; MARTIN, 1974). Apesar de ser uma importante planta produtora de alimento no passado, não é cultivada comercialmente no Brasil (NETO et al., 2000), o consumo e o plantio desta espécie mostraram-se muito restritos (FERREIRA et al., 2020). Ela é uma trepadeira herbácea que pode atingir até seis metros de altura (JIMÉNEZ e AGUILAR, 2017), possui folhas no formato de coração e destaca-se por produzir bulbos e tubérculos aéreos comestíveis (MARTIN, 1974).

Sua composição química pode variar de acordo com a localização geográfica e partes da planta. Dentre as substâncias encontradas nesta espécie, destacam-se os flavonoides e terpenos, responsáveis por seu amplo potencial terapêutico, destacando-se a atividade antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, anti-hiperlipidêmica e antioxidante (GHOSH et al., 2015). Estudos recentes realizados por Stadniki (2019) também revelaram que compostos presentes

no extrato *n*-butanólico dos tubérculos dessa planta possuem relevante ação antitumoral contra células leucêmicas.

Os fármacos utilizados no tratamento do câncer costumam ser pouco seletivos, sendo tóxicos para as células tumorais e para células normais. Após uma sessão de quimioterapia, o paciente pode apresentar alterações hematológicas e mais tardiamente, observam-se efeitos tóxicos aos rins, fígado, coração, sistema neurológico, entre outros (FERREIRA et al., 2014). Em decorrência dos efeitos adversos causados por esses medicamentos, que podem ser atribuídos à sua toxicidade, existe uma grande dificuldade na adesão dos pacientes ao tratamento (GUERRA, 2005).

Desde a descoberta dos alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*), vincristina e vimblastina, intensificaram-se as investigações por novos compostos de origem vegetal com potencial ação antitumoral, que sejam seletivos e não comprometam as células saudáveis. Apesar de existirem diversos estudos com plantas com potencial antitumoral, existem poucos relatos apresentando o isolamento e identificação das substâncias responsáveis por essa ação (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009; GHOSH et al., 2015).

Uma vez que moléculas provenientes de produtos naturais têm se mostrado eficazes no combate ao câncer e trazem menos efeitos colaterais aos pacientes em tratamento, o presente trabalho propõe estudar fitoquimicamente as frações obtidas do extrato *n*-butanólico do tubérculo aéreo cará-moela, utilizando-se de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos, além de investigar a atividade antitumoral *in vitro* frente à células leucêmicas e a citotoxicidade em células renais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar a atividade antitumoral frente às células leucêmicas e atividade citotóxica em células renais das frações obtidas do extrato *n*-butanólico do tubérculo cará-moela (*D. bulbifera*).

2.2 Objetivos específicos

- Fracionar e isolar os compostos presentes no extrato *n*-butanólico do tubérculo do cará-moela (*D. bulbifera*) utilizando técnicas cromatográficas;
- Identificar por meio de técnicas espectroscópicas os compostos isolados;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* das frações obtidas em linhagens celulares Raji e Jurkat.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* por meio de ensaio colorimétrico MTT do extrato *n*-butanólico e de suas frações frente as linhagens celulares Vero e LLC-MK₂.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados pelos seres humanos há milhares de anos. Uma das formas mais antigas de sua utilização é a ingestão de folhas e ervas com o objetivo de aliviar dores e curar doenças. As civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa são exemplos de povos que exploraram o uso dos recursos naturais, na medicina e no controle de pragas (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil é detentor de uma das maiores riquezas naturais do planeta no que se refere à vegetação, devido a sua grande biodiversidade e características climáticas. Embora essa imensa biodiversidade ainda seja pouco explorada, o avanço da pesquisa de produtos naturais no Brasil se revela promissor (BOLZANI, 2016; BERLINCK et al., 2017).

Essa evolução no estudo dos produtos naturais é de extrema importância, uma vez que, há muito tempo substâncias orgânicas originadas de fontes naturais são utilizadas no tratamento de diversas doenças. Muitos dos medicamentos utilizados na atualidade derivam direta ou indiretamente de plantas, micro-organismos e organismos marinhos. Novas metodologias de isolamento e identificação de compostos provenientes de fontes naturais, têm viabilizado o aumento no número de novas substâncias bioativas para inúmeras indicações terapêuticas, como exemplo, pode-se citar o tratamento de câncer. A cada dia tem aumentado a busca por medicamentos anticancerígenos efetivos e seletivos, ou que impeçam o avanço da doença (BRANDÃO et al., 2010).

3.2 Plantas Alimentícias Não Convencionais

As hortaliças são plantas alimentícias de grande relevância na alimentação humana, podendo ser fonte de vitaminas, fibras, minerais, carboidratos e até proteínas. Devido à migração da população rural para as áreas urbanas das cidades e do aumento do consumo de alimentos de rápido preparo, algumas dessas

hortaliças foram esquecidas e desvalorizadas, tais hortaliças são denominadas não convencionais (VIANA et al., 2015).

As hortaliças não convencionais, também chamadas de plantas alimentícias não convencionais (Panc) estão entre as plantas que se desenvolvem em ambientes naturais, sem a necessidade de insumos, defensivos agrícolas ou cuidados rigorosos em seu cultivo, por serem mais resistentes a pragas e doenças (BARREIRA et al., 2015).

Existe uma ampla variedade dessas hortaliças presentes no Brasil, sendo que as espécies cultivadas variam de acordo com a região. Já a composição química, bem como a quantidade de compostos bioativos variam para cada espécie (TEIXEIRA, 2018).

Dentre os exemplos de hortaliças não convencionais presentes no Brasil pode-se citar algumas, como o inhame ou cará (*Dioscoreae spp.*); araruta (*Maranta arundinaceaea*); jacatupé (*Pachirrhizus tuberosus*); mangarito (*Xanthossoma maffaffa*); taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) e ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) (BRASIL, 2010; ALMEIDA e CORRÊA, 2012).

3.3 Cará-Moela (*Dioscorea bulbifera*)

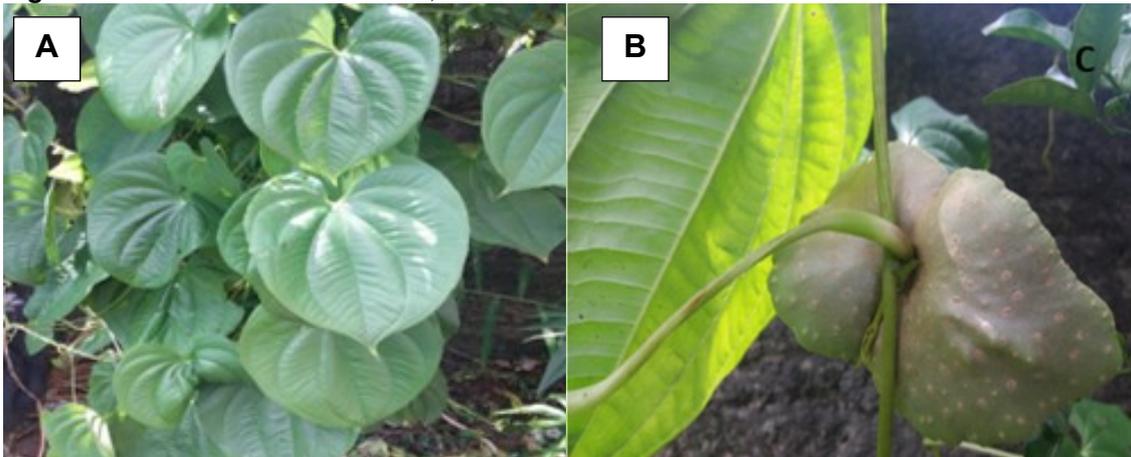
O gênero *Dioscorea* agrupa 600 espécies de plantas, distribuídas principalmente nas regiões tropicais do planeta. Uma ampla gama de espécies selvagens serve de alimento para diferentes populações na África, Ásia, América Latina e Austrália. Algumas espécies também são utilizadas na Ásia, Europa, América do Norte e Central para fins medicinais (ANDRÉS et al., 2015). As plantas desse gênero são herbáceas e possuem raízes e rizomas quase sempre tuberosos, folhas pecioladas muito variadas em formas, podendo ser oval, redonda, lanceolada, linear, alada, em formato de coração, etc. E vivem especialmente em climas quentes (NAVAS e ERBA, 2020).

Apesar do gênero possuir centenas de espécies, apenas cinco são consideradas importantes na alimentação humana, dentre elas a *D. bulbifera* (CARVALHO & CARVALHO, 1999). Uma trepadeira herbácea, que pode atingir até 6 metros de altura e é conhecida por produzir tubérculos aéreos utilizados como alimento em diversas regiões do mundo (JIMÉNEZ, AGUILAR, 2017). Apresenta folhas no formato de coração ou seta, longo-pecioladas e se distingue facilmente

das outras espécies pela grande quantidade de bulbos e tubérculos aéreos que produz, os quais nascem na axila das folhas e variam muito em forma e tamanho (GONZÁLEZ VEGA, 2012; SILVA, 2013).

Na Figura 1 é apresentada a planta, cará-moela (*D. bulbifera*): folhas e tubérculo aéreo.

Figura 1 – A: Folhas do cará-moela; B: Tubérculo cará-moela.



Fonte: Stadnick, 2019

3.3.1 Substâncias isoladas da *D. bulbifera*

A composição química da *D. bulbifera* pode variar de acordo com sua localização geográfica e partes da planta e as substâncias isoladas podem variar de acordo com o solvente utilizado no processo de extração. Das substâncias encontradas na planta destacam-se os flavonoides e terpenos (GHOSH et al., 2015).

Ghosh et al. (2012) por meio da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) observaram um número significativo de sinais no extrato de acetato de etila, sugerindo a presença de prováveis flavonoides ou compostos terpenoides presentes na *D. bulbifera*.

Em estudo realizado com as flores da *D. bulbifera*, verificou-se a presença de 11 novas saponinas esteroidais e 5 congêneres conhecidos no extrato *n*-butanólico (TAPONDJOU, 2013).

Tang et al. (2014) realizaram a extração com acetato de etila dos tubérculos da *D. bulbifera* e obtiveram nove diterpenoides, incluindo quatro novos compostos.

Na Tabela 1 apresenta-se uma lista de compostos isolados da espécie *D.bulbifera*, por diferentes pesquisadores no mundo. Não existem relatos na literatura de compostos isolados desta planta no Brasil.

Tabela 1- Compostos isolados de diferentes partes da espécie *D.bulbifera*

(Continua)

Composto	Parte da planta	País	Referência
Diosbulbina A	Tubérculo, folha, caule	China, Japão	Komori, 1996; Tang et al., 2014
Diosbulbina B	Tubérculo, rizoma, folha, caule	China, Japão	Tang et al., 2014; Liu et al., 2010; Gao et al., 2002; Komori, 1996; Shi et al., 2018
Diosbulbina C	Tubérculo, folha, caule	China, Japão	Tang et al., 2014; komori, 1996
Diosbulbina D	Tubérculo, folha, caule	China, Bangladesh, Japão	Tang et al., 2014; komori, 1996; wang et al., 2009; Murray et al., 1984
Diosbulbina E	Rizoma, folha, caule	China, Japão	Liu et al., 2010; Komori, 1996
Diosbulbina F	Tubérculo, rizoma, folha, caule	China, Japão	Liu et al, 2010; Tang et al, 2014, Komori, 1996
Diosbulbina G	Tubérculo, rizoma, folha, caule	China, Japão	Liu et al., 2010; Komori, 1996; Tang et al., 2014
Diosbulbina H	Folha, caule	Japão	Komori, 1996
Diosbulbina I	Tubérculo de raiz	China	Wang et al., 2009
Diosbulbina J	Tubérculo de raiz	China	Wang et al., 2009;
Diosbulbina K	Rizoma	China	Liu et al., 2010
Diosbulbina L	Rizoma	China	Liu et al., 2010
Diosbulbina M	Rizoma	China	Liu et al., 2010
Diosbulbina N	Tubérculo	China	Tang et al., 2014
Diosbulbina O	Tubérculo	China	Tang et al., 2014
Diosbulbina P	Tubérculo	China	Tang et al., 2014
Bafoudiosbulbina A	Bulbo, tubérculo	Camarões	Kuete et al., 2012; Teponno et al., 2006
Bafoudiosbulbina B	Bulbo, tubérculo	Camarões	Kuete et al., 2012; Teponno et al., 2006
Bafoudiosbulbina C	Bulbo, tubérculo	Camarões	Kuete et al., 2012
Bafoudiosbulbina F	Bulbo, tubérculo	Camarões	Kuete et al., 2012
Bafoudiosbulbina G	Bulbo, tubérculo	Camarões	Kuete et al., 2012
Diosbulbisina A	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Diosbulbisina B	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Diosbulbisina C	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Diosbulbisina D	Rizoma	China	Liu et al., 2009

(Continua)

Composto	Parte da planta	País	Referência
Diosbulbisida A	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Diosbulbisida B	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Diosbulbisida C	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Dioscoreanosida A	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida B	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida C	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida E	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida F	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida G	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida H	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida I	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida J	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Dioscoreanosida K	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
Diosbulbinosideo D	Tubérculo	Japão	Komori, 1996
Diosbulbinosideo F	Tubérculo	Japão	Komori, 1996
Diosbulbinosideo G	Rizoma	China	Liu et al., 2010
Diosbulbiol A	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
Diosbulbiol B	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
β-Sitosterol	Bulbo	Camarões	Teponno et al., 2006
Cariatina	Rizoma	China	Gao et al., 2002
(+)Catequina	Rizoma	China	Gao et al., 2002; Liu et al., 2011
Miricetina	Rizoma	China	Gao et al., 2002; Tang et al., 2006
Kaempferol	Rizoma	China	Liu et al., 2011
Ácido vanílico	Rizoma	China	Tang et al., 2006
Ácido isovanílico	Rizoma	China	Tang et al., 2006
(+)Epicatequina	Rizoma	China	Tang et al., 2006
Éter 3,5-dimetil - kaempferol-	Rizoma	China	Gao et al., 2002
3-O-galactopiranosídeo-Quercetina-	Rizoma	China	Gao et al., 2002
3-O-galactopiranosídeo-Miricetina-	Rizoma	China	Gao et al., 2002
3-O-glucopiranosídeo-Miricetina-	Rizoma	China	Gao et al., 2002
Acetato de 8-epidiosbulbina E	Bulbo, tubérculo	Bangladesh, índia	Murray et al., 1984; Shiram et al., 2008; Shi et al., 2018
Dimetil-batatasina IV	Bulbo	Nigéria	Adesanya; Ogundana; Roberts, 1989
C22:6 w-hidroxi ácido graxo	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Ácido 3-hidróxi-5-metoxibenzóico	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Batatasina III	Tubérculo	China	Liu et al., 2011; Wang et al., 2018
1,6-dihidroxi-2,5,7-trimetoxifenantreno	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
2,4,6,7-tetra-hidróxi-9,10-di- hidrofenantreno	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
2,5,2', 5'-tetra-hidróxi-3'-metoxibenzil	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Tunalbeno	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
2,4-dimetoxifenantreno-3,7-diol	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Flavantrina	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Isorhamnetina	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Quercetina	Tubérculo	China	Liu et al., 2011

(Conclusão)

Composto	Parte da planta	País	Referência
3,5,3'-trimetoxi-Quercetina	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
(-)-epicatequina	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Isoquercitrina	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
2,7-dihidróxi-3,4,6-trimetoxifenantreno	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Diarilheptanona	Tubérculo	China	Liu et al., 2011
Pennogenina	Rizoma	China	Liu et al., 2009
Pennogenin-3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 4) - [α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 2)] - β -D-glucopiranosídeo	Rizoma	China	Liu et al., 2009
4-hidróxi- [2- <i>trans</i> -3', 7'-dimetilocta-2', 6'-dienil] -6-metoxiacetofenona	Bulbo	Índia	Gupta; Singh, 1988
4,6-dihidróxi-2-O- (4'-hidroxibutil) acetofenona	Bulbo	Índia	Gupta; Singh, 1988
2,7-dihidróxi-4-metoxifenantreno	Bulbo	Camarões	Kuete et al., 2012
Espiroconazol A	Flor	Camarões	Tapondjou et al.,2013
Diosgenina	Bulbo	Índia	
Pennogenina 3-O- α -L-ramnopiranosil- (1- 4) - α -L-ramnopiranosil- (1-4) - [α -L-ramnopiranosil- (1-2)] - β -D-glucopiranosídeo	Flor	Camarões	Tapondjou et al.,2013
26-O- β -D-glucopiranosil- (25R) -5-en-furost-3 β , 17 α , 22 α , 26-tetraol-3-O- α -L-ramnopiranosil- (1- 4) - α -L-ramnopiranosil- (1- 4) - [α -L-ramnopiranosil- (1- 2)] - β -D-glucopiranosídeo	Flor	Camarões	Tapondjou et al.,2013
23 β , 27-dihidróxi-pennogenina 3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 4) - α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 4) - [α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 2)] - β -D-glucopiranosídeo	Flor	Camarões	Tapondjou et al.,2013
floribundasaponina B	Flor	Camarões	Tapondjou et al., 2013
1- (tetracosanoil) -glicerol	Tubérculo	Camarões	Teponno et al., 2006
<i>trans</i> -tetracosanilferulado	Tubérculo	Camarões	Teponno et al., 2006
3-O- β -D-glucopiranosil- β -Sitosterol	Tubérculo	Camarões	Teponno et al., 2006
Ácido tetracosanóico	Tubérculo	Camarões	Teponno et al., 2006
2', 3- dihidroxi-4, 5-dimetoxibenzil	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
2', 3-dihidroxi-5-metoxibenzil	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
Tristina	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
3-hidróxi-1,7-bis- (4', 4' '- dihidroxifenil) - heptano	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
Platifilenona	Tubérculo	China	Wang et al., 2018
Epigalocatequina	Tubérculo	China	Shi et al., 2018
kaempferol-3-O- β -D-galactosídeo	Tubérculo	China	Shi et al., 2018
Catequina	Tubérculo	China	Shi et al., 2018
Epicatequina	Tubérculo	China	Shi et al., 2018
9,10-di-hidro-2,3,5,7-fenantrenetetraol	Tubérculo	China	Shi et al., 2018

Fonte: Autoria própria

3.3.2 Ação antitumoral de extratos da *D. bulbifera*

A *D. bulbifera* encontrou sua importância na medicina tradicional em todo o mundo, sendo utilizada para o tratamento de diversas doenças, desde dores de garganta, feridas, infecções, até úlceras e tumores. Os relatos populares em relação as atividades biológicas exercidas por essa planta incentivaram investigações a respeito de sua ação antitumoral (GOHSH et al., 2015).

Mainasara et al. (2021) estudaram a ação antitumoral das folhas da *D. bulbifera* nas linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. A viabilidade das células após 24, 48 e 72 h de incubação foi observada e o extrato metanólico apresentou potente ação citotóxica com os valores de CI_{50} de 4,29; 1,86 e 1,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto o medicamento padrão doxorrubicina, apresentou valores de CI_{50} de 11,21; 8,1 e 3,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato da planta se mostrou mais potente que o medicamento padrão utilizado, uma vez que, quanto a menor concentração necessária para promover a morte das células, mais potente a ação antitumoral da substância testada.

Hidayat et al. (2018), estudaram a ação antitumoral do tubérculo *D. bulbifera* contra diferentes células cancerosas, dentre os extratos testados, o extrato de acetato de etila inibiu significativamente a capacidade de sobrevivência das células HCT116, HT29 e A549, de maneira dependente da dose e exibiu potente ação antitumoral contra as células HCT116 com valores de CI_{50} de 163,59; 88,49 e 37,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24, 48 e 72 h, respectivamente.

Por ser uma fonte de compostos bioativos com potencial ação antitumoral, a *D. bulbifera* pode ser utilizada para produção de novos medicamentos com maior eficácia e biocompatibilidade com o organismo humano (GHOSH et al., 2015).

3.4 Atividade antitumoral

O corpo humano é composto por células. As células normais se dividem, amadurecem e morrem, renovando-se em cada ciclo, enquanto as células anormais deixam de seguir esse padrão natural, sofrendo mutação e desenvolvendo o câncer, doença responsável por mais de 12% dos óbitos no mundo (BRASIL, 2006). Só em 2020 ocorreram quase 10 milhões de mortes por câncer (OMS, 2021).

Um dos tratamentos mais utilizados no combate dessa doença é a quimioterapia. Os medicamentos quimioterápicos têm a função de eliminar as células malignas que formam o tumor, entretanto, esses medicamentos não são seletivos, agindo indiscriminadamente sobre as células normais e cancerosas, trazendo muitos efeitos colaterais que comprometem a saúde e o bem-estar do paciente (SHEIN et al., 2006).

Com isso, surge a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que tenham como alvo apenas as células cancerígenas, com o intuito de minimizar os efeitos adversos causados pelos tratamentos convencionais (VIANA et al., 2017). Os produtos naturais são uma importante fonte de compostos antineoplásicos (PEREIRA et al., 2006). Em 2001 Mukherjee et al. apresentaram em seu estudo a existência de mais de 1000 plantas com atividade antitumoral significativa. No decorrer dos anos esses estudos têm se ampliado, ampliando também o número de plantas estudadas que possuem atividade antitumoral.

Tendo em vista a imensa biodiversidade brasileira e a ampla biota, têm-se buscado por moléculas mais eficazes no tratamento contra o câncer e que possuam menor toxicidade (VIANA et al., 2017). Estudos com a *D. bulbifera* demonstram sua eficácia no controle da proliferação de células neoplásicas, entretanto, seu potencial de inibição de tumores e a forma com que age não está totalmente elucidado, sugerindo mais estudos com a planta (WANG et al., 2012).

3.4.1 Medicamentos antitumorais de origem vegetal

A utilização de plantas como fonte de princípios ativos utilizados em medicamentos acompanha a história da humanidade, apesar do interesse das indústrias farmacêuticas em sintetizar quimicamente esses compostos, as plantas com propriedades medicinais permanecem como uma valiosa fonte de novas moléculas bioativas com potencial de utilização no tratamento de doenças como o câncer (POMPILHO et al., 2013). Estima-se que 60% dos medicamentos modernos antitumorais são derivados de plantas (BOUCHER et al., 2017).

A descoberta de moléculas com potencial antitumoral provenientes da planta *C. roseus*, popularmente conhecida como vinca, foi um importante avanço no tratamento do câncer. O composto responsável por sua ação neoplásica pertence à classe dos alcaloides. Dentre os fármacos comercializados provenientes dessa

classe estão a vimblastina e vincristina, utilizadas no tratamento de leucemias e linfomas. Após a descoberta desses alcaloides, vários análogos semissintéticos têm sido pesquisados, tais como a vinorelbina, vindesina e vinflunina (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009; PINTO et al., 2012).

A podofilotoxina presente em espécies do gênero *Podophyllum* também foi uma importante descoberta para o tratamento do câncer, especialmente o câncer de pele. A partir dessa substância foram obtidos o otoposídeo e o teniposídeo. Estas descobertas encorajaram o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) a realizar o programa de triagem para agentes anticancerígenos provenientes de espécies vegetais. Entre 1960 e 1982, 35000 amostras vegetais foram avaliadas, sendo que as plantas que apresentaram resultados de maior relevância foram a *Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt, que deram origem ao paclitaxel (BRANDÃO et al., 2010).

3.4.2. Isolamento de substâncias com atividade antitumoral da *D.bulbifera*

Komori (1996) testou as substâncias diosbulbina A, diosbulbina B e diosbulbina A 2-O- β -D-glucopiranosídeo isoladas da *D.bulbifera* em células de sarcoma 180 em camundongos, foram administradas doses diariamente e após cinco dias os tumores foram removidos e pesados, as três substâncias testadas reduziram significativamente o tamanho do tumor.

Gao et al., 2002 isolou sete flavonoides do extrato de acetato de etila da *D.bulbifera*, sendo eles, éter 3,5-dimetil kaempferol-cariacina, catequina, miricetina, 3-O-galactopiranosídeo-quercetina-, 3-O-galactopiranosídeo-miricetina- e 3-O-glucopiranosídeo miricetina. Todos os compostos apresentaram efeito inibitório contra a promoção tumoral de células JB6, entretanto, os flavonoides apresentaram maior ação antitumoral quando comparados aos flavonoides glicosilados.

Liu et al., 2009 isolaram dez compostos da fração de acetato de etila da *D.bulbifera*, dentre eles a penogenina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosídeo e pennogenina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4) - [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)] - β -D-glucopiranosídeo apresentaram atividade citotóxica significativa com 99,1% e 92,6% de inibição, respectivamente, contra células de carcinoma hepatocelular humano Bel-7402. Os compostos também foram testados quanto ao crescimento celular em relação ao carcinoma hepatocelular

humano SMMC7721 e exibiram valores de CI_{50} de 4,54 μ M e 4,85 μ M, respectivamente.

Em estudo realizado com o extrato *n*-butanólico das flores da *D.bulbifera*, verificou-se a presença de 16 compostos. Os compostos isolados foram testados quanto à atividade antitumoral contra células de carcinoma da bexiga urinária (células ECV-304), três das substâncias isoladas apresentaram atividade antitumoral moderada, sendo elas, a pennogenina 3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-[α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosídeo, a 26-O- β -D-glucopiranosil-(25R)-5-en-furost-3 β ,17 α ,22 α ,26-tetraol-3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosídeo e o espiroconazol A (TAPONDJOU, 2013).

3.5 Citotoxicidade

Alguns produtos naturais desempenham eficácia satisfatória no combate ao câncer, entretanto, muitos deles apresentam alta toxicidade ao organismo humano, tornando-se necessários estudos que comprovem a segurança de tais substâncias (VIANA et al., 2017).

Toxicidade pode ser definida como uma propriedade específica de uma substância capaz de causar efeitos nocivos aos organismos expostos, durante algum tempo, a uma concentração específica. Já a citotoxicidade é a propriedade nociva de uma substância em relação às células (FROTA et al., 2019).

A toxicidade renal, complicação frequente do uso de agentes quimioterápicos, tem se mostrado cada vez mais importante na prática médica, considerando o constante surgimento de novas opções terapêuticas e consequente aumento na sobrevivência de pacientes oncológicos (MARTTIELLO, TRAPP, KROTH, 2018). Portanto, esse tratamento deve ser empregado com cautela em pacientes predispostos a doenças renais e por isso torna-se importante a busca por plantas que possuam substâncias bioativas e medicinais com possíveis potencialidades inibitórias para tumores e que possuam toxicidade seletiva sobre as células cancerígenas.

Um parâmetro para avaliar se há diferença de nocividade entre linhagens de células normais e tumorais é o teste de viabilidade celular, que pode ser realizado em diferentes tipos de células. Onde ocorre a redução de corantes, como o tetrazólio

ou a resazurina, utilizados como marcadores de células viáveis. Esse ensaio requer a incubação de um reagente com uma população de células viáveis para converter um substrato em um produto colorido ou fluorescente, que pode ser detectado em leitor de placas. A incubação do substrato com células viáveis resultará na geração de um sinal que é proporcional ao número de células viáveis presentes. Quando as células morrem, elas perdem rapidamente a capacidade de converter o substrato em produto. Essa diferença fornece a base para muitos dos ensaios de viabilidade celular comumente utilizados (GADHIA et al., 2017).

Existem muitas espécies estudadas quanto as suas propriedades medicinais, entretanto, nem todas têm sua segurança comprovada. Algumas apresentam citotoxicidade em baixas concentrações, enquanto outras são citotóxicas à partir de concentrações mais altas definidas, podendo ser utilizadas com segurança em concentrações inferiores (DESOTI et al., 2011).

3.6 Técnicas de separação e identificação de compostos orgânicos

A dificuldade em se trabalhar com extratos vegetais está na complexidade dessas amostras, muitas delas possuem um grande número de metabólitos secundários em sua composição (MAIRESSE et al., 2007), apesar de uma planta poder conter centenas dessas substâncias, poucas delas estão presentes em maior concentração, fazendo com que a análise de substâncias com potencial biológico seja mais complexa. Com isso surge a necessidade do fracionamento dos extratos vegetais (FILHO, 1998).

O fracionamento de extratos vegetais visa a obtenção de frações enriquecidas em compostos bioativos, ou ainda a redução no teor de compostos interferentes. Normalmente empregam-se técnicas cromatográficas, tais como a cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (SIMÕES, 2017).

Após a obtenção dos compostos mais puros normalmente empregam-se técnicas espectroscópicas para a identificação desses metabólitos isolados. Dentre as técnicas mais comuns, pode-se citar a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectrometria de massas (EM) (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das ferramentas mais importantes na química orgânica (SILVERSTEIN et al., 2019). É uma técnica instrumental que permite a determinação do número, tipo e posições relativas de certos átomos de uma molécula. Este tipo de espectroscopia se aplica apenas a átomos que têm momentos magnéticos nucleares. Embora muitos átomos atendam a essa exigência, os átomos de hidrogênio-1 e carbono-13 são os mais importantes na identificação de compostos orgânicos (PAVIA et al., 2009).

Esta técnica é basicamente outra forma de espectroscopia de absorção, semelhante à espectrometria de infravermelho e à de ultravioleta, onde uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf) em uma frequência regida por suas características estruturais, sob condições apropriadas em um campo magnético, permitindo sua identificação (SILVERSTEIN et al., 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

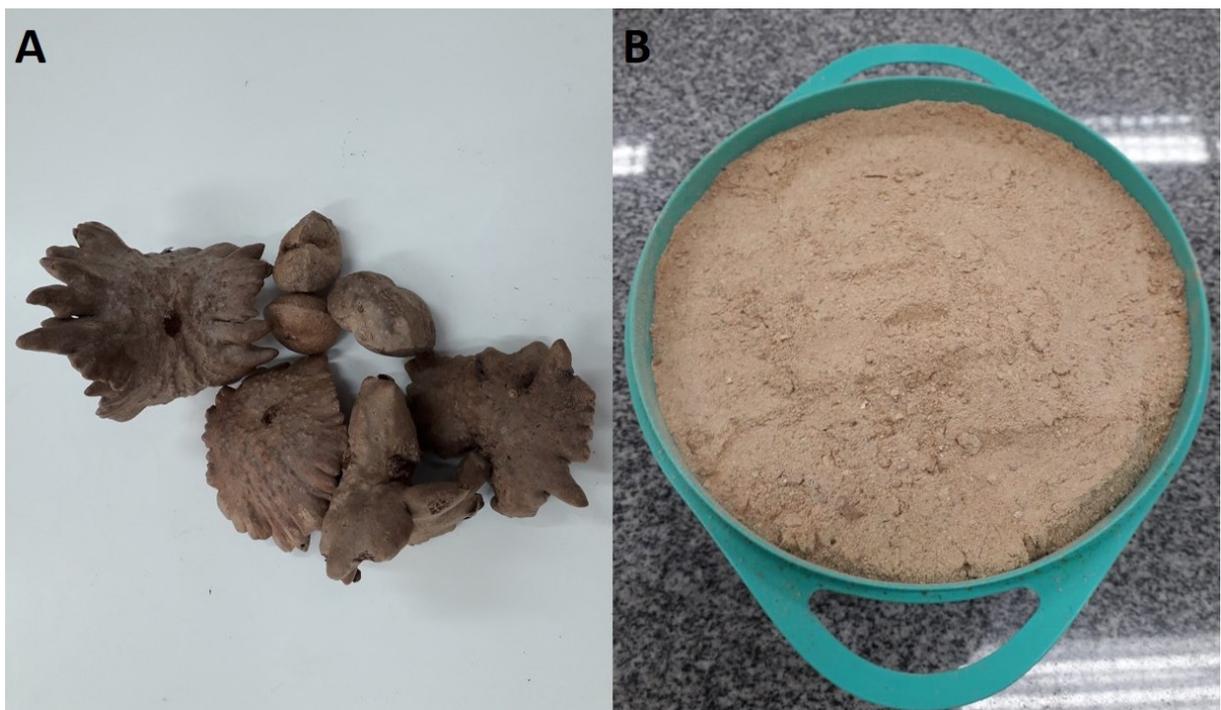
4.1 Coleta e preparo do material botânico

A coleta do material botânico foi realizada no mês de março de 2020 no município de Pato Branco - PR, na área experimental do Campus da UTFPR (Coordenadas geográficas: 26°17'58" de latitude sul e 52°68'92" de longitude oeste e altitude de 761m).

4.2 Preparo do material vegetal

Foram processados 1,7 kg de tubérculo. Inicialmente foi realizada a lavagem em água potável corrente, em seguida a sanitização com hipoclorito de sódio 200 mg L⁻¹ por 5 minutos (ANTONIOLLI et al., 2005). Após esse tempo, os tubérculos inteiros foram descascados e cortados em pequenos pedaços, embalados em sacos plásticos, selados a vácuo para evitar a oxidação e congelados. Depois de congelados foram submetidos a liofilização em liofilizador Liotop L101, em seguida foram triturados até a obtenção de um pó fino (Figura 2).

Figura 2 – A: *Dioscorea bulbifera* in natura; B: *Dioscorea bulbifera* liofilizada e triturada



Fonte: Autoria própria

4.3 Obtenção dos extratos

4.3.1 Extrato etanólico 75%

Os tubérculos liofilizados foram submetidos à extração a frio, com etanol 75% e agitação constante, a renovação do solvente foi realizada três vezes em intervalos de 48 h, conforme método realizado por WANG et al. (2012).

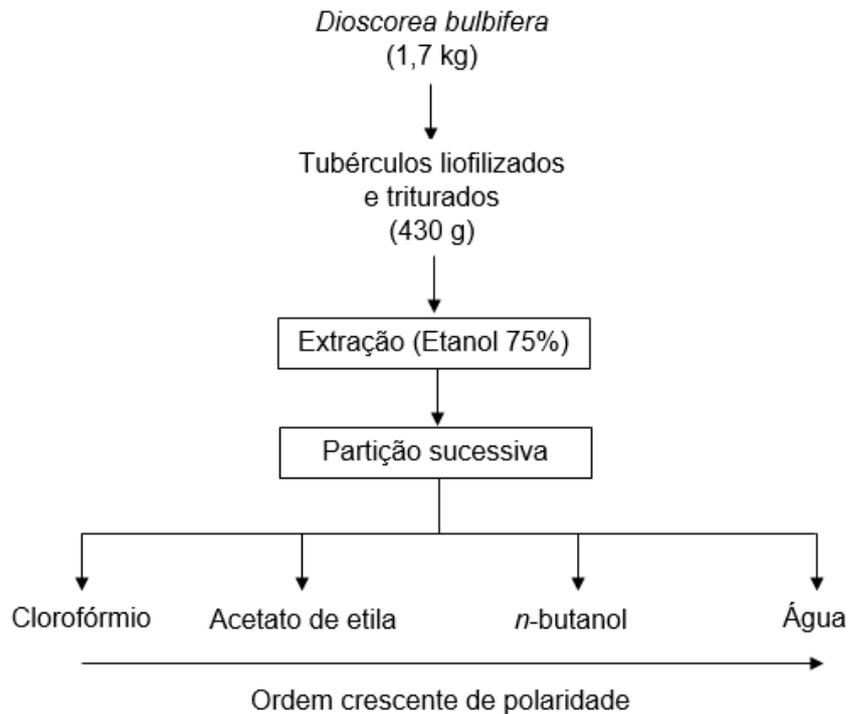
Posteriormente, o extrato foi filtrado a vácuo e concentrado em evaporador rotativo à temperatura de 40 °C. O extrato concentrado foi armazenado na capela para a completa evaporação do solvente.

4.3.2 Partição

O extrato etanólico foi particionado em funil de separação com os solventes, clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol e água, sucessivamente. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C, armazenados na capela para a completa evaporação do solvente e posteriormente liofilizados (GAO et al., 2002). Dos três extratos obtidos, somente o extrato *n*-butanólico foi utilizado neste estudo, pois em estudo anterior realizado por Stadniki (2019) esse extrato apresentou atividade antitumoral superior quando comparado com os demais. Os demais extratos foram armazenados sob refrigeração para estudos futuros.

O Fluxograma do preparo do material vegetal para obtenção dos extratos é apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma das etapas do processo de extração



Fonte: Autoria própria

4.4 Fracionamento cromatográfico em coluna flash de sílica gel

Para o fracionamento, a coluna (Figura 4) foi estabelecida na proporção de 30:1 sílica:amostra, onde 500 mg do extrato *n*-butanólico liofilizado foi dissolvido em metanol PA e depois misturado com 500 mg de sílica gel (Sigma-Aldrich, 230-400 mesh, tamanho de poro 60 Å), a mistura foi homogeneizada até a formação de um pó fino para a completa incorporação da amostra na sílica. Após a evaporação do solvente, a amostra foi aplicada em uma coluna com 1,5 cm de diâmetro interno e preenchida com 15 g de sílica gel, a pressão utilizada foi suficiente para manter a velocidade de eluição em 5 cm min⁻¹.

A fase móvel utilizada na eluição contou com um gradiente em ordem crescente de polaridade, iniciando com clorofórmio:metanol (95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 55:45; 50:50; 45:55; 40:60; 35:65; 30:70; 20:80; 10:90; 0:100) e finalizando com metanol:água (90:10). O volume total de solvente utilizado foi de 1,080 L. As frações foram coletadas em tubos de ensaio com volume fixo de 5 mL.

Figura 4 – Coluna flash



Fonte: Autoria própria

4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O perfil cromatográfico das frações obtidas foi monitorado por CCD analítica. As cromatofolhas utilizadas foram de sílica gel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel), com 0,5 cm de espaçamento entre as amostras e 1 cm nas extremidades verticais. Para eluição a fase móvel utilizada foi de clorofórmio:metanol em ordem crescente de polaridade. A revelação das cromatofolhas ocorreu sob luz natural e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Após reveladas, as frações foram agrupadas por similaridade. Foram obtidas 11 frações, denominadas F1 (2 mg), F2 (2 mg), F3 (2 mg), F4 (4 mg), F5 (30 mg), F6 (33 mg), F7 (38 mg), F8 (300 mg), F9 (145 mg) F10 (19 mg) F11 (6mg). As frações selecionadas foram purificadas através de coluna com resina Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) e CCDP (Cromatografia em Camada Delgada Preparativa), com sílica gel 60, UV-254 (Macherey-Nagel).

A Fração F5 foi submetida a CCDP, eluída com clorofórmio:acetato de etila (40:60), resultando nas subfrações F5S1 (12 mg) e F5S2 (5 mg).

A Fração F6 foi submetida a CCDP, eluída com acetona:clorofórmio (60:40), resultando nas subfrações F6S1 (2 mg), F6S2 (2 mg), F6S3 (2 mg), F6S4 (1mg).

A fração F7 foi submetida a CCDP, eluída com clorofórmio:acetato de etila:acetona:ácido fórmico (20:55:10:15), resultando nas subfrações F7S1 (6 mg), F7S2 (1,2 mg), F7S3 (3,5 mg), F7S4 (8 mg).

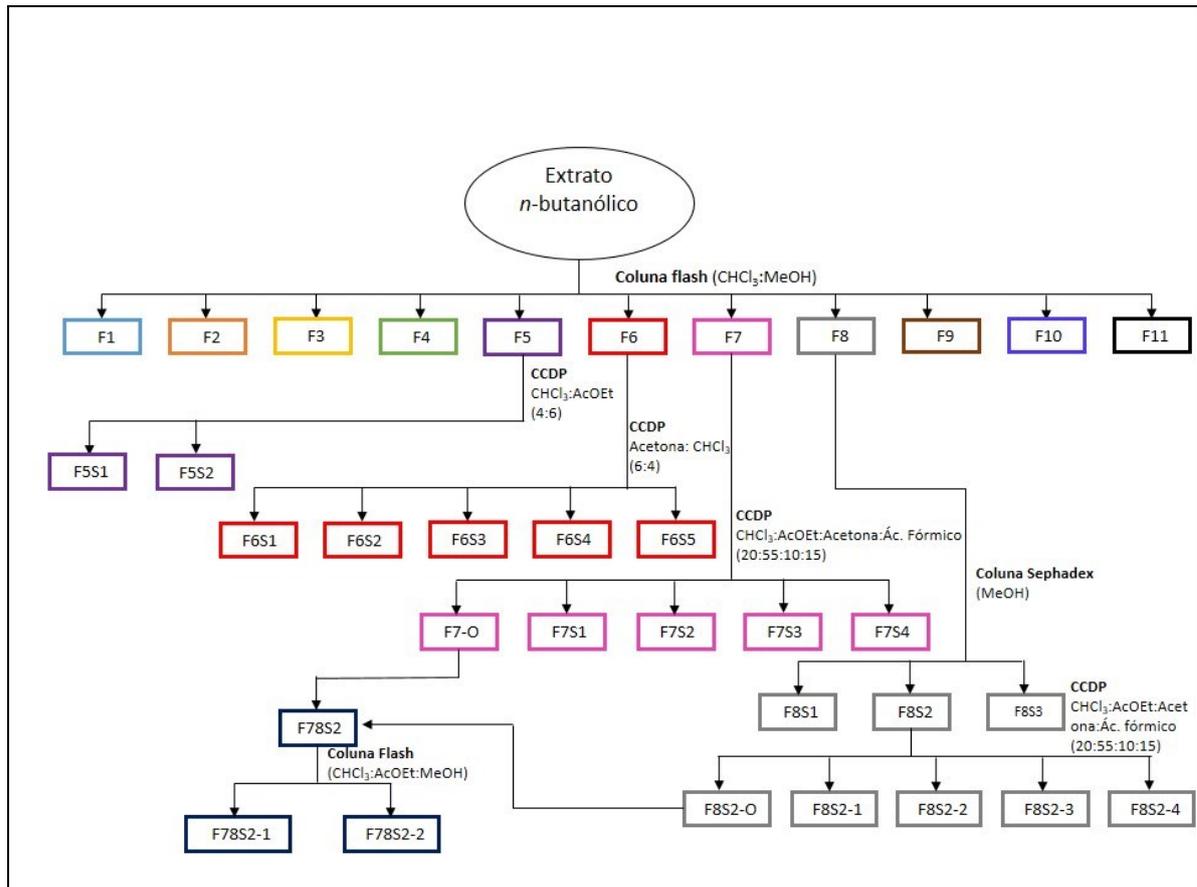
A fração F8 foi submetida a cromatografia em coluna aberta com sephadex LH-20. A coluna foi estabelecida na proporção de 20:1 resina:amostra e a fase móvel utilizada foi metanol. As subfrações foram coletadas em tubos de ensaio com volume fixo de 5 mL, submetidas a CCD analítica e agrupadas por similaridade, resultando nas subfrações F8S1 (32 mg), F8S2 (41 mg) e F8S3 (21 mg).

A subfração F8S2 foi submetida a CCDP, eluída com clorofórmio:acetato de etila:acetona:ácido fórmico (20:55:10:15), resultado nas subfrações F8S2-1 (5 mg), F8S2-2 (4 mg), F8S2-3 (1mg) e F8S2-4 (5 mg).

As origens das CCDs preparativas das frações F7 (F7-O) e F8S2 (F8S2-O) foram coletadas, agrupadas e submetidas a cromatografia em coluna aberta com sílica flash. A fase móvel utilizada na eluição contou com um gradiente em ordem crescente de polaridade, iniciando com clorofórmio:acetato de etila:metanol (70:20:10; 60:40:10; 50:35:15; 35:50:15; 35:45:20; 25:35:40; 10:40:50; 0:40:60; 0:20:80) e finalizando com metanol 100%.

Na Figura 5 é apresentado o fluxograma do processo de fracionamento e purificação.

Figura 5 – Fluxograma do processo de fracionamento e purificação



Fonte: Autoria própria

4.6 Atividade antitumoral

As células utilizadas no estudo foram de linhagens, Raji, constituída de células B linfoblásticas e Jurkat (leucemia linfóide aguda tipo T). 10000 células foram plaqueadas em placas de 96 poços, em seguida foram tratadas com os compostos nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Após 48 h de exposição aos compostos, foi adicionada resazurina a cada poço e após 5 h a absorbância foi lida no comprimento de onda de 570 nm. O medicamento controle utilizado foi a doxorrubicina (DXR).

4.7 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT

A viabilidade celular foi testada nas linhagens celulares Vero e LLC-MK2. As células foram ressuspensas à concentração de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Foram adicionados 100 μL dessa solução nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 48 h a 37 °C e 5% de CO_2 . As amostras foram adicionadas nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas por 48 h. Após a incubação, foram adicionados 50 μL de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), na concentração de 2 mg mL^{-1} . A placa foi novamente incubada por 4 h a 37 °C 5% de CO_2 (protegida da luz) e adicionado 150 μL de DMSO, seguido da leitura em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm. A concentração inibitória para 50% das células (CI_{50}) foi determinada como a concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas em comparação com o controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos (BOGO, 2012). A seletividade do extrato e frações foi realizada de acordo com Suffines e Pezzuto (1991). Os IS foram obtidos a partir da razão entre os valores da CI_{50} das células não tumorais e CI_{50} das células tumorais expresso na equação: $\text{IS} = \text{CI}_{50}/\text{CI}_{50}$. Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 para indicar se a amostra é duas vezes mais ativa em células tumorais do que células normais.

4.9 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Todos compostos isolados foram submetidos a análise por RMN ^1H . As análises foram realizadas no Instituto de Química-USP, utilizando o equipamento Bruker Avance III 500 MHz, com 600 μL de amostra diluída em DMSO deuterado (99,9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc, MA, USA). Os espectros foram analisados no software TopSpin 4.1.1 (Bruker).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processo de extração

O processo de extração é uma etapa de grande relevância no isolamento de compostos bioativos dos tubérculos da *D. bulbifera*, fatores como: tempo, temperatura, agitação e solvente utilizado interferem diretamente no resultado do extrato produzido.

Os tubérculos foram triturados após a liofilização para que houvesse um aumento da superfície de contato com o solvente, o processo de extração ocorreu sob agitação constante para que o solvente estivesse constantemente em contato com todo o material vegetal e optou-se por conduzir a extração em temperatura ambiente para que não houvesse a formação de artefatos ou decomposição de substâncias.

A partição foi conduzida com os solventes em ordem crescente de polaridade, clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol e água. Os extratos de clorofórmio, acetato de etila e água foram armazenados sob refrigeração para futuros estudos.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de rendimento do extrato *n*-butanólico em escala laboratorial.

Tabela 2 – Rendimento do extrato *n*-butanólico

Planta	Rendimento (%)
<i>Dioscorea bulbifera</i> liofilizada	0,186

Fonte: Autoria própria

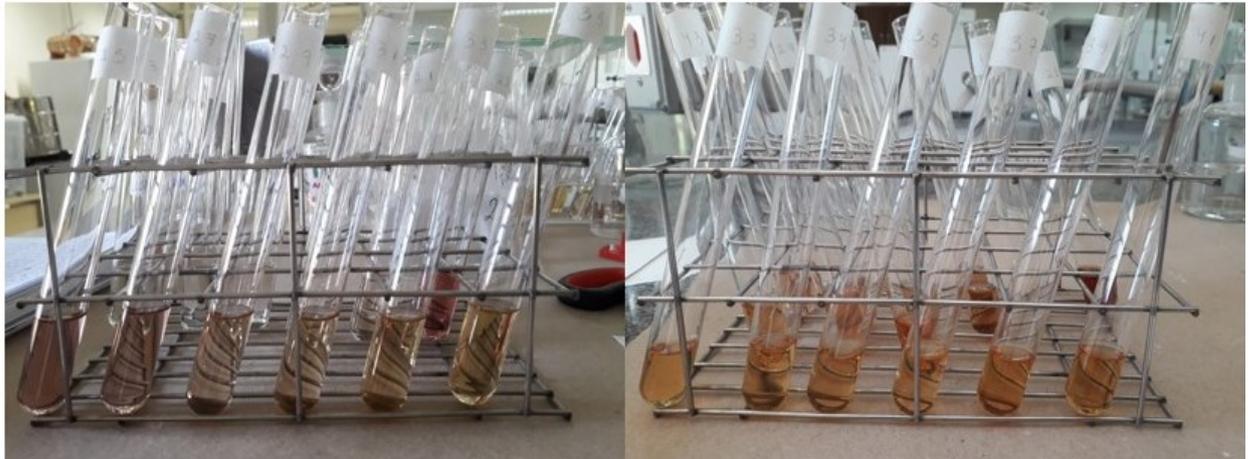
Em comparação com os resultados obtidos por Stadniki (2019), observa-se um rendimento inferior. Isso pode ter ocorrido pela diferença na época da coleta da planta ou grau de pureza dos solventes utilizados no processo extrativo.

Ressalta-se que, neste trabalho estão sendo relatados os resultados de experimentos, obtidos a partir do extrato *n*-butanólico, baseado no fato de que esse extrato, em estudo anterior descrito por STADNIKI (2019), do grupo de pesquisa em Tecnologia de Bioprocessos - GTBio, demonstrou atividades biológicas promissoras, dentre dessas atividades, o extrato *n*-butanólico demonstrou significativa atividade citotóxica frente as linhagens celulares leucêmicas (Raji, K562, Jurkat e HL60).

5.2 Fracionamento

O fracionamento por coluna de sílica flash de 500 mg do extrato *n*-butanólico, possibilitou a separação de 151 frações, coletadas em tubos de ensaio em volumes fixos de 5 mL (Figura 6), observou-se mudanças na tonalidade das colorações conforme alteração do gradiente, indicando uma possível separação de compostos.

Figura 6 – Frações coletadas a partir da coluna flash



Fonte: Autoria própria

A coluna foi acompanhada no visível e com lâmpada UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. A primeira banda de cloração rosa foi observada no comprimento de onda de 365 nm e eluiu com clorofórmio 100%. Essa foi a única banda observada no UV (Figura 7).

Figura 7 – Banda visualizada no UV-365 nm



Fonte: Autoria própria

A avaliação do perfil cromatográfico foi realizada por CCD analítica e após o agrupamento foram obtidas 11 frações, denominadas F1 (2 mg), F2 (2 mg), F3 (2 mg), F4 (4 mg), F5 (30 mg), F6 (33 mg), F7 (38 mg), F8 (300 mg), F9 (145 mg), F10 (19 mg) e F11 (6 mg).

Na Tabela 3 são apresentados os rendimentos das frações, partindo de 500 mg de extrato *n*-butanólico liofilizado.

Tabela 3 – Rendimento das frações obtidas

Fração	Rendimento (%)
F1	0,4
F2	0,4
F3	0,4
F4	0,8
F5	6,0
F6	6,6
F7	7,6
F8	60,0
F9	29,0
F10	3,8
F11	1,2

Fonte: Autoria própria

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3 observa-se que as frações que apresentaram melhores rendimento foram as F8, F9, F7 e F6, as demais frações se apresentaram em quantidades pequenas, tornando a purificação inviável neste estudo.

A coloração das frações F1 a F5 por análise descritiva variou do amarelo claro ao castanho, as demais frações apresentaram a mesma coloração, marrom intensa, como demonstra a Figura 8.

Figura 8 – Coloração das frações obtidas



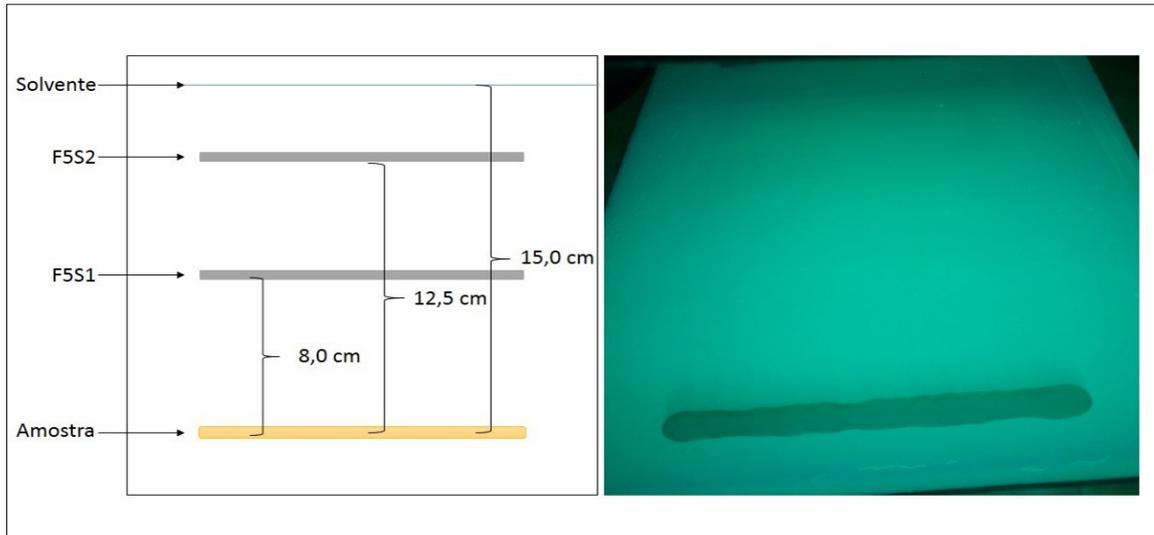
Fonte: Autoria própria

As frações F1, F2, F3 e F4 não prosseguiram para as etapas posteriores de purificação, devido ao baixo rendimento. Já as frações F9, F10 e F11 não foram purificadas devido a sua alta polaridade e dificuldade de solubilização em solventes orgânicos comuns. A partir desse princípio de seleção/exclusão foram obtidos resultados promissores para os solventes testados nas frações F5, F6, F7 e F8.

5.3 Purificação

A Fração F5 foi submetida ao processo de purificação por Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (Figura 9), onde foram observadas duas bandas sob luz UV-254, as bandas foram coletadas, solubilizadas em diclorometano/metanol (50:50), filtradas e secas. As subfrações obtidas foram denominadas F5S1 (12 mg) e F5S2 (5 mg). O valor de RF para a F5S1 foi de 0,53 e para a F5S2 de 0,83.

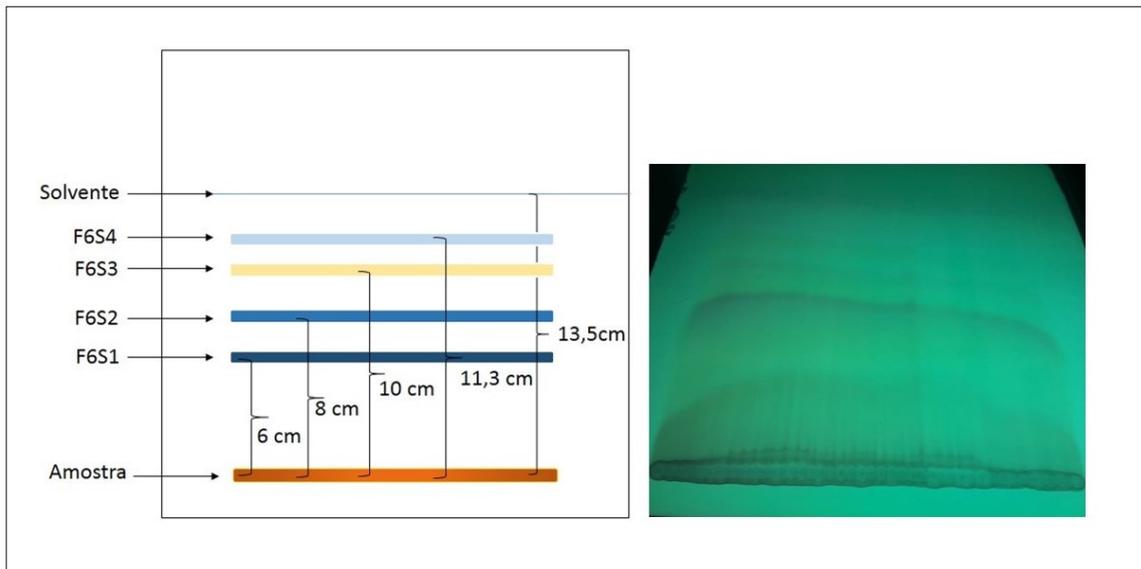
Figura 9 – CCDP da fração F5



Fonte: Autoria própria

A fração F6 foi purificada por CCD preparativa (Figura 10). Foram observadas quatro bandas sob luz UV-254, denominadas de F6S1 (2 mg) com RF de 0,44, F6S2 (2 mg) com RF de 0,59, F6S3 (2 mg) com RF de 0,74 e F6S4 (1mg) com RF de 0,84.

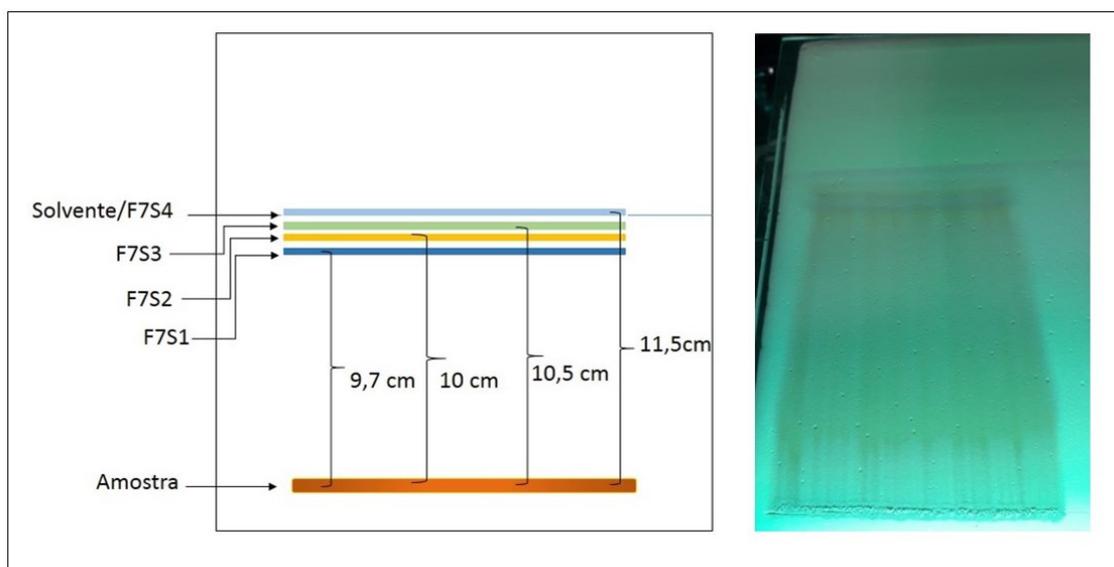
Figura 10 - CCDP da fração F6



Fonte: Autoria própria

A purificação por CCDP da fração F7 (Figura 11) resultou em quatro bandas visualizadas no UV-254, identificadas como F7S1 (6 mg) com RF de 0,84, F7S2 (1,2 mg) com RF de 0,87, F7S3 (3,5 mg) com RF de 0,91, F7S4 (8 mg), sendo que esta última eluiu juntamente com o solvente tendo um RF de 1. Após a coleta das bandas, todo o restante da placa foi coletado para posterior repurificação, essa amostra foi denominada F7-O.

Figura 11 – CCDP da fração F7



Fonte: Autoria própria

Por possuir uma polaridade maior, optou-se por purificar a fração F8 em coluna aberta, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária (Figura 12). A eluição foi feita com metanol 100% e não foi possível observar uma separação aparente, além da mudança na tonalidade da coloração das subfrações obtidas.

Figura 12– Coluna aberta com Sephadex LH-20



Fonte: Aatoria própria

A partir da coluna de Sephadex LH-20 foram coletadas 33 subfrações (Figura 12), todas foram avaliadas quanto a seu perfil cromatográfico por CCD analítica e posteriormente agrupadas e secas. As subfrações obtidas foram denominadas F8S1 (32 mg), F8S2 (41 mg) e F8S3 (21 mg).

Figura 13 – Subfrações provenientes da coluna aberta com Sephadex LH-20

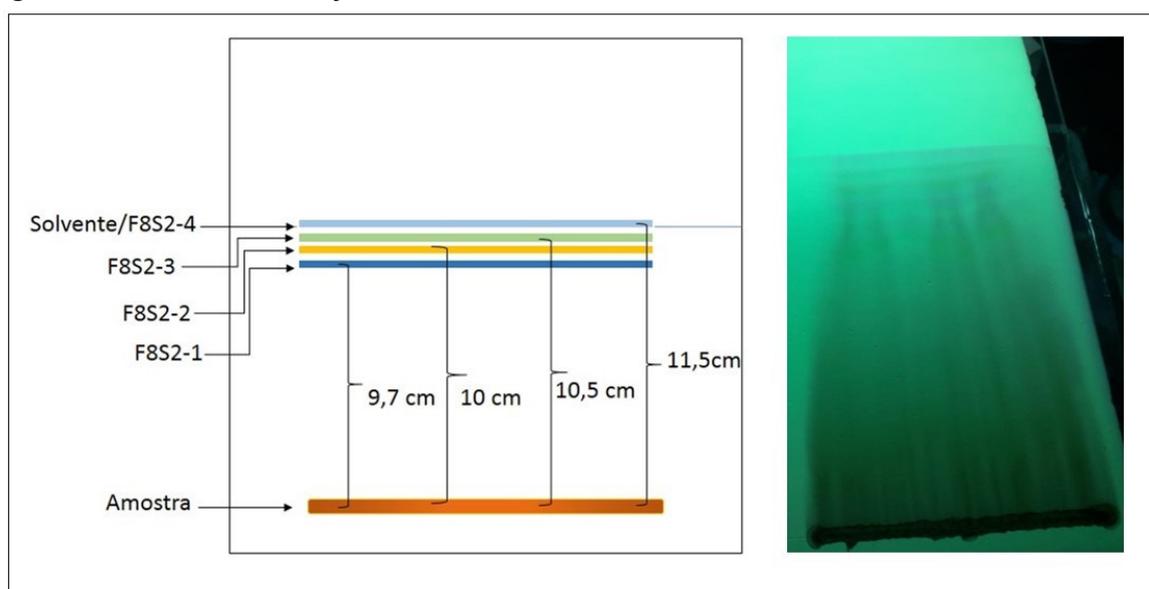


Fonte: Aatoria própria

A subfração F8S2 foi submetida ao processo de purificação por CCDP. Foram visualizadas quatro bandas sob luz UV-254, as bandas coletadas foram denominadas F8S2-1 (5 mg) com RF de 0,84, F8S2-2 (4 mg) com RF de 0,87, F8S2-3 (1mg) com RF de 0,91 e F8S3-4 (5 mg) com RF de 1 (Figura 14).

Observou-se uma coloração intensa na origem, indicando a presença de uma grande quantidade de amostra residual, por esse motivo a origem foi coletada para posterior repurificação, essa amostra foi denominada F8S2-O.

Figura 14 – CCDP da subfração F8S2



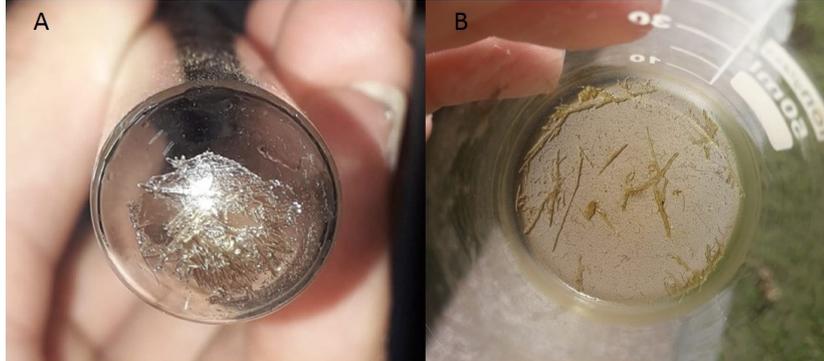
Fonte: Autoria própria

As origens das CCDs preparativas das frações F7 (F7-O) e F8S2 (F8S2-O) foram coletadas. Após a realização de CCD analítica observou-se uma grande semelhança das amostras e optou-se por agrupá-las, resultando na F78S2-O, que foi submetida a separação por coluna de sílica flash. Foram obtidas 85 subfrações de 5 mL cada, coletadas em tubos de ensaio.

Observou-se a formação de pequenos cristais transparentes no formato de agulhas no fundo da maior parte dos tubos e uma substância de coloração amarelada nas paredes (Figura 15A). A formação de cristais é um indicativo de substância pura, por esse motivo essas subfrações foram agrupadas para a obtenção de uma quantidade maior de cristais, (Figura 15B), que foram coletados

com o auxílio de uma pinça e denominados F78S2-1 (7 mg). A porção residual de coloração amarela também foi agregada e denominada F78S2-2 (25 mg).

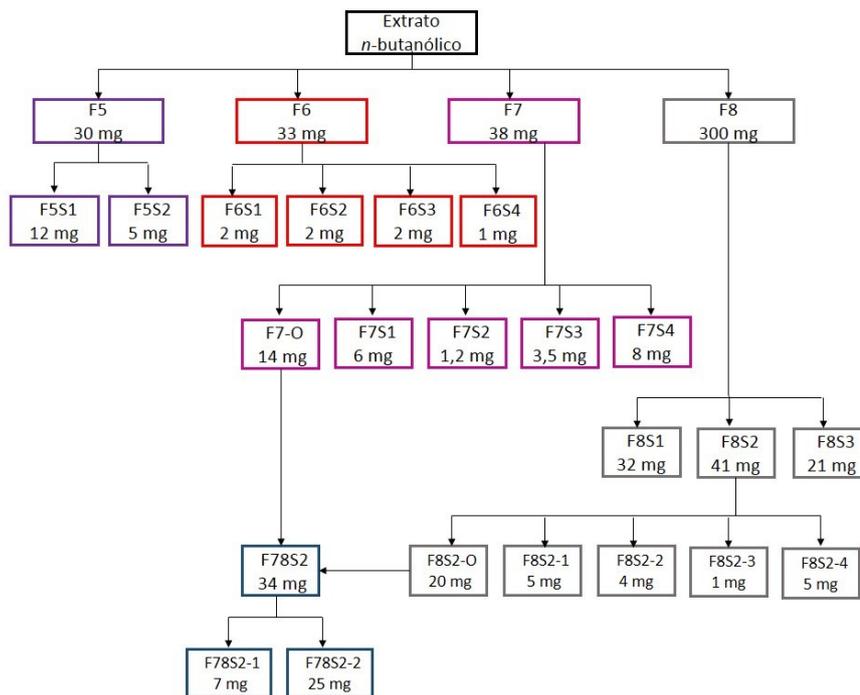
Figura 15 – A: Cristais formados nos tubos de ensaio, B: Cristais após o agrupamento



Fonte: Autoria própria

Na Figura 16 é apresentado o fluxograma do processo de purificação das frações.

Figura 16 – Fluxograma do processo de purificação



Fonte: Autoria própria

5.4 Identificação das substâncias isoladas

A substância F5S1, 12 mg, se apresentando na forma de um pó levemente amarelado foi isolada a partir da fração F5. Está sendo apresentada com base no trabalho de Liu et al. (2011), cujos dados espectroscópicos (RMN ^1H), são

semelhantes aos atribuídos ao composto 18, uma diarilheptanona associada a uma porção dihidrofenantreno, obtida de extrato polar de *D. bulbifera*. Na Tabela 4 está sendo relatado a comparação entre os dados espectroscópicos da literatura e os obtidos para a substância F5S1.

Tabela 4 – Comparação entre os espectros de RMN ¹H proposto por Liu et al. (2011) e da substância F5S1

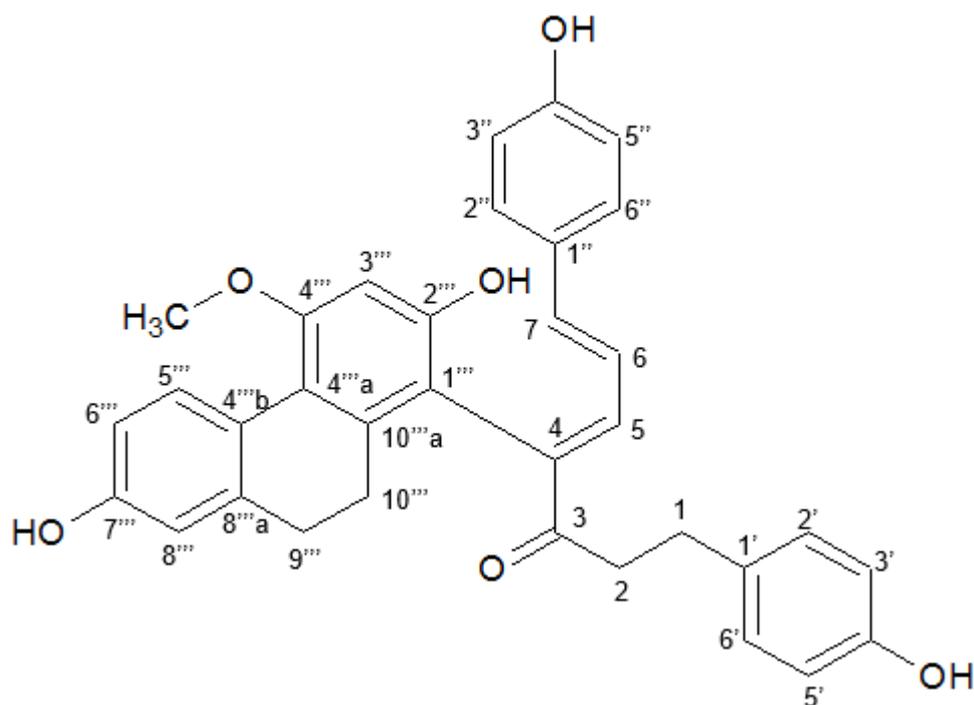
	δ 1H (J em Hz) – Liu et al. (2011)	δ 1H (J em Hz) – Amostra F5S1
CH ₂ (1)	2,64-2,67 m	2,37 m
CH ₂ (2)	2,62-2,65 m	2,28 m
C(3)		
C(4)		
H-C(5)	7,38 d (11,1)	7,97 d (10,80)
H-C(6)	6,22 dd (15,5;11,1)	6,58 dd (17,00; 10,80)
H-C(7)	6,83 d (15,5)	6,06 d (16,04)
C(1')		
H_C(2')	6,82 d (8,5)	7,09 d (7,84)
H_C(3')	6,54-6,56 m	6,83 m
C(4')		
H_C(5')	6,54-6,55 m	6,83 m
H_C(6')	6,82 d (8,5)	7,09 d (7,84)
C(1'')		
H_C(2'')	7,05 d (8,7)	7,50 d (8,07)
H_C(3'')	6,55-6,57 m	7,68 m
C(4'')		
H_C(5'')	6,55-6,57 m	7,68 m
H_C(6'')	7,05 d (8,7)	7,50 d (8,07)
C(1''')		
C(2''')		
H_C(3''')	6,42 s	6,02 s
C(4''')		
MeO-C(4''')	3,56 s	3,58 s
C(4''')a)		
C(4''')b)		
H_C(5''')	8,13 d (8,6)	8,08 d (10,80)
H_C(6''')	6,55-6,57 m	7,68 m
C(7''')		
H_C(8''')	6,50 d (2,6)	5,18 d (3,71)
C(8''')a)		
CH ₂ (9''')	2,39-2,40 m	2,13 m
CH ₂ (10''')	2,22-2,25 m	1,97 m
C(10''')a)		

Fonte: Autoria própria

Ao analisar os dados espectroscópicos apresentados na Tabela 4, pode-se observar dois sistemas A₂X₂ de dois anéis *para*-substituídos (δ (H) 6,83; δ (H) 7,09, e

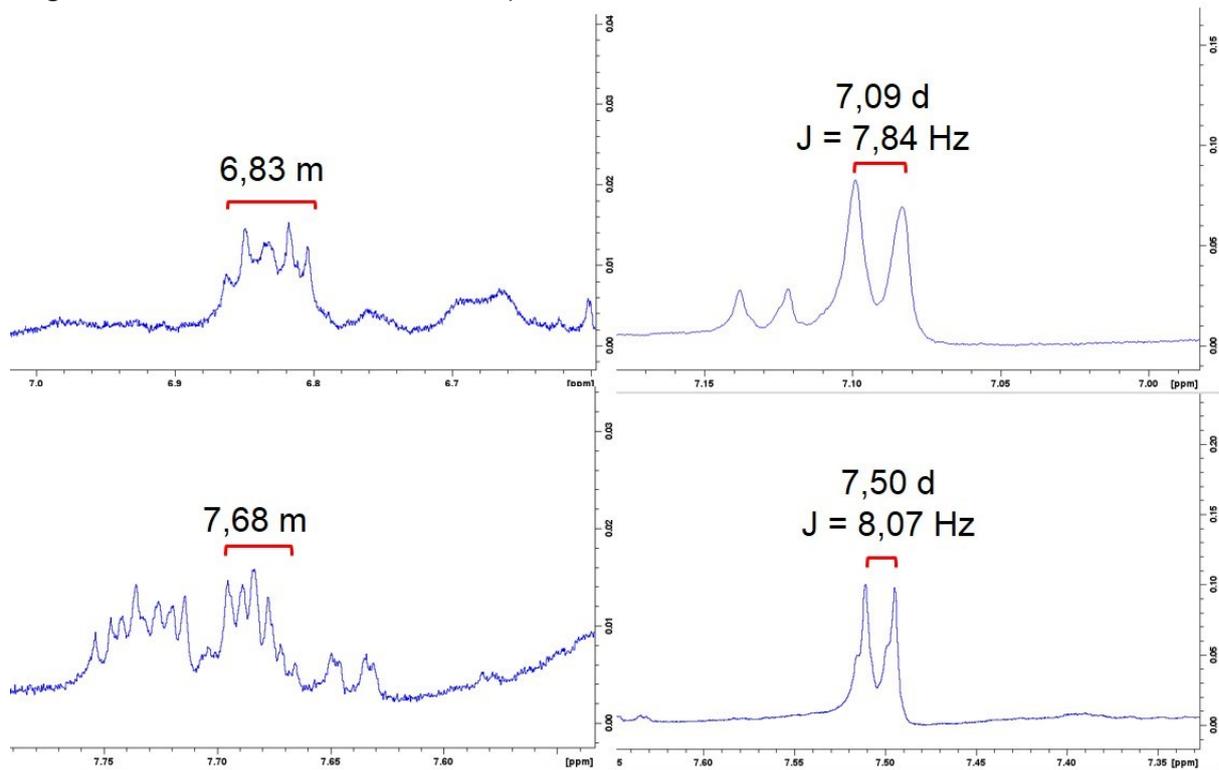
δ (H) 7,68; δ (H) 7,50). Um sistema ABX devido a um anel aromático (δ (H) 5,18 (d, $J=3,71$, H – C (8''')), 7,68 (m, H – C (6''')) e 8,08 (d, $J=10,80$, H – C (5'''))). Um anel benzênico pentassubstituído (δ (H) 6,02 (s, H–C(3'''))), três átomos de hidrogênio olefínicos, (δ (H) 7,97 (d, $J=10,80$, H–C(5)), δ (H) 6,58 (dd, $J=17,00$, $10,80$, H–C(6)), δ (H) 6,06 (d, $J=16,04$, H–C(7))). Além disso, apresenta um grupo MeO (δ (H) 3,58 (s, MeO–C(4''')) e quatro grupos CH₂ (δ (H) 2,37 (m, CH₂(1)), δ (H) 2,28 (m, CH₂(2)), δ (H) 2,13 (m, CH₂(9''')), δ (H) 1,97 (m, CH₂ (10'''))). A ligação C(5)–C(6) apresenta configuração *cis*, revelada pela constante de acoplamento J (H,H) no valor de 10,80 Hz, dos átomos de H olefínicos em H–C(5) (δ (H) 7,97 (d, $J=10,80$)) e H–C(6) (δ (H) 6,58 (dd, $J=17,00$, $10,80$)), enquanto a constante de acoplamento maior, J (H–H) no valor de 17,00 Hz indica configuração *trans* para a ligação C(6)=C(7). Os dados acima, estão em consonância com os valores da literatura citada, possibilitando a definição da estrutura completa de F5S1, conforme mostrado na Figura 17, ou seja, diobulbinona A.

Figura 17 - Diobulbinona A



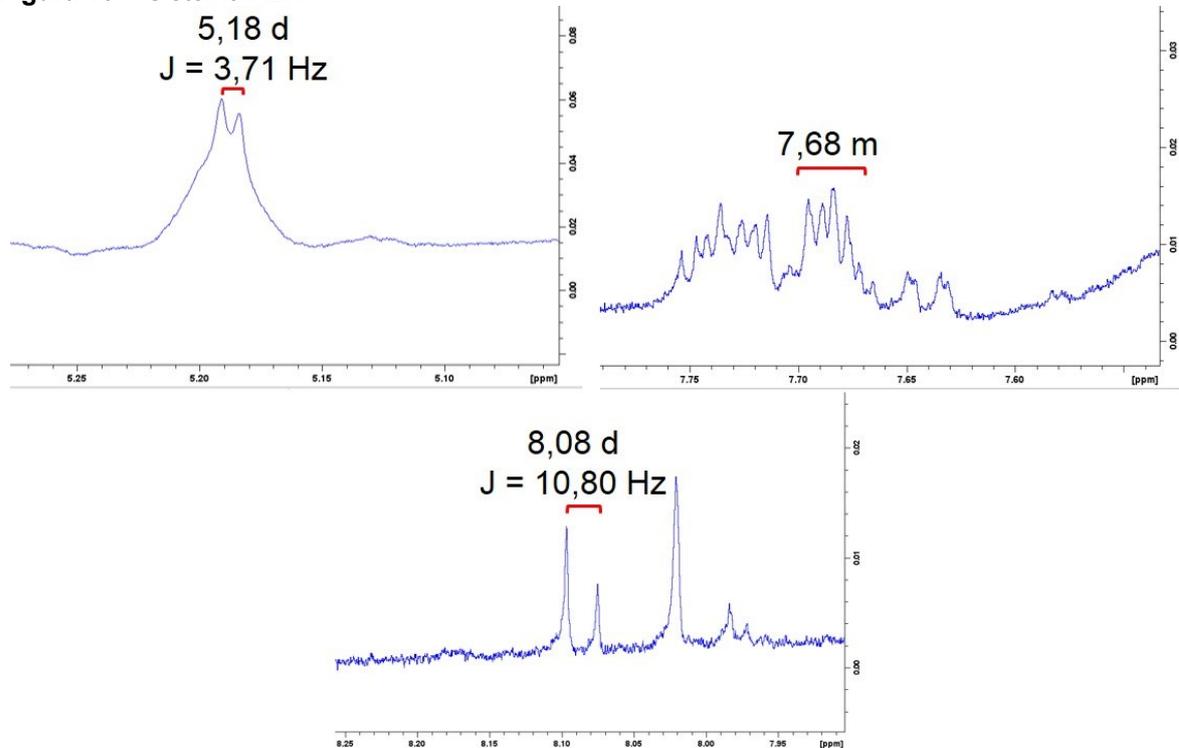
Fonte: Autoria própria

Figura 18 - Sistemas A_2X_2 de dois anéis *para*-substituídos



Fonte: Autoria própria

Figura 19 – Sistema ABX



Fonte: Autoria própria

A substância F5S2, 5 mg, se apresentando na forma de um pó levemente amarelado foi isolada a partir da fração F5. Está sendo apresentada com base no trabalho de Wang et al. (2009), cujos dados espectroscópicos (RMN ^1H), são semelhantes aos atribuídos ao composto 1, apresentando esqueleto norditerpenoide denominada diosbulbina I, obtida de extrato polar de *D. bulbifera*. Na Tabela 5 está sendo relatada a comparação entre os dados espectroscópicos da literatura e os obtidos para a substância F5S2.

Tabela 5- Comparação entre os espectros de RMN ^1H proposto por Wang et al. (2009) e da substância F5S2

	δ 1H (J em Hz) – Wang et al. (2009)	δ 1H (J em Hz) – Amostra F5S2
1	2,16 m	2,22 m
	1,45 m	0,92 m
2	4,85 m	4,30 m
3	1,78m	1,00 m
	2,50 m	2,47 m
4	2,69 m	2,70 m
5	2,22 ddd (1,7;2,7;12,6)	2,05 m
6	5,48 m	5,47 m
7	2,25 m	2,34 m
	1,92 m	1,54 m
8	3,01 dd (3,5; 12,3)	3,63 dd (6,4; 11,4)
9	-	-
10	2,37 ddd (5,3; 12,2; 12,6)	2,43 m
11	1,85 dd (11,2; 14,2)	1,22 dd (10,43; 15,78)
	1,88 dd (5,9; 14,2)	1,43 dd (6,7; 14,5)
12	5,41 ddd (0,6; 5,9; 11,2)	5,42 m
13	-	-
14	6,43 dd (0,8;2,0)	6,87 m
15	7,43 dd (1,6; 2,0)	7,32 m
16	7,48 m	7,48 m
17	-	-
19	-	-
20	1,04 s	1,29 s
1'	-	-
2',6'	6,89 d (8,8)	7,18 d (8,2)
3',5'	7,51 d (8,8)	7,43 d (8,0)
4'	-	-
7'	7,68 d (16,0)	7,56 d (7,8)
8'	6,35 d (16,0)	7,14 d (7,8)
9'	-	-
OCH3	3,83 s	3,57 s

Fonte: Autoria própria

Considerando que esta substância não está pura e, com base apenas nos espectros de RMN ^1H , algumas diferenças de multiplicidades e ou valores de constantes de acoplamento estão sendo relatadas. O átomo de hidrogênio, ligado ao C-12 ($\delta(\text{H})$ 5,42) apresenta-se como um multipletto, resultado do acoplamento ax-ax com o próton em C-11 ($\delta(\text{H-11}\beta)$ 1,22) e ($\delta(\text{H-11}\alpha)$ 1,43). No artigo relatado, a absorção do H ligado ao C-12 ocorre em 5,41 ppm e a multiplicidade como ddd (0,6 Hz; 5,9 Hz e 11,2 Hz). O próton em C-8 ($\delta(\text{H})$ 3,63) acopla apenas com os prótons em C-7 ($\delta(\text{H-7}\beta)$ 2,34; ($\delta(\text{H-7}\alpha)$ 1,54) com as constantes de acoplamento de 11,4 Hz (ax – ax) em relação a H-7 β e 6,4 (ax – eq) em relação a H-7 α . O átomo de hidrogênio, ligado ao C-14 ($\delta(\text{H-14})$ 6,87) apresenta-se como um multipletto resultante do acoplamento (J^3) com o próton em C-15 ($\delta(\text{H-15})$ 7,32) e, acoplamento a longa distância com o H-16. Os demais valores de deslocamentos químicos e suas respectivas multiplicidades estão de acordo com o proposto na literatura citada, portanto, pode-se inferir o isolamento não de forma pura, mas como uma mistura, da diosbulbina I.

Figura 20 – Diosbulbina I

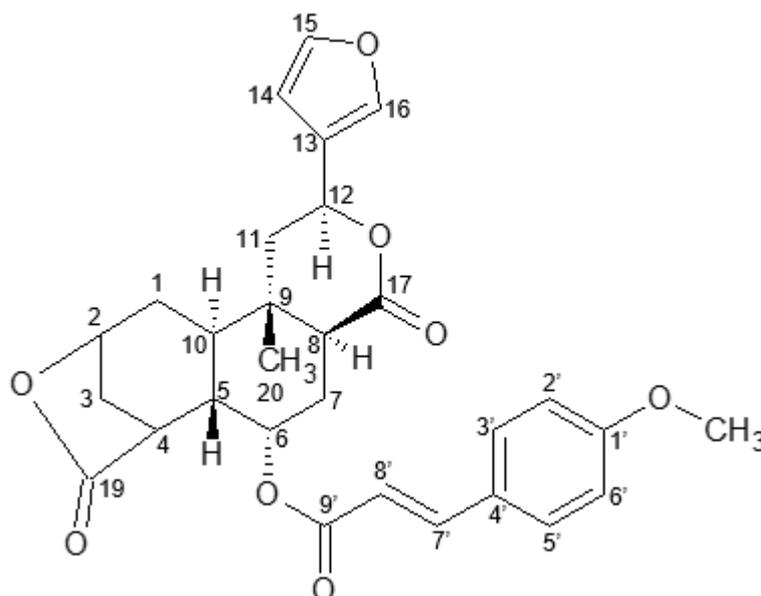
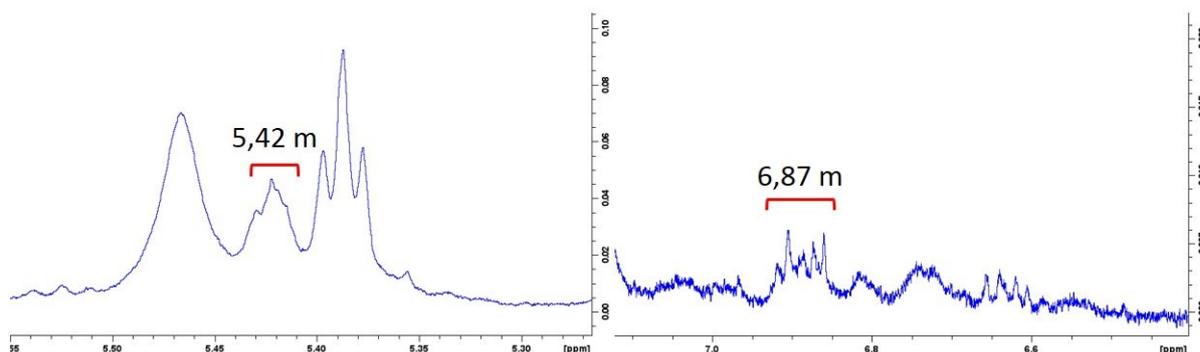


Figura 21 – Multipletos correspondentes aos átomos de H ligados aos C-12 e C-14

Fonte: Autoria própria

Ainda considerando que a substância F5S2 não esteja pura, na Tabela 6 está sendo relatado outra possibilidade de estrutura com base nos dados espectroscópicos obtidos por Wang et al. (2009) para o composto 2.

Tabela 6 - Comparação entre os espectros de RMN ^1H proposto por Wang et al. (2009) e da substância F5S2

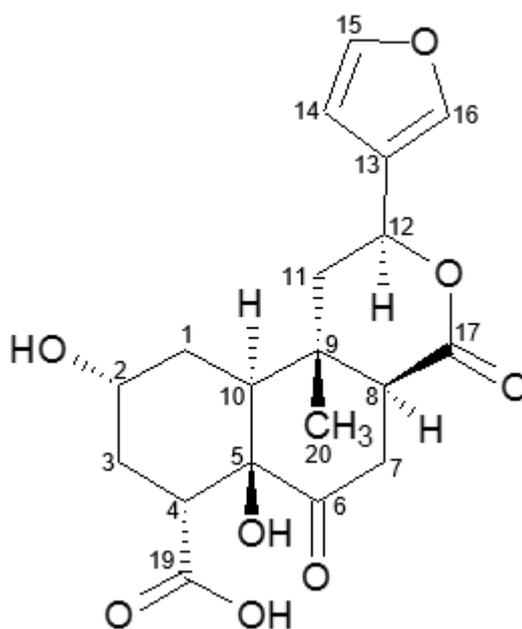
	δ ^1H (J em Hz) – Wang et al. (2009)	δ ^1H (J em Hz) – Amostra F5S2
1	2,01 m 1,57 m	2,22 m 1,54 m
2	4,18 m	4,17 m
3	2,04 m 2,06 m	2,34 m 2,69 m
4	2,97 m	3,63 m
5	-	-
6	-	-
7	2,37 m 2,26 m	2,47m 2,43 m
8	2,01 dd (3,5;12,3)	2,22 m
9	-	-
10	2,97 dd (4,5; 12,1)	3,63 m
11	2,17 dd (11,0; 14,2) 1,78 dd (6,1; 14,2)	3,02 s largo 2,05 m
12	5,62 ddd (0,6;6,1;11,0)	5,42 m
13	-	-
14	6,57 m	6,88 m
15	7,58 m	7,74 m
16	7,67 m	7,78 m
17	-	-
19	-	-
20	1,08 s	1,29 s

Fonte: Autoria própria

De acordo com os dados observados no espectro de RMN ^1H , a diferença entre a substância 2 (Wang et al., 2009) e a substância F5S2 consiste basicamente

na multiplicidade de alguns sinais, o que pode ser decorrente do fato de que essa amostra se encontra na forma de mistura, como já foi relatado anteriormente. Portanto, propõem-se a identificação da substância diosbulbina J (Figura 21), um diterpenoide norclerodano.

Figura 22 - Diosbulbina J



Fonte: Autoria própria

A substância F78S2-2, 25 mg, de coloração amarela foi isolada a partir da fração F78S2. Está sendo apresentada com base no trabalho de Gupta e Singh (1989), cujos dados espectroscópicos (RMN ^1H), são semelhantes aos atribuídos ao composto 2, 4,6-dihidroxi-2-*o*-(4'-hidroxibutil) acetofenona (Figura 24 A), obtido de extrato polar de *D. bulbifera*. Na Tabela 7 está sendo relatada a comparação entre os dados espectroscópicos da literatura e os obtidos para a substância F78S2-2.

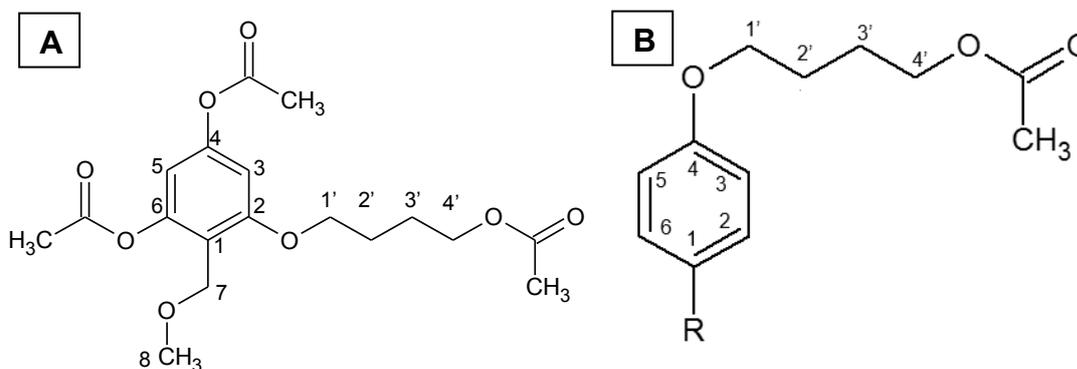
Tabela 7 - Comparação entre os espectros de RMN ^1H proposto por Gupta e Singh (1989) e da substância F78S2-2

	δ 1H (J em Hz) – Gupta e Singh(1989)	δ 1H (J em Hz) – Amostra F78S2-2
2	-	7,15 d (8,00)
3	5,65 s (2,5)	7,56 d (8,00)
5	5,80 d (2,5)	7,15 d (8,00)
6	-	7,15 d (8,00)
8	2,48 s	2,46 s
1'	4,30 t	4,31 t (6,53)
2'	1,79 t	2,26 t (6,43)
3'	1,59 t	2,14 t (6,43)
4'	3,65 dd (11,25;3,40)	3,99 d (5,85)
	3,58 dd (11,25; 7,35)	3,64 quart (12,42;6,74)
Ph-OH	7,90	-
Ph-OMe	13,10	-
-CH ₂ OH	2,62 br t (6,2)	2,18 s

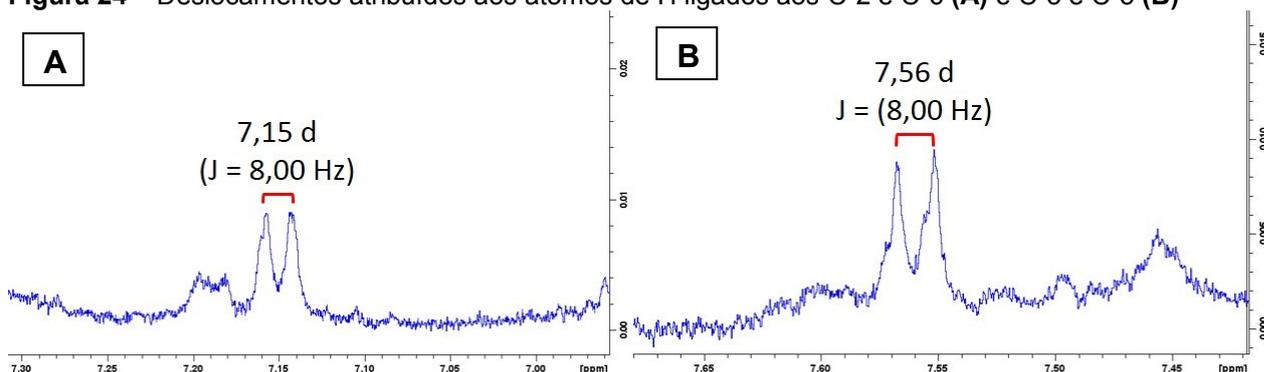
Fonte: Autoria própria

Com base nos dados da literatura propõe-se um composto com estrutura semelhante, exceto em relação à substituição do anel benzênico. Observa-se no espectro de RMN ^1H , os deslocamentos químicos de 7,15 ppm atribuído aos átomos de hidrogênio ligados aos átomos de C-2 e C-6, e de 7,56 ppm aos átomos de carbono C-3 e C-5. A multiplicidade dos sinais (dupletos) e o valor da constante de acoplamento (8,00 Hz - acoplamento *orto*), permitem a atribuição de um sistema *para*-substituído presente na substância F78S2-2. Com os dados espectroscópicos obtidos não foi possível determinar a composição do grupo R mostrado na Figura 24 B.

Figura 23 – A: 4,6-dihidroxi-2-*o*- (4'-hidroxibutil) acetofenona **B:** Estrutura proposta para a amostra F78S2-2



Fonte: Autoria própria

Figura 24 – Deslocamentos atribuídos aos átomos de H ligados aos C-2 e C-6 (A) e C-3 e C-5 (B)

Fonte: Autoria própria

A substância F7S3, 3,5 mg, de coloração marrom foi isolada a partir da fração F7. Está sendo apresentada com base no trabalho de Wang (2018), cujos dados espectroscópicos (RMN ^1H), são semelhantes aos atribuídos ao composto 2, diosbulbiol B, obtido de extrato polar de *D. bulbifera*. Na Tabela 8 está sendo relatada a comparação entre os dados espectroscópicos da literatura e os obtidos para a substância F7S3.

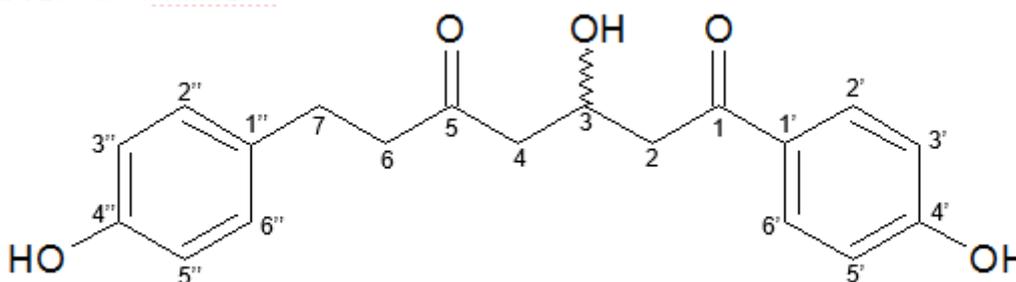
Tabela 8 - Comparação entre os espectros de RMN ^1H proposto por Wang et al. (2018) e da substância F7S3

	δ 1H (J em Hz) – Wang et al. (2018)	δ 1H (J em Hz) – Amostra F7S2-2
1		
2	2,78 m	2,64 m
3	4,62 m	5,33 m
4	2,67 dd (6,2;3,6)	2,13 d (2,78)
5		
6	3,05 dd (8,7;6,3)	2,27 t largo (8,0)
7	2,78 s	2,37 t largo (8,0)
8		
9	7,87 d (8,7)	7,50 d (8,15)
10	6,82 d (8,6)	6,83 d (8,86)
11		
12	6,82 d (8,6)	6,83 d (8,86)
13	7,87 d (8,4)	7,50 d (8,15)
14		
15	7,01 d (8,4)	7,27 d (8,66)
16	6,68 d (8,4)	7,09 d (8,63)
17		
18	6,68 d (8,4)	7,09 d (8,63)
	7,01 d (8,4)	7,27 (8,66)

Fonte: Autoria própria

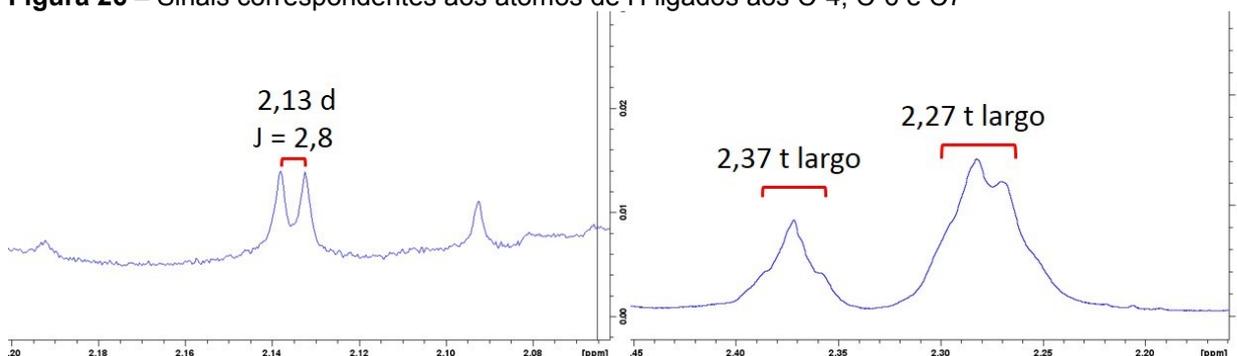
O átomo de hidrogênio, ligado ao C-4 ($\delta(\text{H-4})$ 2,13) apresenta-se como um duplete ($J=2,8$ Hz), resultado do acoplamento com o próton em C-3 ($\delta(\text{H-3})$ 5,33) e não como um duplo duplete ($J=6,2$ Hz; 3,6 Hz) como apresentado no artigo. Os átomos de hidrogênio ligados ao C-6 ($\delta(\text{H-6a e H-6b})$ 2,27) apresentam-se como tripleto largo ($J=8,0$ Hz), resultado do acoplamento com os próton em C-7 ($\delta(\text{H-7a e H-7b})$ 2,37), cuja multiplicidade também apresenta-se como um tripleto largo ($J=8,0$ Hz), em discordância com o apresentado pelo artigo: duplo duplete em 3,05 ppm ($J=8,7$ e $J=6,3$), para os átomos de hidrogênio ligados ao C-6 e singleto em 2,78 ppm correspondendo ao átomo de hidrogênio ligado ao C-7. Apesar disso, é possível considerar a presença na forma de mistura, da substância diosbulbiol B (Figura 26).

Figura 25 - diosbulbiol B



Fonte: Autoria própria

Figura 26 – Sinais correspondentes aos átomos de H ligados aos C-4, C-6 e C7



Fonte: Autoria própria

O composto diosbulbiol B teve sua toxicidade testada contra as células tumorais SMMC7721, MCF-7, K562 e A549 por Wang et al., (2018), entretanto, não demonstrou efeito inibitório contra as linhagens celulares testadas, com $\text{CI}_{50} > 40 \mu\text{M}$.

Os dados apresentados através da análise dos espectros de RMN vêm corroborar com estudos que realizaram prospecção fitoquímica com plantas do mesmo gênero e espécie, que identificaram a presença destes compostos.

Os compostos encontrados neste estudo no extrato *n*-butanólico da espécie em questão, servem de base, possivelmente para a atividade antitumoral do extrato contra células leucêmicas determinada por Stadniki (2019).

Por conseguinte, torna-se necessário testar os compostos isolados frente às células tumorais leucêmicas.

5.5 Atividade antitumoral

O efeito das frações obtidas do extrato *n*-butanólico da *D.bulbifera* sobre a proliferação de células Raji e Jurkat foi estudado pelo método de viabilidade celular com Tetrazólio, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 – Atividade antitumoral de frações do extrato *n*-butanólico da *D.bulbifera*

	Jurkat CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Raji CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
F5	160,3670	0,9200
F6	122,0590	78,0700
F7	106,1960	19,5900
F8	263,1880	5,6400
F9	921,2450	-
F10	83,2934	-
F11	8476,4100	75,2000
G1	7,7120	-
G2	0,0133	165,7000
G3	21,2332	0,3700
DXR	0,0780	0,0017

G1: F3+F4; G2: F8S2-1; G3: F8S2-2
 DRX (doxorubicina): Controle positivo
 Fonte: Autoria Própria.

Através da Tabela 9 é possível observar que as amostras demonstraram resultados mais expressivos frente a linhagem celular Raji, quando comparada a linhagem celular Jurkat. Analisando os resultados de CI_{50} frente a linhagem celular Jurkat, observa-se que as frações F5, F6, F7, F8, F9 e F11 apresentaram resultados menos atrativos, com valores de CI_{50} superiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já a fração F10 apresentou um resultado mais promissor, com valor de CI_{50} de $83,29 \mu\text{g mL}^{-1}$. As subfrações G1, G2 e G3 apresentaram resultados bastante significativos. Dentre

elas, a G2 apresentou o resultado mais promissor em comparação com todas as amostras analisadas, necessitando de uma concentração baixíssima para obter resultados de inibição de 50% da atividade celular, correspondente a $0,0133 \mu\text{g mL}^{-1}$, menor que o valor de CI_{50} encontrado para o controle positivo utilizado, doxorrubicina (DXR) de $0,0780 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Considerando os resultados obtidos para a linhagem celular Raji, observa-se que somente a subfração G2 apresentou valor de CI_{50} superior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As demais frações, apresentaram resultados significativos, sendo que as frações F5 e F8 e subfração G3 apresentaram menores valores de CI_{50} , correspondentes a $0,9200$; $5,6400$ e $0,3700 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Não foi possível calcular os valores de CI_{50} para as amostras F9, F10 e G1.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a ação da *D. bulbifera* frente as linhagens celulares Raji e Jurkat.

Em um estudo realizado com os tubérculos da *D. bulbifera*, obteve-se resultado satisfatório para o extrato de acetato de etila, que exibiu potente ação citotóxica contra as células HCT116, com valor de CI_{50} de $88,49 \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor encontrado se aproxima dos encontrados no presente estudo para a amostra F10, quando testada frente às células Jurkat e amostras F6, F7 e F11 quando testadas frente às células Raji (Hidayat et al., 2018).

Liu et al. (2009) isolaram dez compostos da fração de acetato de etila da *D. bulbifera*, dentre as amostras isoladas a penogenina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosídeo e pennogenina-3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 4) - [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)] - β -D-glucopiranosídeo exibiram resultados promissores no combate as células de carcinoma hepatocelular humano SMMC7721, com valores de CI_{50} de $3,52$ e $3,76 \mu\text{g mL}^{-1}$, que se aproximam aos encontrados no presente estudo para as amostras G1 e G2 frente às células Jurkat e amostras F5, F8 e G3 frente às células Raji.

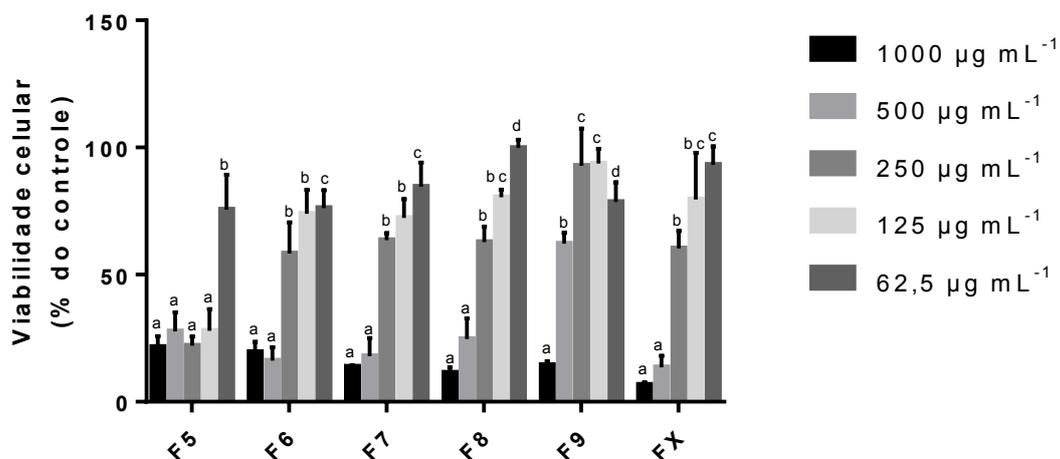
CHEN et al. (2013), testaram diferentes concentrações do extrato etanólico da *D. bulbifera* em células de carcinoma gástrico SGC-7901 e obtiveram 50% de inibição do crescimento do tumor a partir da concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dentre as amostras testadas no presente estudo, somente as amostras F9 e F11 apresentaram valores de CI_{50} superiores, todas as outras amostras apresentaram valores consideravelmente inferiores aos encontrados no estudo relatado.

A quantidade necessária de uma droga controle para atingir níveis consideráveis de inibição do crescimento celular, normalmente é baixa, no entanto, quando utilizamos extratos de plantas, ou mesmo frações, são necessárias concentrações maiores para atingir os mesmos resultados. Isso se deve ao fato de que extratos e frações, são compostos por diferentes substâncias, que por sua vez, possuem diferentes propriedades biológicas. Difícilmente todas as substâncias presentes em uma fração apresentam resultados satisfatórios contra o câncer. Com isso, surge a necessidade de se isolar e identificar as substâncias responsáveis pela ação antitumoral desempenhada pela planta, para que seja possível a utilização desses compostos em concentrações tão baixas quanto as utilizadas para os medicamentos convencionais.

5.6 Atividade citotóxica

O extrato *n*-butanólico, bem como suas frações de maior rendimento foram avaliados quanto a citotoxicidade em células renais das linhagens Vero e LCC-MK₂ pelo método MTT. A viabilidade celular das células Vero pode ser visualizada na Figura 28.

Figura 27 – Viabilidade celular das células Vero (Comparação entre as amostras na mesma concentração)



FX: Extrato *n*-butanólico

Comparação entre as amostras nas mesmas concentrações. Letras minúsculas iguais na mesma concentração de amostras diferentes indicam ausência de diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Autoria Própria.

Por meio da análise gráfica é possível observar que na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve uma redução média de 85% da viabilidade celular, e nenhuma das amostras diferiram estatisticamente. Na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ainda existe uma redução significativa da viabilidade celular, sendo que a amostra F9, diferiu significativamente de todas as outras, propiciando a maior viabilidade celular nessa concentração, correspondente a 62%. As demais amostras não diferiram significativamente entre si, possibilitando uma viabilidade celular média de 20%.

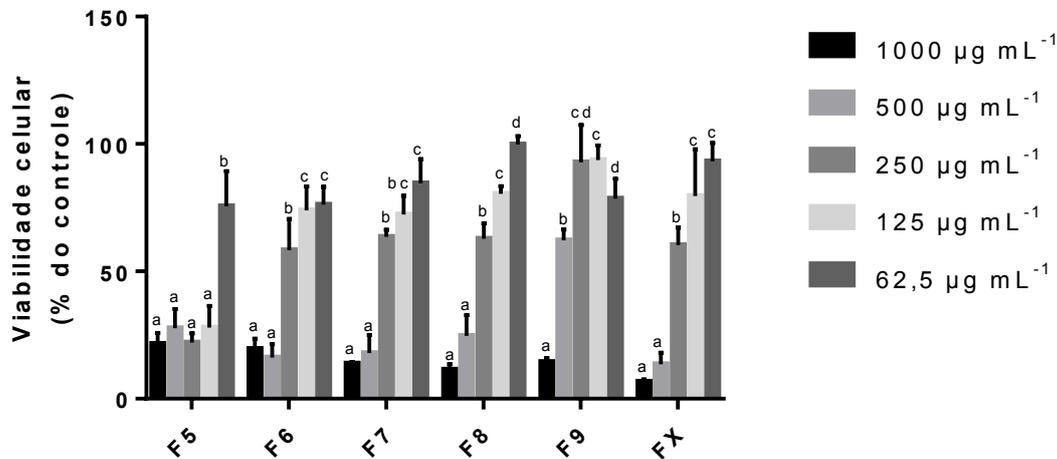
Na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a amostra F5 diferiu significativamente de todas as outras, com a menor viabilidade celular nessa concentração, correspondente a 22%. Já a amostra F9, também diferiu de todas as outras, no entanto, possibilitou uma viabilidade celular consideravelmente maior, correspondente a 93%. As demais amostras apresentaram uma viabilidade celular média de 61%.

Na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o mesmo padrão se repetiu, sendo que a amostra F5 possibilitou uma viabilidade celular de 28% e a amostra F9 de 94%. A média da viabilidade celular das demais amostras foi de 77%.

Na concentração de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as amostras F8 e FX apresentaram menor toxicidade não diferindo estatisticamente entre si e diferindo das demais amostras, com uma média de viabilidade celular de 97%. A média da viabilidade celular das demais amostras foi de 79%.

Na Figura 29 é apresentado o mesmo gráfico de viabilidade celular em células Vero, entretanto, a comparação realizada através do teste de Tukey foi aplicado para diferentes concentrações em uma única amostra.

Figura 28 – Viabilidade celular das células Vero (Comparação entre as concentrações de cada amostra)



FX: Extrato *n*-butanólico

Comparação entre as concentrações de uma única amostra. Letras minúsculas iguais em concentrações diferentes de uma mesma amostra indicam ausência de diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Autoria Própria.

Em relação a amostra F5, a viabilidade celular na concentração de 62,5 µg mL⁻¹ foi a única que diferiu estatisticamente das demais concentrações, mostrando-se bastante superior, com valor de 75%.

No que se refere a amostra F6, as concentrações que possibilitaram maior viabilidade celular, correspondente a 75% foram as de 62,5 e 125 µg mL⁻¹, não diferindo estatisticamente entre si. A viabilidade celular na concentração de 250 µg mL⁻¹ foi de 58%, diferindo estatisticamente de todas as outras concentrações. As concentrações de 1000 e 500 µg mL⁻¹, possibilitaram uma viabilidade celular média de 18%, não diferindo entre si e diferindo de todas as outras concentrações, o mesmo padrão foi observado para a amostra FX.

Em relação a amostra F7, as concentrações que possibilitaram maior valor de viabilidade celular, correspondente a 78%, foram as de 62,5 e 125 µg mL⁻¹, não diferindo entre si.

No que se refere a amostra F8, não houve diferença estatística entre as viabilidades celulares obtidas para as concentrações de 500 e 1000 µg mL⁻¹, que apresentaram valores inferiores a 50%. As outras concentrações possibilitaram viabilidades celulares superiores a 50% e diferiram estatisticamente entre si, sendo

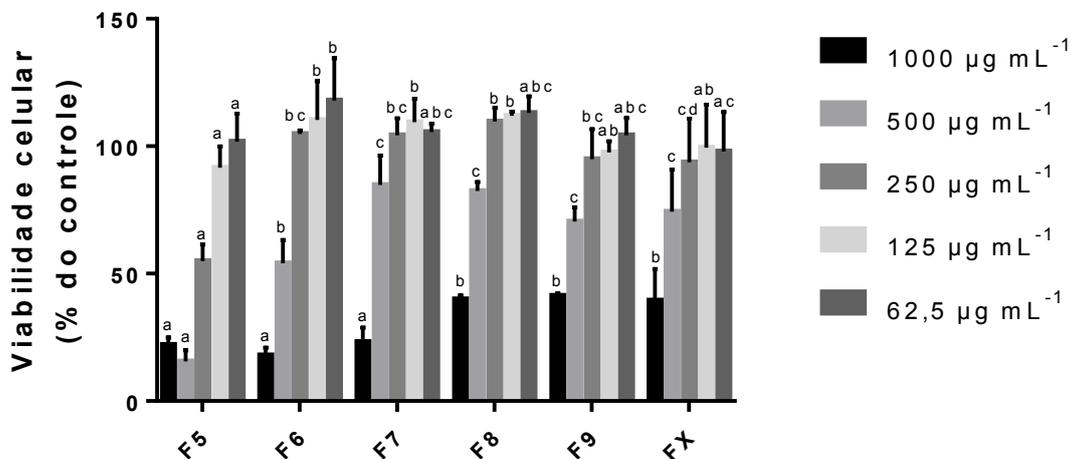
que a concentração que permitiu maior viabilidade celular foi a de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ correspondente a 99%.

No que diz respeito a amostra F9, as concentrações que possibilitaram maior viabilidade celular foram as de 125 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, com viabilidade celular média de 93%.

Com base nos resultados, observa-se que para as amostras F6, F7, F8 e FX, a viabilidade celular é superior a 50% em concentrações inferiores a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. No que se refere a amostra F9, a viabilidade celular é superior a 50% em concentrações inferiores a $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e em relação a amostra F5 que se mostrou mais tóxica para as células Vero, a viabilidade celular é superior a 50% em concentrações inferiores a $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Figura 30 é apresentado o gráfico de viabilidade celular de células LLC-MK₂ frente ao extrato *n*-butanólico (FX) e suas frações.

Figura 29 - Viabilidade celular das células LLC-MK₂ (Comparação entre as amostras na mesma concentração)



FX: Extrato *n*-butanólico

Comparação entre as amostras nas mesmas concentrações. Letras minúsculas iguais na mesma concentração de amostras diferentes indicam ausência de diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Autoria Própria.

Com base nos resultados visualizados no gráfico pode-se observar que na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ as amostras F5, F6 e F7 não diferiram estatisticamente entre si, possibilitando uma viabilidade celular média de 21%, já as

amostras F8, F9 e FX diferiram significativamente das demais, mas não diferiram entre si, com uma viabilidade celular média de 40%.

Na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ a amostra F5 propiciou uma viabilidade celular de 15%, diferindo estatisticamente de todas as outras. A amostra F6, também diferiu de todas as outras amostras, possibilitando uma viabilidade celular de 54%. As amostras F7, F8, F9 e FX, não diferiram estatisticamente entre si, e possibilitaram uma viabilidade celular média de 78%.

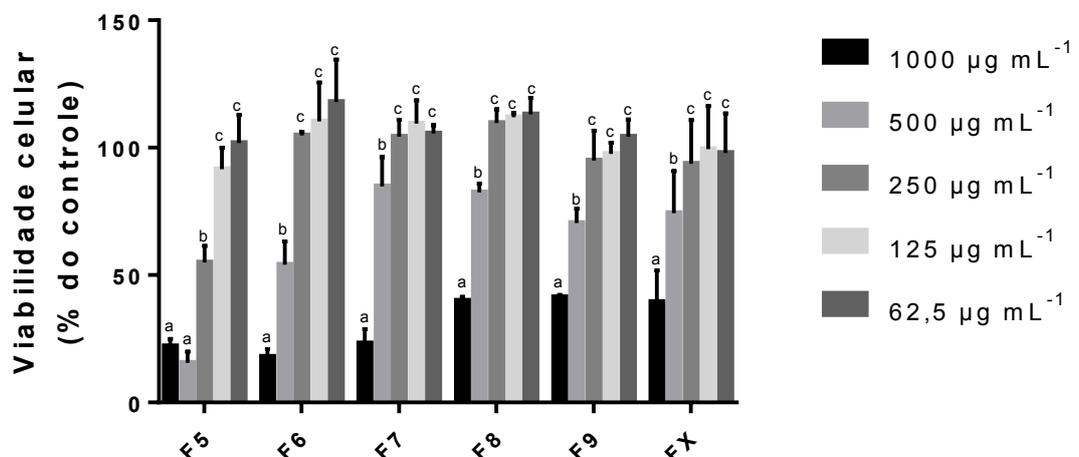
Na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ as amostras F6, F7, F8 e F9 não apresentaram diferenças estatísticas, com viabilidade celular média de 103%. A amostra F5 apresentou uma viabilidade celular inferior, correspondente a 54%, diferindo significativamente de todas as amostras.

Na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ as amostras F6, F7, F8, F9 e FX não apresentaram diferença estatísticas, possibilitando uma viabilidade celular média de 102%. Já a amostra F5 propiciou uma viabilidade celular de 80%.

Na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ as amostras F6, F7, F8 e F9 possibilitaram uma média de viabilidade celular de 107%.

Na Figura 31 o gráfico de viabilidade celular em células LLC-MK₂, tem comparação realizada por meio do teste de Tukey que foi aplicado para diferentes concentrações em uma única amostra.

Figura 30 - Viabilidade celular das células LLC-MK₂ (Comparação entre as concentrações de cada amostra)



FX: Extrato *n*-butanólico

Comparação entre as concentrações de uma única amostra. Letras minúsculas iguais em concentrações diferentes de uma mesma amostra indicam ausência de diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Autoria Própria.

Em relação a amostra F5, observa-se que nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular foi menor, correspondente a 19%. Na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular foi de 54% diferindo estatisticamente de todas as outras. Já nas concentrações de 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a média da viabilidade celular foi de 91%.

No que se refere a amostra F6 as concentrações 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não demonstraram diferenças estatísticas, com viabilidade celular média de 109%. Na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular foi de 18% e em 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular foi de 54%. As demais amostras repetiram o mesmo padrão.

Com base nos resultados obtidos, nota-se que as amostras F6, F7, F8, F9 e FX possibilitam uma viabilidade celular das células LLC-MK₂ superior a 50% em concentrações inferiores a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já a amostra F5 possibilita uma viabilidade celular superior a 50% em concentrações inferiores a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Tabela 10 são apresentados os valores de Cl_{50} das amostras frente as células Vero e LLC-MK₂.

Tabela 10 - Cl_{50} frente as linhagens celulares renais Vero e LLC-MK₂

	Vero Cl_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LLC-MK ₂ Cl_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
F5	125,76 \pm 5,96	278,82 \pm 14,73
F6	236,90 \pm 48,96	599,68 \pm 40,23
F7	274,45 \pm 37,51	864,86 \pm 88,22
F8	303,80 \pm 30,59	930,57 \pm 11,75
F9	724,48 \pm 63,87	840,17 \pm 41,89
FX	267,54 \pm 47,61	849,44 \pm 127,72

FX: Extrato n-butanólico
Fonte: Autoria Própria.

Com base na tabela 10, observa-se que para as células LLC-MK₂ os valores de Cl_{50} mostram-se superiores aos valores obtidos para as células Vero, demonstrando que as amostras testadas exibiram menor toxicidade às células LLC-MK₂.

Vijayarathna e Sasidharan (2012) testaram a viabilidade celular das células Vero frente a diferentes concentrações do extrato metanólico da planta *Elaeis guineenses*. A concentração de extrato necessária para inibir o crescimento celular em 50% (Cl_{50}) foi de 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato metanólico da planta *Elaeis guineenses*

se mostrou mais tóxico do que o extrato *n*-butanólico e suas frações testadas no presente estudo.

Em um estudo realizado com o extrato metanólico da planta *Solanum Nigrum*, obteve-se o valor de CI_{50} correspondente a $6862 \mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando baixíssima toxicidade frente a linhagem celular Vero (PATEL et al., 2009). Nenhuma das amostras testadas no presente estudo apresentaram uma citotoxicidade tão baixa quanto a relatada para a planta *Solanum Nigrum*.

Eseyin et al. (2021) estudaram a citotoxicidade de diferentes plantas frente as células LLC-MK₂. As plantas *Anthocleista djalonensis*, *Carica papaya*, *Cleistopholis patens*, *Heterotis rotundifolia*, *Hippocratea africana*, *Homalim letestui*, *Ocimum gratissimum*, *Starchystarpheta cayennensis*, foram consideradas não tóxicas, com valores de CI_{50} superiores a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. A planta *Bombax buonopozense* foi considerada de média toxicidade, com valor de CI_{50} de $22,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a planta *Milicia excelsa* foi considerada citotóxica, com valor de CI_{50} de $10,95 \mu\text{g mL}^{-1}$. Considerando o padrão utilizado pelo artigo, nenhuma das amostras avaliadas no presente estudo apresentou concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular inferior a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, podendo ser consideradas de baixa toxicidade.

Não foram encontrados na literatura consultada, estudos com a *D. bulbifera* frente as linhagens celulares Vero e LLC-MK₂.

Na Tabela 11 são apresentados os índices de seletividade (IS) das amostras F5, F6, F7, F8 e F9 para a atividade antitumoral em relação às células Jurkat.

Tabela 11 – Índice de Seletividade (IS) para atividade antitumoral em relação às células Jurkat e Raji

	Jurkat		Raji	
	IS (Vero)	IS (LLC-MK ₂)	IS (Vero)	IS (LLC-MK ₂)
F5	0,78	1,74	130,69	303,06
F6	1,94	4,91	3,03	7,68
F7	2,58	8,14	14,00	44,14
F8	1,15	3,53	53,86	164,99
F9	0,78	0,91	-	-

Fonte: Autoria Própria.

O índice de seletividade foi calculado através da razão entre os valores de CI_{50} das amostras frente às células renais e os valores de CI_{50} frente às células tumorais e pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral e uma normal, sugerindo sua potencial utilização como fármaco.

Quanto maior a seletividade de um composto, maior seu potencial quanto a utilização como medicamento, pois indica uma potente ação antitumoral e baixa citotoxicidade frente às células normais. Normalmente considera-se significativo um valor de IS maior ou igual a 2, pois indica que a amostra é duas vezes mais ativa em células tumorais do que em células normais (BASTOS, 2017)

Avaliando os dados apresentados na Tabela 11, observa-se que a amostra F5 se mostrou pouco seletiva em relação as duas linhagens renais quando avaliada quanto ao seu potencial antitumoral frente às células Jurkat. Já em relação às células Raji, a mesma amostra se mostrou consideravelmente seletiva.

No que se refere a amostra F6, observa-se baixa seletividade frente à linhagem celular Vero e uma seletividade significativa frente às células LLC-MK₂, quando avaliada quanto ao seu potencial antitumoral frente às células Jurkat. Em relação às células Raji, a amostra demonstrou uma seletividade significativa.

A amostra F7 demonstrou seletividade significativa frente à linhagem tumoral Jurkat e excelente seletividade frente a linhagem celular Raji em relação as duas linhagens celulares renais.

Em relação a amostra F8, observa-se baixa seletividade frente à linhagem celular Vero e seletividade significativa frente às células LLC-MK₂, quando avaliada quanto a seu potencial antitumoral frente às células Jurkat. Em relação às células Raji, a amostra demonstrou uma seletividade consideravelmente significativa. Já a amostra F9, demonstrou baixa seletividade em relação às células Jurkat.

No que se refere a linhagem tumoral Jurkat, é possível afirmar que a amostra F7 se mostra promissora, apresentando valores de IS superiores a 2 em relação às duas linhagens celulares renais testadas. Já em relação às células Raji, as amostra F5, F6, F7 e F8 se mostram consideravelmente promissoras, com valores de IS notavelmente elevados.

Itharat et al (2004) estudaram algumas plantas tradicionalmente utilizadas na medicina tailandesa para o tratamento de câncer, dentre as plantas avaliadas, as que mais se destacaram foram a *Dioscorea birmanica* e a *Dioscorea membranacea*, cujo extrato aquoso apresentou um alto índice de seletividade, correspondente a 14,2 contra o câncer de mama.

Em um estudo realizado com extratos de *D. bulbifera* em células de câncer de mama T47D. Frações do extrato clorofórmico se mostraram citotóxicas para as

células tumorais e não apresentaram toxicidade significativa para as células vero, com índices de seletividade superiores a 10 (NUR; NIGROHO, 2017).

Os valores encontrados nesses estudos se aproximam aos encontrados para as frações F5, F7 e F8 frente as células Jurkat.

Essa avaliação é considerada importante, visto que uma substância é considerada promissora como fármaco antitumoral se ela apresentar seletividade sobre as células-alvo, sem lesar expressivamente a célula hospedeira (PEÑA; SCARONE; SERRA, 2015).

6 CONCLUSÕES

O processo de fracionamento por técnicas cromatográficas se mostrou eficaz, uma vez que foi possível separar frações distintas entre si e purificá-las, dando origem a diferentes substâncias, que através da análise de RMN ^1H , foi possível propor suas estruturas, como sendo correspondentes aos compostos diobulbinona A, diobulbinona I, diobulbinona J, diosbulbiol B e um composto aromático para-substituído.

As frações F5, F7 e F8 apresentaram excelentes resultados contra a linhagem celular Raji e baixa toxicidade frente as células renais Vero e LLC-MK₂. Já a fração G1 (F3+F4) apresentou excelente resultado frente a linhagem celular Jurkat.

A subfração F8S2-1 (G2) apresentou um resultado bastante promissor frente a linhagem celular Jurkat, com valor de CI_{50} inferior ao obtido para o medicamento controle utilizado (DXR). Já a subfração F8S2-2 (G3) apresentou ótimos resultados frente as linhagens celulares Raji e Jurkat.

Foi possível verificar a presença de compostos com potencial ação antitumoral principalmente nas frações F3, F4, F5, F7 e F8, se destacando a F8 que deu origem a duas subfrações com notáveis resultados contra as células tumorais testadas e apresentou alto rendimento.

O presente estudo permitiu a confirmação da ação antitumoral da *D. bulbifera* contra as linhagens celulares Raji e Jurkat e baixa toxicidade frente as células renais Vero e LLC-MK₂. Por conseguinte, altos índices de seletividade foram encontrados, sugerindo uma futura aplicação dos constituintes da planta em fármacos seletivos que possam ser utilizados no tratamento de leucemias.

Deste modo, sugere-se a continuidade dos estudos, com a finalidade de isolar as substancias presentes nas frações que apresentaram maior ação antitumoral em quantidade suficiente para identificá-las e testá-las quanto a atividade antitumoral e citotóxica in vitro e in vivo.

7 REFERÊNCIAS

- ADESANYA, S. A.; OGUNDANA, S. K.; ROBERTS, M. F. Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *D. dumentorum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 713-174, 1989.
- ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 751-756, 2012.
- ANDRÉS, v.; BUSTAMANTE, R. S. L.; VELANDIA, R. J.; ROJAS, C. M. A.; RAZ, L.; BUITRAGO, H. G. Identificación, establecimiento in vitro y análisis fitoquímico preliminar de espécies silvestres de ñame (*Dioscorea* spp.) empleadas con fines medicinales. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 17, n.1, p. 9-17, 2015.
- ANTONIOLLI, L. R., BENEDETTI, B. C.; DE SOUZA FILHO M. S.; BORGES, M. S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'Pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 157-160, 2005.
- BARREIRA, T. F.; FILHO, P. G. X.; RODRIGUES, V. C. C.; ANDRADE, F. M. C.; SANTOS, R. H. S.; PRIORE, S. E.; PINHEIRO-SANT, A. H. M. Diversidade e equitabilidade de Plantas Alimentícias Não Convencionais na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 964-974, 2015.
- BASTOS, M. L. C. **Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO**. 2017. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2017.
- BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. D.; SCOTT, M. T.; VIEIRA, P. C. A química dos produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de líquens**. 2012. 110f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento) – Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.

BOUCHER, H. W.; AMBROSE, P. G.; CHAMBERS, H. F.; EBRIGHT, R. H.; JEZEK, A.; MURRAY, B. E.; NEWLAND, J. G.; OSTROWSKY, B.; REX, J. H. Developing antimicrobial drugs for resistant pathogens, narrow-spectrum indications, and unmet needs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 2, p. 228-236, 2017.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

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

BRASIL; Ministério da Saúde; Secretaria de Atenção à Saúde; Instituto Nacional de Câncer; Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

CARVALHO, P. C. L. de; CARVALHO R. L. de. Coleção de genótipos silvestres e cultivados de *Dioscorea*. In: Embrapa Semi-árido / Embrapa Recursos Genéticos. (Org.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. 1ª ed. Petrolina, 1999, v. 1, Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/dioscorea.pdf> . Acesso em: Set. de 2021.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 586-591, 2009.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciência da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

ESEYIN, O. A.; ETIM, I. E.; ATTIH, E. E.; JOHNSON, E.; UDOBRE, A. A.; EBONG, A. S.; ZOFOU, D. In vitro antiplasmodial, cytotoxic and antioxidant effects, and phytochemical constituents of eleven plants used in the traditional treatment of malaria in Akwa Ibom State, Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 20, n. 1, p. 105-111, 2021.

FERREIRA, A. B.; MING, L. C.; HAVERROTH, M.; DE LIMA, M. S.; DO NASCIMENTO, M. M. Manejo de variedades locais de *Dioscorea* spp. Em comunidades tradicionais da Baixada Cuiabana em Mato Grosso, Brasil. **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 1, p. 204-219, 2020.

FERREIRA, A. L.; ROCHA, C. P.; VIEIRA, L. M.; SANT'ANA DUSSE, L. M.; D. R. G. J.; CARVALHO, M. G. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, p. 94-101. 2014.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FROTA, R. G.; AMORIM, A. S.; CARNEIRO, J. K. G.; OLIVEIRA, M. A. S. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da infusão de *Plectranthus*

barbatus – Lamiaceae (malva-santa) avaliados pelo sistema teste Allium cepa.

Revista de ciências médicas e biológicas, v. 18, n. 1, p. 67-72, 2019.

GAO, H., KUROYANAGI, M.; WU, L.; KAWAHARA, N.; YASUNO, T.; NAKAMURA, Y. Antitumor-promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1241-1243, 2002.

GHOSH, S.; PARILAR, V. S.; MORE, P.; DHAVALA, D. D.; CHOPADE, B. A.; Phytochemistry and Therapeutic Potential of Medicinal Plant: *Dioscorea bulbifera*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 160-172, 2015.

GHOSH, S.; S, J.; MORE, P.; SHETE, U. J.; MAHESHWARI, N. O.; RAO, S. J.; KITTURE, R.; KALE, S.; BELLARE, J.; PATIL, S.; PAL, J. K.; CHOPADE, A. B. A. *Dioscorea bulbifera* Mediated Synthesis of Novel Au_{core} Ag_{shell} Nanoparticles with Potent Antibiofilm and Antileishmanial Activity. **Journal of nanomaterials**, 2015.

GONZÁLEZ VEGA, M. E. El Ñame (*Dioscorea spp.*). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. **Cultivos Tropicales**, v. 33, n. 4, p. 05-15, 2012.

GOSH, A.; AHIRE, M.; PATIL, S.; JABGUNDE, A.; DUSANE, M. B.; JOSHI, B. N.; PARDESI, K.; JACHAK, S.; DHAVALA, D. D.; CHOPADE, B. A. Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

GOSH, S.; AHIRE, M.; PATIL, S.; JABGUNDE, A.; DUSANE, M. B.; JOSH, B. N.; PARDESI, K.; JACHAK, S.; DHAVALA, D. D.; CHOPADE, B. A. Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera* :Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p 227-234, 2005.

GUPTA, D.; SINGH, J. p-Hidroxi acetophenone derivatives from *Dioscorea bulbifera*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 947-949, 1989.

HIDAYAT, A. F. A.; CHAN, C. K.; MOHAMAD, J.; KADIR, H. A. *Dioscorea bulbifera* induced apoptosis through inhibition of ERK 1/2 and activation of JNK signaling pathways in HCT116 human colorectal carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 806–816, 2018.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat câncer **Journal of Ethnopharmacology**. n. 90, v. 1, p. 33-38, 2004.

JIMÉNEZ, M. M.; AGUILAR, M. A. Evaluación morfoagronómica de la papa de aire (*dioscorea bulbifera* L.) en Panamá. **Cultivos Tropicales**, v. 37, n. 1, p. 14-21, 2017.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 12, n. 2, p. 189-196, 2009.

KOMORI, T. Glycosides from *dioscorea bulbifera*. **Toxicon**, v. 35, n. 10, p. 1531-1536, 1996.

KUETE, V.; TEPONNO, R. B.; MBAVENG, A. T.; TAPONDJOU, L. A.; MEYER, J. M.; BARBONI, L.; LALL, N. Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-8, 2012.

LIU, H.; CHOU, G. X.; GUO, Y.; JI, L.; WANG, J.; WANG, Z. Norclerodane diterpenoids from rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1174–1180, 2010.

LIU, H.; CHOU, G.; WU, T.; GUO, Y.; WANG, S.; WANG, C.; WANG, Z. Steroidal Sapogenins and Glycosides from the Rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1964-1968, 2009.

LIU, H.; TSIM, K. W. K.; CHOU, G.; WANG, J.; JI, L.; WANG, Z. Phenolic Compounds from the Rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, p. 2110-2116, 2011.

MAINASARA, M. M.; BAKAR, M. F. A.; AKIN, A. M.; LINATOC, A; C.; BAKAR, F. I.; RANNEH, Y. K. H. Secondary Metabolites, Antioxidant, and Antiproliferative Activities of *Dioscorea bulbifera* Leaf Collected from Endau Rompin, Johor, Malaysia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-10, 2021.

MAIRESSE, L. A. S.; COSTA, E. C.; FARIAS, J. R.; FIORIN, R. A. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da FZVA**, v. 14, n. 2, p. 1-12, 2007.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARTIN, F. **Tropical Yams and their potential (Part 2. *Dioscorea bulbifera*)**. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture in cooperation with U.S. Agency for international Development, 1974.

MATTIELLO, I.C.; TRAPP,A.; KROTH, L. V. Nefrotoxicidade relacionada à quimioterapia citotóxica convencional. **Oncologia: Da prevenção ao tratamento**. v. 39, n. 2, p. 214-224, 2018.

MUKHERJEE, A. K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A. C. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1467-1486, 2001.

MURRAY, R. D. H.; JORGE, Z. D.; KHAN, N. H.; SHAHJAHAN, M.; QUAISUDDIN, M. Diosbulbin D and 8-epidiosbulbin e acetate, norclerodane diterpenoids from *dioscorea bulbifera* tubers. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 623-625, 1984.

NAVAS, E. B.; ERBA, G. V. EL Género *dioscorea* en Chile. **Chloris Chilensis: revista chilena de flora y vegetación**, v. 23, n. 2, p. 118-150, 2020.

NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C.; DE ALENCAR, L. M. C.; FILHO, J. L.; DE LEMOS, E. E. P. **Inhame: O nordeste fértil**. EDUFAL, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NUR, R. M.; NUGROHO, L. H. Cytotoxic Activities of Fractions from *Dioscorea bulbifera* L. Chloroform and Methanol Extracts on T47D Breast Cancer Cells. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 1, p. 33-38, 2027.

OLIVEIRA, V. M. A.; CARNEIRO, A. L. B.; CAUPER, G. S. B.; POHLIT, A. M. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 973-980, 2009.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Estimativas Globais de Saúde 2020: Taxas de mortalidade padronizadas por idade estimadas (Mundial) em 2020, todos os tipos de câncer, ambos os sexos, todas as idades, 2021.

PATEL, S.; GHEEWALA, N.; SUTHAR, A.; SHAH, A. In-vitro cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against hela cell line and vero cell line. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**. v. 1, n. 1, p. 38-46, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Química Orgânica Experimental (Técnicas de escala pequena)**. Ed. 2. Porto Alegre: Bookman, 2009.

PEÑA, S.; SCARONE, L.; SERRA, G. Macrocycles as potential therapeutic agents in neglected diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 355–382, 2015.

PEREIRA, F. C.; LIMA, A. P.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. **Revista Eletrônica de Farmacia Suplemento**, v. 3 n. 2, p. 10-12, 2006.

PINTO et al. Tratamento cirúrgico do carcinoma epidermoide da cavidade oral e orofaringe no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP): perfil dos pacientes tratados e resultados oncológicos iniciais. **Revista Brasileira Cirurgia Cabeça Pescoço**, v. 41, n. 2, p. 53-57, 2012.

POMPILHO, W. M.; BORGES, R. V.; MIGUEL, E. C. Biotecnologia e biodiversidade: As florestas brasileiras como fonte de novos fármacos com propriedades antitumorais. **Advanced Sciences and Technologies**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2013.

PRAKASH, O.; KUMAR, A. P.; AJEET. Anticancer potential of plants and natural products: A Review. **American Journal of Pharmacological Sciences**. v. 1, n. 6, p. 104-115, 2013.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, A.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays**. U.S. National Library of Medicine: National center for Biotechnology Information, 2016, 25 p.

SHEIN, C. F.; MARQUES, A. R.; VARGAS, C. L.; KIRSTEN, V. R. Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v. 7, n. 1, p. 101-107, 2006.

SHI, W.; JIANG, Y.; ZHAO, D.; JIANG, L.; LIU, F.; WU, T., LI, Z.; WANG, L.; ZHOU, J.; LI, P.; LI, H. Metabolomic-transcriptomic landscape of 8-epidiosbulbin E acetate -a

major diterpenoid lactone from *Dioscorea bulbifera* tuber induces hepatotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

SHRIRAM, V.; JAHAGIRDAR, S.; LATHA, C.; KUMAR, V.; PURANIK, V.; ROJATKAR, S.; DHAKEPHALKAR, P. D.; SHITOLE, M. G. A potential plasmid-curing agent, 8-epidiosbulbin E acetate, from *Dioscorea bulbifera* L. against multidrug-resistant bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 405–410, 2008.

SILVA, D. M. **Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originários de roças de agricultura tradicional por meio de marcadores microssatélites**. 2013. 94f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.

SIMÕES, C. et al. **FARMACOGNOSIA: Do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: [s.n.]. v. 91.

STADNIKI, J. **Caracterização química e da atividade biológica de metabólitos especializados presentes em extratos do tubérculo do cará-moela (*Dioscorea bulbifera*) - Aplicações potenciais em processos biotecnológicos**. 2019. Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

SUFFNESS M., PEZZUTO. **Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity**. London: Academic Press; 1991.

TANG, Y.; XUE, Y.; ZHOU, L.; ZHANG, J.; YAO, G.; LUO, Z.; DU, G.; ZHANG, Y. New Norclerodane Diterpenoids from the Tubers of *Dioscorea bulbifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 7, p. 719–724, 2014.

TANG, Z.; ZHOU, Y.; ZENG, Y.; ZANG, S.; HE, P.; FANG, Y. Capillary Electrophoresis of the Active Ingredients of *Dioscorea bulbifera* L. and its Medicinal Preparations. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 617-622, 2006.

TAPONDJOU, L. A.; JENNET-SIEMS, K.; BÖTTGER, S.; MELZIG, M. F. Steroidal saponins from the flowers of *Dioscorea bulbifera* var. sativa. **Phytochemistry**, v. 95, p. 341–350, 2013.

TEIXEIRA, B. A. **Bioprodução de fitoquímicos em plantas alimentícias não convencionais (PANC) nas quatro estações do ano**. 2018. Dissertação de mestrado. Universidade Federal São João Del-Rei, Sete Lagoas, 2018.

TEPONNO, R. B.; TAPONDJOU, A. L.; GATSING, D.; DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TABACCHI, R.; TANE, P.; STOEKLI-EVANS, H.; LONTSI, D. Bafoudiosbulbins A, and B, two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var sativa. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1957–1963, 2006.

VIANA, A. R.; MARZARI, J.; WERGUTZ, J.; KRAUSE, L. M. F.; Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017.

VIANA, M.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C.; PEREIRA, S. M.; OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, M. L. Phytochemical composition and antioxidant potential of unconventional vegetables. **Horticultura Brasileira**. v. 33, n. 4, p. 504-509, 2015.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIJAYARATHNA, S.; SASIDHARAN. S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 826-829, 2012.

WANG, G.; LIU, J.; LIN, B.; WANG, G.; LIU, J. Two New Furanoid Norditerpenes from *Dioscorea bulbifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 6, p. 625–627, 2009.

WANG, G.; ZHENG, J.; YANG, J.; SUN, Y.; ZHANG, N.; LIU, H.; LIU, J. Phenolic Derivatives from *Dioscorea bulbifera*. **Records of Natural Products**, 2018.

WANG, J. M.; JI, L. L.; BRANFORD-WHITE, C. J.; WANG, Z. Y.; SHEN, K. K.; LIU, H.; WANG, Z. T. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 388–394, 2012.