

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Perfil químico e potencial farmacológico de *Senna velutina* (Fabaceae)
e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**

JAQUELINE FERREIRA CAMPOS

Dourados - MS

2018

JAQUELINE FERREIRA CAMPOS

**Perfil químico e potencial farmacológico de *Senna velutina* (Fabaceae)
e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**

Área do CNPq: Ciências da Saúde: 04.00.00.00-1

Exame de Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Dourados - MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C198p Campos, Jaqueline Ferreira
 Perfil químico e potencial farmacológico de Senna velutina (Fabaceae) e
 Campomanesia adamantium (Myrtaceae) / Jaqueline Ferreira Campos --
Dourados: UFGD, 2018.
 102f. : il. ; 30 cm.

 Orientador: Edson Lucas dos Santos

 Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde,
 Universidade Federal da Grande Dourados.
 Inclui bibliografia

 1. Plantas medicinais. 2. Bioprospecção. 3. Peroxidação lipídica. 4. Câncer.
 5. Apoptose. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA PELA CANDIDATA **JAQUELINE FERREIRA CAMPOS**, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Ao nono dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezoito (09/02/2018), às 14h, em sessão pública, realizou-se, na Sala 08 da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "**Perfil químico e potencial farmacológico de *Senna velutina* (Fabaceae) e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**" apresentada pela doutoranda **JAQUELINE FERREIRA CAMPOS**, do Programa de Pós-Graduação Doutorado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Edson Lucas dos Santos** (Presidente/orientadora), **Dra. Kely de Picoli Souza** (membro titular/programa), **Dra. Silvia Cristina Figueira Olinto** (membro titular/externo), **Dra. Rosilda Mara Mussury Franco Silva** (membro titular/externo), e **Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero** (membro titular/externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, no tempo previsto de 40 até 50 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 09 de fevereiro de 2018.

Dr. Edson Lucas dos Santos _____

Dra. Kely de Picoli Souza _____

Dra. Silvia Cristina Figueira Olinto _____

Dra. Rosilda Mara Mussury Franco Silva _____

Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero _____

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

Dedico esta tese à minha irmã Angela
Ferreira Campos, nosso anjo da guarda!
Estará sempre em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Realizar um segundo doutorado com certeza não foi uma missão fácil, muitas dúvidas surgiram no caminho, mas tenho certeza que fiz a melhor escolha, aprendi muito, abri novos horizontes e os frutos já começam a ser colhidos. A oportunidade foi me dada, e não hesitei em aproveitá-la!

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desta etapa em minha história.

Primeiramente agradeço à Deus pela vida e pelo amparo de todos os dias. Pela coragem em tomar decisões, mesmo sem saber se eram as melhores escolhas. Hoje tenho certeza, Ele me fez seguir o meu melhor caminho!

Agradeço aos meus pais Ivo Campos da Silva e Eunice Ferreira Carnauba da Silva pelo amor incondicional, pela educação que me deram, pela base sólida que sempre me proporcionaram. Obrigada por serem tão presentes em minha vida, por serem o melhor exemplo de como viver a vida com alegria e amor!

Ao meu irmão Bruno Ferreira Campos, por ser tão parceiro, amigo e por trazer tanta alegria aos meus dias. Obrigada mano pelas conversas, conselhos, brincadeiras e pela música que sempre nos alegra!

Ao meu esposo Elieu Damacena do Amaral, por ser o melhor companheiro, pelo amor, alegria e pela paciência em vivenciar comigo este novo desafio. Obrigada por apoiar minhas decisões, por me ouvir e me incentivar diariamente. Obrigada meu amor!

Ao meu orientador Edson Lucas dos Santos, por confiar em mim e encarar comigo este segundo doutorado. Obrigada por todos os conselhos, pelos ensinamentos, por fornecer a base para que eu pudesse alcançar meus objetivos. O senhor contribuiu, e muito, para meu crescimento profissional e pessoal. Serei eternamente grata!

À professora Kely de Picoli Souza, por ter me ensinado tanto durante estes anos de convivência. Por ser um exemplo de professora, de mulher, de mãe! Obrigada por fazer a diferença!

Aos membros do GEBBAM (Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção aplicados ao metabolismo), por ser minha segunda casa durante os últimos 8 anos! Levarei cada um em meu coração! Obrigada pela ajuda durante os experimentos, pelas conversas e pela boa companhia...

À minha amiga Paola dos Santos da Rocha, por me ensinar tanto e estar sempre disposta a ajudar! Obrigada pela amizade sincera, e por se fazer presente mesmo do outro lado do Atlântico.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e professores, pela oportunidade de aprendizado e construção de minha carreira profissional. Às secretárias, Ana Paula e Patrícia, pela atenção e auxílio nas questões burocráticas.

Ao professor Carlos Alexandre Carollo e professora Denise Bentrán da Silva pelas análises da composição química dos extratos vegetais, realizados na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Ao professor Edgar Julian Paredes-Gamero e grupo de pesquisa, pelos ensaios de citotoxicidade e mecanismos de ação, realizados na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), instituição em que vi crescer e pude fazer parte de sua história! Obrigada por me proporcionar tanto aprendizado e oportunidades!

À CAPES, CNPq e FUNDECT, por fomentar a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca, pela disposição em contribuírem para a melhoria desta tese de doutorado.

Muito obrigada!

“Tente! E não diga que a vitória está perdida...
Se é de batalhas que se vive a vida...
Tente outra vez!”

(Paulo Coelho / Marcelo Motta / Raul Seixas)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Drogas aprovadas entre 1981-2014; n = 1562. Macromolécula biológica (B), produto natural inalterado (N), droga botânica (NB), derivado de produto natural (ND), droga sintética (S), droga sintética – farmacóforo de produto natural (S*), vacina (V), produto natural utilizado como protótipo (/NM). Fonte: Newman e Cragg (2016). 22
- Figura 2** – *Senna velutina* (Fabaceae): visão geral da planta (A) e detalhe das flores (B). 25
- Figura 3** – *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae): visão geral da planta (A) e detalhe das flores (B). 27
- Figura 4** – Estrutura geral de um flavonoide. 33
- Figura 5** – Vias metabólicas responsáveis pela geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Fonte: Martin-Ventura et al. (2017). 40
- Figura 6** – Morte celular programada: vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Fonte: Suhaili et al. (2017). 49
- Figura 7** – Mecanismos de ação de morte celular via necroptose. Fonte: Chen et al. (2016). 51

ARTIGO I

- Figure 1** – UFLC-DAD-ESI-QTOF-microTOF QII chemical profiling (negative mode) of an ethanol extract of *S. velutina* leaves. (a) Base peak chromatograms (BPC). (b) Extract ion chromatogram (EIC) of m/z 305. (c) EIC of m/z 289. (d) EIC of m/z 593. (e) EIC of m/z 609. (f) EIC of m/z 545. (g) EIC of m/z 529. (h) EIC of m/z 513. (i) EIC of m/z 785. (j) EIC of m/z 769. 78

Figure 2 – Hemolysis and MDA content in human erythrocytes incubated for 5 hours with ascorbic acid (AA) and ESV (50–125 (a) Hemolytic activity of ESV in the absence of AAPH. (b) Antihemolytic activity after addition of AAPH. (c) Malondialdehyde (MDA) concentration (nM/mL) after addition of the oxidizing agent. *p < 0.05 compared to the AAPH-only control (erythrocytes incubated only with AAPH). 79

Figure 3 – Viability of leukemic Jurkat (a) and K562 (b) cells after treatment with different concentrations of ESV. *p < 0.05 compared to the untreated control group. 79

Figure 4 – Cell death profiles of ESV-treated Jurkat (a) and K562 (b) cells. Anx⁻/PI⁻ viable cells; Anx⁺/PI⁻, apoptotic cells; Anx⁻/PI⁺, necrotic cells; and Anx⁺/PI⁺, late apoptotic cells. *p < 0.05 compared to the respective control groups. 80

Figure 5 – Mitochondrial membrane potential of leukemic Jurkat (a) and K562 (b) cells treated with different ESV concentrations. ***p < 0.0001 compared to the untreated control group. 80

Figure 6 – Histogram (a) and representative graph (b) of caspase-3 activation in ESV-treated Jurkat cells. ***p < 0.0001 compared to the untreated control group. 81

Figure 7 – Involvement of caspases (via the pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK) and intracellular calcium (using the chelator BAPTAAM) in ESV-induced Jurkat cell cytotoxicity. *p < 0.05 compared to the ESV group. 81

Figure 8 – Histogram (a) and representative graph (b) of cell cycle distribution after 24 h of treatment with ESV. *p < 0.05 and **p < 0.001 compared to the untreated control group. 82

ARTIGO II

Figure 1 – Chromatographic profile at wavelength 230–350 nm of the aqueous extracts of roots (AECR) and leaves (AECL) from *C. adamantium*. 88

- Figure 2** – Chemical structures some identified compounds and aglycones from *C. adamantium*. 92
- Figure 3** – Viability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Jurkat cells treated with different concentrations of the vinblastine (A), AECL (B), and AECL (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with the control group. 93
- Figure 4** – Cell death profile after treatment with AECL (A) and AECL (B). Data obtained via flow cytometry of cells stained with annexin V-FITC/PI; Anx⁻/PI⁻: viable cells; Anx⁺/PI⁻: apoptotic cells; Anx⁻/PI⁺: necrotic cells, and Anx⁺/PI⁺: cells in late apoptosis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with the control group. 94
- Figure 5** – Mitochondrial membrane potential of Jurkat cells treated with AECL (A) and AECL (B). *** $p < 0.001$ compared with the control group. 95
- Figure 6** – Western blot analysis. Jurkat Cells were treated with vehicle (control) or with the extracts for 24 h and were harvested for western blot analysis. The expression of (A) cleaved caspase-8 (Asp391) and (B) cleaved caspase-9 (Asp330) (37 kDa), Bax, Bcl-2 was determined by western blot. Equal loading was confirmed by reprobing blots for actin. One representative immunoblot of two independent experiments was presented. 95
- Figure 7** – Caspase-3 activation in Jurkat cells treated with AECL (A) and AECL (B). *** $p < 0.001$ compared with the control group. 96
- Figure 8** – Effect of a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) and an intracellular calcium chelator (BAPTA-AM) on cell death mediated by AECL (A) and AECL (B). * $p < 0.05$ compared with the control group. # $p < 0.05$ compared with the AECL or AECL group. 97
- Figure 9** – Increases in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induced by AECL (A) and AECL (B) in Jurkat cells. Cell were loaded with Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit. The detection of fluorescence was performed in a FlexStation 3 microplate reader. Ionomycin was used as positive control to obtain the maximal fluorescence. 98

Figure 10 – Cell cycle distribution after treatment with AECL (A) and AECR (B) 98
for 24 h. * $p < 0.05$ compared with the control group.

Figure 11 – Quantification of Ki-67 (A) and p-Rb (B) in Jurkat cells treated with 99
AECL and AECR. ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Compostos fenólicos: classificação, estrutura química geral e principais moléculas representantes. 31

ARTIGO I

Table 1 – Compounds identified in ESV by UFLC-DAD-ESI-QTOF-microTOF QII. 77

Table 2 – IC₅₀ and maximal DPPH radical scavenging activity of standard antioxidants and of ESV. 81

ARTIGO II

Table 1 – Identification of the constituents of aqueous extract from *C. adamantium* by LC-DAD-MS. 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	<i>Ascorbic acid</i> (Ácido ascórbico)
AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
Abs	<i>Absorbance</i> (Absorbância)
AECL	Aqueous extracts of <i>Campomanesia</i> leaves (Extrato aquoso de folhas de <i>Campomanesia</i>)
AECR	<i>Aqueous extracts of Campomanesia roots</i> (Extrato aquoso de raízes de <i>Campomanesia</i>)
Anx	Annexin V-FITC
BHT	Butylhydroxytoluene
Ca ²⁺	<i>Calcium</i> (Cálcio)
CaCl ₂	<i>Calcium chloride</i> (Cloreto de cálcio)
CAT	Catalase
DAD	Diode Array Detector
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ENOs	Espécies Reativas de Nitrogênio
ESI-QTOF- micrOTOF QII	Electrospray ionization time-of-flight
ESV	<i>Ethanol extract of S. velutina leaves</i> (Extrato etanólico de folhas de <i>S. velutina</i>)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione disulfide
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
MDA	<i>Malondialdehyde</i> (Malondialdeído)
NaCl	<i>Sodium chloride</i> (Cloreto de sódio)
•OH	Radical hidroxila
O ₂ •	Radical ânion superóxido

PI	<i>Propidium iodide</i> (Iodeto de propídeo)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares de sangue periférico)
Rb	Retinoblastoma
RO ₂ •	Radical peroxila
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
SOD	Superóxido dismutase
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> (Ácido tiobarbitúrico)
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida Ultra Rápida)
$\Delta\Psi_{mit}$	<i>Mitochondrial Membrane Potential</i> (Potencial da Membrana Mitocondrial)

Perfil químico e potencial farmacológico de *Senna velutina* (Fabaceae) e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)

RESUMO

Os produtos naturais são importantes fontes de biomoléculas que apresentam atividade antioxidante, capazes de prevenir doenças desencadeadas pelo processo de estresse oxidativo, e antitumoral, sendo importante fonte de novos protótipos de fármacos anticâncer. Neste contexto, este estudo objetivou analisar a composição química, potencial farmacológico e mecanismos de ação dos extratos de *Senna velutina* e *Campomanesia adamantium*. A composição química dos extratos foi avaliada por LC-DAD-MS, e seus constituintes foram investigados pelos dados UV, MS e MS/MS. A propriedade antioxidante do extrato de folhas de *S. velutina* foi avaliada pela captura do radical livre DPPH e inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos induzidos pelo agente oxidante AAPH. A citotoxicidade e possíveis mecanismos de ação dos extratos de folhas de *S. velutina* e folhas e raízes de *C. adamantium* foram avaliados em células leucêmicas Jurkat e/ou K562. Como resultados, o extrato etanólico de folhas de *S. velutina* apresentou flavonoides, como epigallocatequina, epicatequina, kaempferol heterosídeo, rutina e derivados de proantocianidinas diméricos e triméricos. Os extratos das folhas e raízes de *C. adamantium* apresentaram diferentes compostos químicos, sendo identificados como compostos principais os flavonóis glicosilados e ácido elágico e derivados. O extrato de *S. velutina* exibiu atividade antioxidante pela captura do radical DPPH, ação anti-hemolítica e redução dos níveis de malondialdeído em eritrócitos humanos. Ambos os extratos, *S. velutina* e *C. adamantium*, induziram a morte de células leucêmicas pela ativação de cálcio intracelular e caspase-3, diminuição do potencial da membrana mitocondrial e parada do ciclo celular. Juntos, estes resultados mostram que extratos de folhas de *S. velutina* e folhas e raízes de *C. adamantium* apresentam potencial terapêutico para uso na prevenção e tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo e/ou à proliferação de células tumorais.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Bioprospecção. Peroxidação lipídica. Câncer. Apoptose.

Chemical profile and pharmacological potential of *Senna velutina* (Fabaceae) and *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)

ABSTRACT

Natural products can be a source of biomolecules with antioxidant activity which are able to prevent oxidative stress-induced diseases and show antitumor activity, making them important sources of new anticancer drug prototypes. In this context, this study aimed to analyze the chemical composition, pharmacologic potential and mechanisms of action of extracts of *Senna velutina* and *Campomanesia adamantium*. The chemical composition of the extracts was analyzed by LC-DAD-MS, and their constituents were identified based on the UV, MS, and MS/MS data. The antioxidant property of extracts of *S. velutina* was evaluated using a DPPH free radical scavenging assay and by examining the extract's inhibition of AAPH-induced lipid peroxidation in human erythrocytes. Its cytotoxicity and possible mechanisms of action *S. velutina* leaves and *C. adamantium* leaves and roots extracts were assessed in Jurkat and/or K562 leukemic cell lines. As results, the ethanol extract of *S. velutina* leaves showed flavonoids, such as epigallocatechin, epicatechin, kaempferol heteroside, rutin, and dimeric and trimeric proanthocyanidin derivatives. The extracts leaves and roots of *C. adamantium* showed different chemical compounds, being identified as main compounds glycosylated flavonols and ellagic acid and their derivatives. The extract of *S. velutina* exhibited antioxidant activity by scavenging free radicals and antihemolytic action, and it decreased malondialdehyde content in human erythrocytes. Both extracts, *S. velutina* and *C. adamantium*, induced leukemic cell death by activating intracellular calcium and caspase-3, decreasing mitochondrial membrane potential, and arresting the cell cycle. Together, these results indicate that *S. velutina* leaves and *C. adamantium* leaves and roots extracts show therapeutic potential for use in the prevention and treatment of diseases associated with oxidative stress and/or the proliferation of tumor cell.

Keywords: Medicinal plant. Bioprospecting. Lipid peroxidation. Cancer. Apoptosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Produtos naturais.....	21
2.2 <i>Senna velutina</i>	24
2.3 <i>Campomanesia adamantium</i>	26
2.4 Compostos fenólicos.....	28
2.4.1 Ácidos fenólicos.....	32
2.4.2 Flavonoides.....	32
2.4.2.1 Flavonas.....	33
2.4.2.2 Flavonóis.....	33
2.4.2.3 Flavanonas.....	34
2.4.2.4. Flavan-3-óis.....	34
2.4.2.5 Isoflavonas.....	35
2.4.2.6 Antocianidinas.....	35
2.4.3 Taninos.....	36
2.4.4 Estilbenos.....	37
2.4.5 Lignananas	37
2.4.6 Curcuminoides.....	38
2.5 Estresse oxidativo.....	39
2.5.1 Espécies reativas de oxigênio.....	40
2.5.2 Compostos antioxidantes.....	44
2.6. Câncer.....	46
2.6.1 Leucemias.....	46
2.6.2 Mecanismos de ação citotóxica.....	47

3 OBJETIVOS.....	54
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
5 APÊNDICES.....	72
5.1 Artigo 1: The Chemical Profile of <i>Senna velutina</i> Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects	72
5.2 Artigo 2: Leaf and Root Extracts from <i>Campomanesia adamantium</i> (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3.....	85
6 CONCLUSÃO.....	102

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças, como câncer, diabetes, aterosclerose, doenças inflamatórias, além do envelhecimento precoce, estão relacionadas ao processo de estresse oxidativo (SULTAN, 2014). Este processo é decorrente do excesso de espécies reativas no organismo e da baixa atuação de sistemas antioxidantes, resultando em danos às biomoléculas essenciais, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (LOBO et al., 2010).

Dentre as doenças relacionadas ao estresse oxidativo, o câncer está entre as que promovem elevados índices de morbidade e mortalidade na população mundial (SIEGEL et al., 2013). As leucemias são tipos de cânceres que acometem as células do sistema hematopoiético e são classificadas em linfóide ou mieloide, de acordo com a origem celular e aguda ou crônica quanto à fase de maturação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Nestes casos, os procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia (ASMAA et al., 2014) estão entre as principais formas de tratamento. Nas últimas décadas, do total de drogas anticâncer disponibilizadas no mercado 49 % delas foram provenientes de produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN e CRAGG, 2016). Neste cenário, os produtos naturais continuam sendo fontes de biomoléculas que apresentam atividade anticâncer em baixas doses terapêuticas e reduzidos efeitos colaterais (SRDIC-RAJIC et al., 2016), incluindo o tratamento de diferentes tipos de leucemias (ASMAA et al., 2014; KINGHORN, 2015).

Alcaloides, terpenos e compostos fenólicos se destacam como compostos bioativos que apresentam potencial anticâncer, encontrados principalmente em plantas medicinais (TIWARI e RANA, 2015). Os alcaloides são amplamente descritos como princípios ativos de diversas drogas anticancerígenas disponibilizadas no mercado, como a vimblastina, vincristina (CRAGG e NEWMAN, 2013) e a homoharringtonina (PRAKASH et al., 2013), que são evidências de sucesso no desenvolvimento de drogas de uso clínico derivadas de plantas medicinais. O agente antitumoral paclitaxel é um diterpeno originalmente isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (NAGLE et al., 2006).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente presentes em frutas, legumes, verduras, ervas e bebidas como vinho e chás, e são descritos por apresentarem diversas atividades biológicas, como antioxidante e antitumoral (KUREK-GÓRECKA et al., 2014; MOJZER et al., 2016). Na literatura são descritas mais de 8000 moléculas caracterizadas como compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, taninos (ALTEMIMI et al., 2017), além dos estilbenos, lignanas (DAI e MUMPER, 2010) e curcuminoides (MOJZER et

al., 2016). Diversos estudos demonstram as propriedades antitumorais dos compostos fenólicos, muitos deles estão sendo investigados nas fases pré-clínicas e clínicas, etapas primordiais para o desenvolvimento de novos fármacos. A curcumina já foi avaliada nas fases I e II dos ensaios clínicos, e apresentam diversos alvos como mecanismos de ação, já o resveratrol e epigallocatequina galato (EGCG) estão sendo avaliados nas fases pré-clínicas (MOU et al., 2011).

Levando-se em consideração a biodiversidade brasileira, com vasto potencial bioprospectivo, muitos estudos podem ser realizados em busca de novas moléculas que apresentem propriedades terapêuticas. A região Centro-Oeste do Brasil, onde se localiza o Estado do Mato Grosso do Sul, abriga parte do bioma Cerrado, um dos ecossistemas mais biodiversos do país. Embora diversos estudos demonstrem o grande potencial terapêutico de espécies vegetais nativas deste bioma, o número de estudos científicos que comprovam estas propriedades ainda é reduzido.

Dentre os gêneros conhecidos por serem utilizados na medicina popular brasileira, em especial no Cerrado, *Senna* já foi descrito por incluir espécies com ação antioxidante, antimicrobiana (MAK et al., 2013), anti-inflamatória (SUSUNAGA-NOTARIO et al., 2014), antidiabética (THILAGAM et al., 2013), antitumoral (PEREIRA et al., 2016), dentre outros. Contudo, muitas de suas espécies ainda não foram estudadas, quanto a sua composição química e propriedades biológicas, como a espécie arbórea *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Fabaceae, Caesalpinioideae). No Brasil, esta espécie é conhecida popularmente como São-joão (AGRA et al., 2007) e Fedegoso (LOVERDE-OLIVEIRA et al., 2010). Na região Nordeste, o decocto da casca de *S. velutina* é utilizado popularmente no tratamento de dermatites (AGRA et al., 2007).

Outra espécie nativa do Cerrado brasileiro é a *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae), conhecida popularmente como guavira, guabiroba ou guabiroba-do-mato. Produz frutos muito apreciados popularmente, tanto por seu consumo *in natura*, quanto pela produção de licores, sucos, geleias e sorvetes (COUTINHO et al., 2008; PAVAN et al., 2009; SCALON et al., 2013). Na medicina popular suas folhas e frutos são utilizados por apresentarem propriedades anti-inflamatória, antidiarreica e no tratamento de doenças urinárias (VIEIRA et al., 2011) e suas raízes são utilizadas no tratamento de diabetes (COUTINHO et al., 2008). No âmbito científico, várias partes da planta já foram descritas por apresentarem propriedades terapêuticas, no entanto, estudos que descrevem sua atividade sobre células leucêmicas ainda não foram descritos na literatura.

Neste contexto, nossa hipótese é que extratos de folhas de *S. velutina* e folhas e raízes de *C. adamantium* apresentam compostos fenólicos em sua composição química e desempenham relevante potencial terapêutico. Para testar esta hipótese, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química e potencial farmacológico destes extratos vegetais e investigar seus mecanismos de ação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produtos naturais

Há milhares de anos a humanidade utiliza produtos obtidos da natureza para sua sobrevivência, incluindo produção de alimentos, moradia, vestuário, meios de transporte, fertilizantes e medicamentos (CRAGG e NEWMAN, 2001). Compostos de origens naturais, como micro-organismos, animais e plantas, que apresentam atividades biológicas são conhecidos como produtos naturais (BAKER et al., 2007), muitos dos quais são utilizados na medicina tradicional. Os primeiros registros do uso de produtos naturais na medicina tradicional datam de 2600 a.C., na Mesopotâmia, sendo descritos o uso de óleos vegetais no tratamento de diversas enfermidades, obtidos principalmente de *Cedrus* sp. (Cedro), *Cupressus sempervirens* L. (Cipreste) e *Commiphora* sp. (Mirra) (CRAGG e NEWMAN, 2013).

A utilização de produtos naturais com potencial terapêutico se mantém ao longo dos anos. Nas últimas três décadas, dos 1328 medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), cerca de 24% são provenientes de produtos naturais, ou derivado destes, e este número é mais expressivo em relação às drogas anticâncer, em que 49% das 174 drogas disponibilizadas no mercado são provenientes de produtos naturais ou seus derivados (Figura 1) (NEWMAN e CRAGG, 2016).

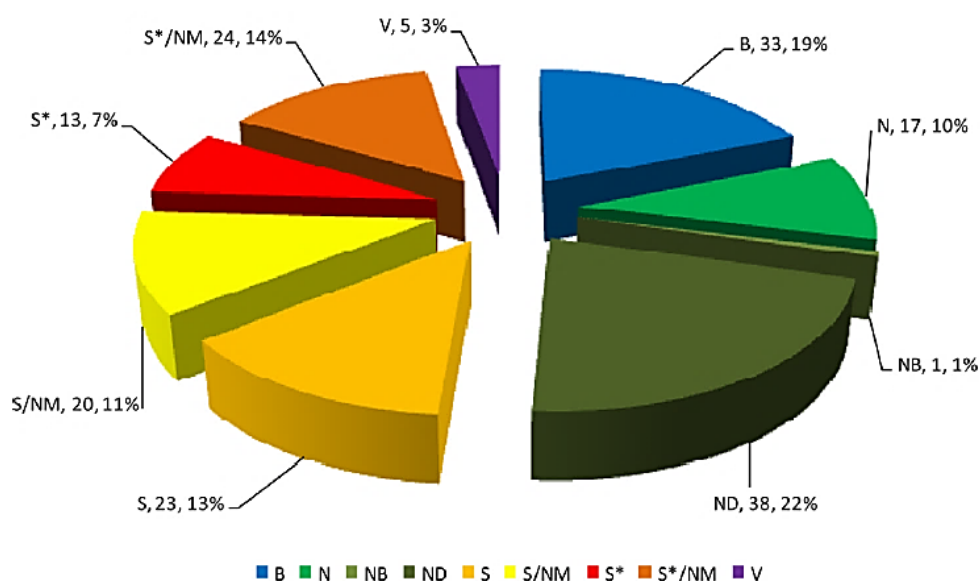


Figura 1. Drogas aprovadas entre 1981-2014; n = 1562. Macromolécula biológica (B), produto natural inalterado (N), droga botânica (NB), derivado de produto natural (ND), droga sintética (S), droga sintética – farmacóforo de produto natural (S*), vacina (V), produto natural utilizado como protótipo (/NM). Fonte: Newman e Cragg (2016).

Dentre os produtos naturais utilizados para a obtenção de drogas antitumorais, as plantas medicinais representam uma das principais fontes de moléculas bioativas para este fim. É crescente o interesse por suas propriedades antitumorais entre a comunidade médica, desde que suas propriedades terapêuticas tenham sido investigadas e comprovadas cientificamente (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Um dos principais exemplos de fármacos anticâncer que tiveram origem nas plantas medicinais, são os alcaloides Vimblastina e Vincristina, amplamente utilizados no tratamento de linfoma de Hodgkin, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil, os quais são provenientes de *Catharanthus roseus* (L.) Don (Apocynaceae), conhecida popularmente como Vinca, Maria-sem-vergonha e Boa-noite (CRAGG e NEWMAN, 2013).

A homoharringtonina é outro agente derivado de plantas medicinais de uso clínico, usado no tratamento contra leucemia mieloide aguda e crônica (PRAKASH et al., 2013). Este quimioterápico é um alcaloide, isolado primeiramente da conífera *Cephalotaxus harringtonia* (Knight ex J. Forbes) K. Koch (Cephalotaxaceae), e apresenta como mecanismo de ação a inibição da síntese de polipeptídeos e bloqueio da progressão do ciclo celular da fase G1 para

a síntese (fase S), e da fase G2 para mitose (fase M), promovendo a morte por apoptose (ISAH, 2016). Além destes, a descoberta do paclitaxel também é uma evidência de sucesso na descoberta de drogas anticancerígenas a partir de produtos naturais, diterpeno originalmente isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (NAGLE et al., 2006).

Contudo, apesar da grande diversidade de espécies vegetais já descritas por sua composição química e propriedades biológicas, apenas 6% das ~ 300.000 espécies de plantas superiores foram amplamente investigadas farmacologicamente e aproximadamente 15% tiveram seu perfil químico caracterizado (CRAGG e NEWMAN, 2013). No Brasil são descritas aproximadamente 44.000 espécies vegetais (BRAZIL, 2015), o que corresponde a cerca de 14,5% do total de espécies encontradas no mundo.

O Brasil é um dos 17 países que abriga a maior biodiversidade do mundo (BARBIERI et al., 2014). Além disso, ocupa o quinto lugar no *ranking* mundial em termos de extensão territorial, e apresenta diferentes regiões climáticas, como equatorial, subequatorial e temperada, o que reflete na diversidade natural de espécies (BARBIERI et al., 2014), como a presença de diferentes biomas, com diversidade biológica próprias.

O território brasileiro é constituído por seis biomas, a Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal e Cerrado (BRAZIL, 2015). Dentre estes, o Cerrado ocupa cerca de 24% do território nacional, sendo o segundo maior em extensão territorial, e é considerado a Savana Brasileira (IBGE, 2004). Este bioma é reconhecido como um dos *hotspots* mundiais, pois abriga grande diversidade de espécies endêmicas e, ao mesmo tempo, está exposto à elevada degradação de habitat por fatores antrópicos (PINTO et al., 2002).

Uma das maneiras de conservar este ambiente é conhecer suas espécies, agregando valor às mesmas. Diversas espécies de plantas nativas do Cerrado brasileiro já foram descritas por apresentarem propriedades terapêuticas, como *Jacaranda decurrens* Farias & Proença (Bignoniaceae), descrita por suas propriedades antioxidante, citotóxica (CASAGRANDE et al., 2014) e antiobesidade (ANTUNES et al., 2016), *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), que demonstra atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica (SANTOS et al., 2016), *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae), com potencial antibacteriano e antioxidante (CARNEIRO et al., 2017), dentre outras. Diante do exposto, é notável que este bioma é fonte inestimável de moléculas bioativas, e que muitos estudos podem ser realizados em busca de novas moléculas que apresentem propriedades terapêuticas, incluindo atividades antioxidante e anticancerígena. Dentre as espécies conhecidas por serem utilizadas na medicina popular brasileira estão *Senna velutina* e *Campomanesia adamantium*, nativas do Cerrado brasileiro.

2.2 *Senna velutina*

O gênero *Senna* é um dos maiores táxons da família Fabaceae, constituído por aproximadamente 600 espécies (PEREIRA et al., 2016). Recentemente as espécies deste táxon sofreram alterações taxonômicas, em que espécies do gênero *Cassia* foram transferidas para *Senna* (VIEGAS JUNIOR et al., 2006). Em geral, são plantas ornamentais por apresentarem inflorescências com pétalas amarelas (VIEGAS JUNIOR et al., 2006). Adicionalmente, várias de suas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular (PEREIRA et al., 2016), especialmente como purgativo (MARAZZI et al., 2006) e na cicatrização de feridas (SUSUNAGA-NOTARIO et al., 2014).

No âmbito científico, espécies de *Senna* já foram descritas por apresentarem ação antioxidante, antimicrobiana (MAK et al., 2013), anti-inflamatória (SUSUNAGA-NOTARIO et al., 2014), antidiabética (THILAGAM et al., 2013), antitumoral (PEREIRA et al., 2016), dentre outras. Dentre as espécies descritas neste táxon, *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Fabaceae, Caesalpinioideae) (1982) (Figura 2, A e B) é nativa da América do Sul, sendo encontrada no Paraguai (MARAZZI et al., 2006), Bolívia, Colômbia, Venezuela, Guiana e no Brasil (DISCOVER LIFE, 2017).

No território brasileiro, esta espécie apresenta distribuição nas regiões Norte (Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (SOUZA e BORTOLUZZI, 2015). Esta espécie apresenta porte arbóreo, medindo aproximadamente 1,5 metros de altura, constituída de folhas compostas e inflorescências terminais, com flores pentâmeras de coloração amarela e frutos do tipo deiscente, que se abrem quando maduros (SAIKI et al., 2008).

No Brasil, é conhecida popularmente como São-jão (AGRA et al., 2007) e Fedegão (LOVERDE-OLIVEIRA et al., 2010). Na região Nordeste, o decocto da casca de *S. velutina* é utilizado popularmente no tratamento de dermatites (AGRA et al., 2007). No entanto, sua composição química e propriedades biológicas ainda não são descritas na literatura.

Em geral, espécies do gênero *Senna* são descritas por apresentarem um perfil químico muito diverso, incluindo terpenos (KHAN e SRIVASTAVA, 2009), alcaloides (PEREIRA et al., 2016) e compostos fenólicos como taninos, antocianinas (MAK et al., 2013) e proantocianidinas (NAVARRO et al., 2017; SOBEH et al., 2017). Estes compostos são responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas pelas espécies vegetais e embora não haja

informações sobre a composição química de *S. velutina*, estes metabólicos secundários podem estar presentes nesta espécie, e desempenharem atividades terapêuticas.

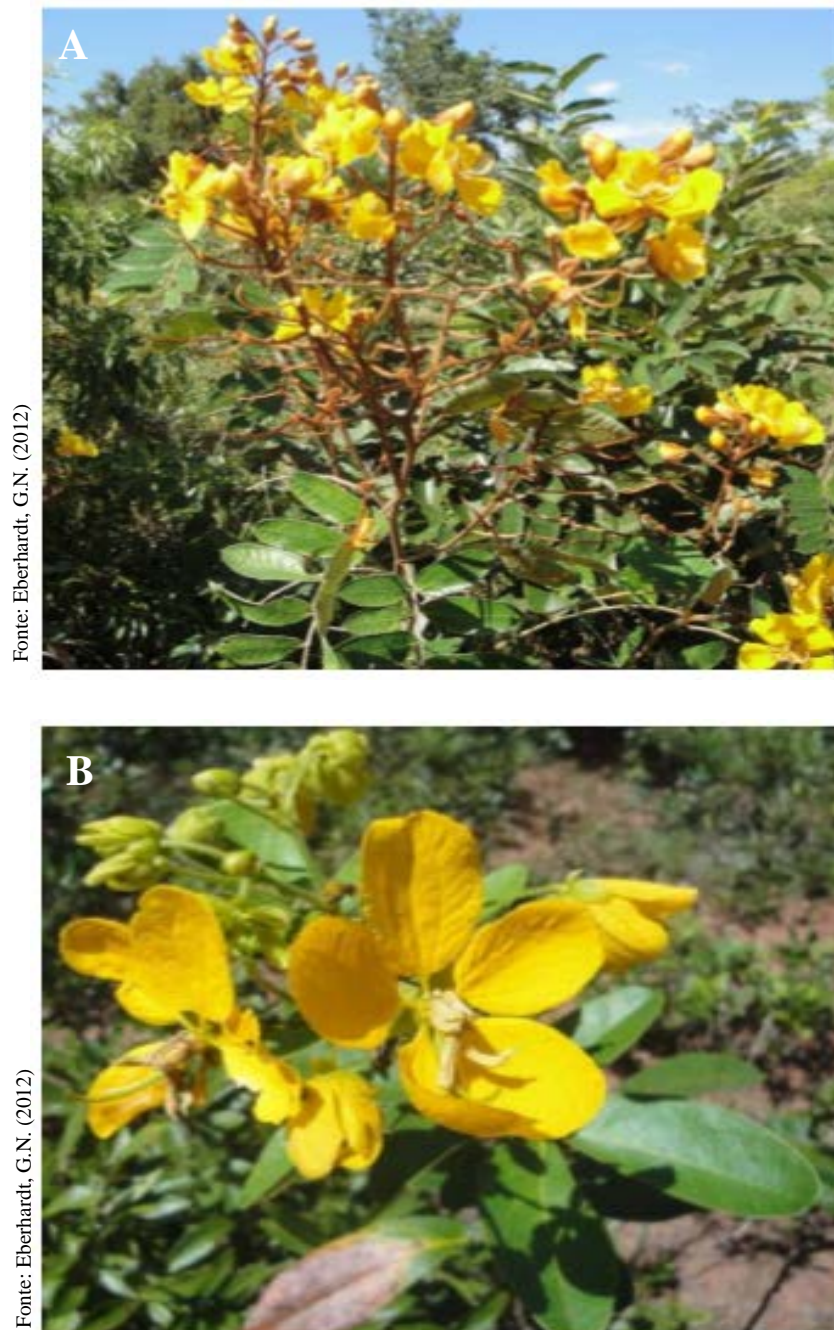


Figura 2. *Senna velutina* (Fabaceae): visão geral da planta (A) e detalhe das flores (B).

2.3 *Campomanesia adamantium*

Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae), é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, encontrada nos estados de São Paulo (SCALON et al., 2013), Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, podendo ultrapassar as fronteiras do Brasil, e ser encontrada no Uruguai, Argentina e Paraguai (VIEIRA et al., 2011). Esta espécie é conhecida popularmente como guavira, guabiroba ou gabioba-do-mato, é uma árvore de pequeno porte, podendo atingir até 2 metros de altura, contendo folhas simples e flores de coloração branca (Figura 3, A e B) (VALLILO et al., 2006).

Produz frutos muito apreciados popularmente, tanto pelo consumo *in natura*, quanto na produção de licores, sucos, geleias e sorvetes (COUTINHO et al., 2008; PAVAN et al., 2009; SCALON et al., 2013). Estudos sobre a composição química desta planta mostram a presença de compostos fenólicos como flavonoides e chalconas, os quais são amplamente conhecidos por suas atividades farmacológicas (COUTINHO et al., 2008; PASCOAL et al., 2011; PASCOAL et al., 2014).

A presença de compostos biologicamente ativos em *C. adamantium* reflete diretamente sua utilização na medicina popular. Suas folhas e frutos são utilizados por apresentarem propriedade anti-inflamatória, antidiarreica e no tratamento de doenças urinárias (VIEIRA et al., 2011) e suas raízes são utilizadas no tratamento de diabetes (COUTINHO et al., 2008).

No âmbito científico, várias partes da planta já foram descritas por apresentarem propriedades terapêuticas. Estudos relatam a ação antimicrobiana, antiproliferativa, anti-inflamatória, antidepressiva e antihiperalgésica dos frutos (PAVAN et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; PASCOAL et al., 2014; SOUZA et al., 2014; VISCARDI et al., 2017). O óleo essencial das folhas apresenta propriedades antimicrobiana e antioxidante (COUTINHO et al., 2009) e extratos das folhas possuem atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e anti-proliferativa contra células de câncer de próstata (PASCOAL et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; PASCOAL et al., 2014). As raízes são descritas por apresentarem atividade antioxidante e antihiperlipidêmica (ESPÍNDOLA et al., 2016). No entanto, estudos que relatam sua atividade sobre células leucêmicas ainda não foram descritos na literatura.



Figura 3. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae): visão geral da planta (A) e detalhe das flores (B).

2.4 Compostos fenólicos

As atividades biológicas apresentadas pelas plantas são decorrentes de seus metabólitos secundários, os quais desempenham importante função na interação entre as plantas e o meio ambiente (TIWARI e RANA, 2015). As plantas sintetizam estes compostos para inibir a competição entre outras espécies vegetais, produção de coloração das flores para atrair polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra raios ultravioleta, falta ou excesso de água, deficiência de nutrientes, além da proteção contra patógenos, parasitas e predadores (GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011; TIWARI e RANA, 2015; MOJZER et al., 2016; ADAMCZYK et al., 2017).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são agrupados em três grandes grupos: terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (TIWARI e RANA, 2015). Dentre estes, os compostos fenólicos estão amplamente presentes em frutas, legumes, verduras, ervas e bebidas como vinho e chás, e são descritos por apresentarem diversas atividades biológicas, incluindo ação antioxidante e antitumoral (KUREK-GÓRECKA et al., 2014; MOJZER et al., 2016).

Os compostos fenólicos são caracterizados por apresentarem em sua estrutura pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (CAROCHO e FERREIRA, 2013). A atividade antioxidante desempenhada por estes compostos é atribuída à presença de hidroxilas livres, sendo que, quanto maior o número de hidroxilas livres na molécula, maior este potencial (KUREK-GÓRECKA et al., 2014). Após atuarem na captura do radical livre, os compostos fenólicos são capazes de se estabilizarem devido a propriedade de ressonância do anel aromático, o que permite reter o elétron desemparelhado sem promover danos às estruturas das células (DAI e MUMPER, 2010).

Nas plantas, os compostos fenólicos são encontrados tanto na forma livre, quanto ligados a moléculas de glicose ou proteínas (SOARES, 2002; DAI e MUMPER, 2010). As formas glicosídeas, juntamente com os grupos hidroxila, aumenta a propriedade hidrofílica destes compostos, enquanto a presença de outros substituintes, como grupos metil e unidades isopentenil, aumentam suas propriedades lipofílicas (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Na literatura são descritas mais de 8000 moléculas caracterizadas como compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (ALTEMIMI et al., 2017), além dos estilbenos, lignanas (DAI e MUMPER, 2010) e curcuminoides (MOJZER et al., 2016), sendo que estes três últimos, embora abundantes, são menos comuns (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos fenólicos: classificação, estrutura química geral e principais moléculas representantes.

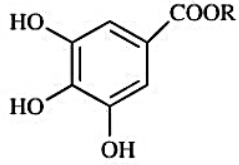
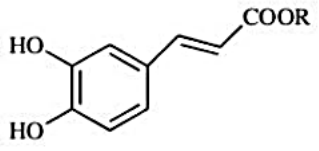
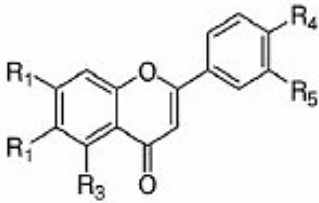
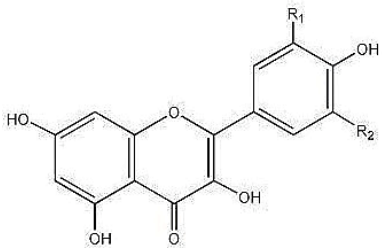
Classe	Estrutura	Principais representantes
Ácidos fenólicos		
Ácidos hidroxibenzoico e derivados		Ácido elágico Ácido gálico
Ácidos hidroxicinâmico e derivados		Ácido cafeico Ácido clorogênico Ácido ferulico Ácido coumárico
Flavonoides		
Flavonas		Rutina Luteonina Apigenina
Flavonóis		Quercetina Kaempferol Miricetina

Tabela 1. Continuação

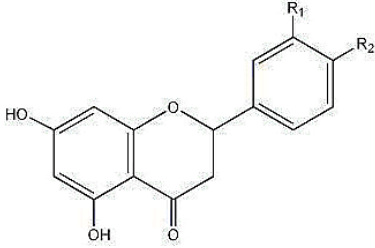
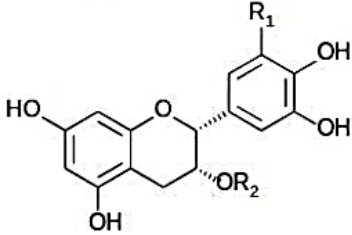
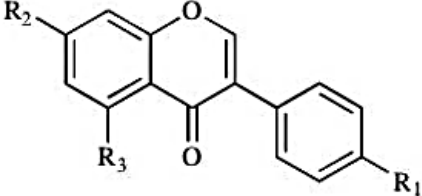
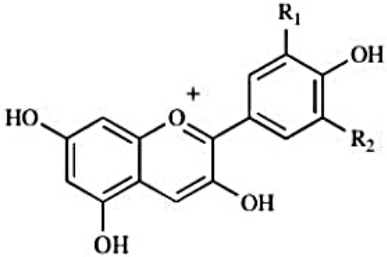
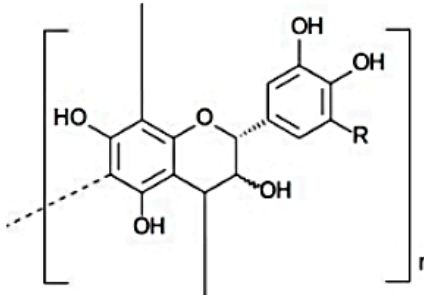
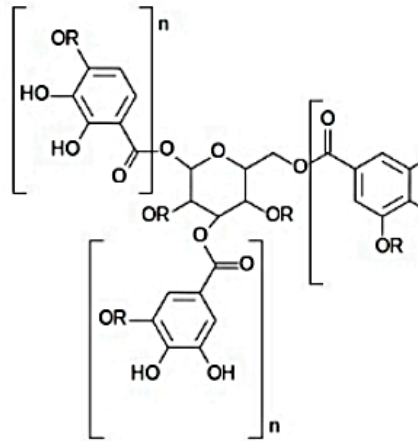
Flavanonas		<p>Naringenina Eriodictiol Hesperidina</p>
Flavan-3-óis ou flavanóis		<p>Catequina Epicatequina Epigallocatequina</p>
Isoflavonas		<p>Genisteína Daidzeína Gliciteína</p>
Antocianidinas		<p>Cianidina Delfinidina Malvidina</p>
Taninos		
Taninos condensados - procianidinas		<p>Procianidina B1 Procianidina B4</p>

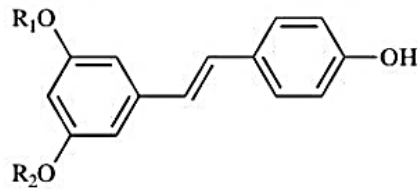
Tabela 1. Continuação

Taninos
hidrolisáveis:
Galotaninos e
Elagitaninos



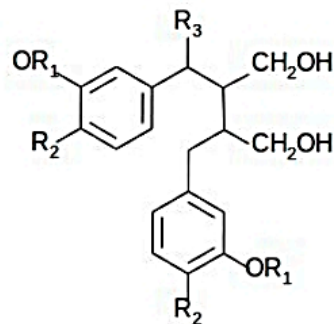
Teogalina
Punicalagina

Estilbenos



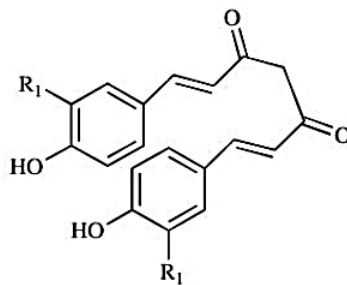
Piceatanol
Resveratrol
Pterostibene

Lignans



Enterodiol
Enterolactona
Matairesinol

Curcuminoides



Curcumina

2.4.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos representam um terço do total de compostos fenólicos (MOJZER et al., 2016), e são caracterizados por conterem ácido carboxílico (COOH) em sua estrutura química (ALTEMIMI et al., 2017). Podem ser classificados em derivados do ácido hidroxibenzoico, como o ácido gálico, ou derivados do ácido hidroxicinâmico, como ácidos coumárico, cafeico e ferulico (DAI e MUMPER, 2010). Estes compostos são encontrados frequentemente em frutas, vegetais e cereais. Estudos descrevem as atividades biológicas desempenhadas por estes compostos, como antioxidante e antitumoral. O ácido gálico é descrito por promover a morte em diferentes linhagens celulares, tanto pela via apoptótica intrínseca quanto extrínseca (FARIED et al., 2007; WANG et al., 2014).

Além deste, o ácido elágico desempenha diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antibacteriana, antiaterosclerose, antihiperlipidêmica, cardioprotetora, antioxidante e antitumoral (MOJZER et al., 2016). Zhang et al. (2014) descrevem que este composto inibe a proliferação de células tumorais ao ativar a via de sinalização TGF- β /Smad3, proteínas responsáveis pela proliferação e diferenciação celular, e induzir a parada do ciclo celular. Adicionalmente, Hagiwara et al. (2010) relatam que o ácido elágico induz a apoptose em células de leucemia mieloide aguda, sendo associada à ativação de caspase-3. O ácido elágico pode ser encontrado na forma glicosilada ou como parte dos taninos hidrolisáveis, chamados elagitaninos (MOJZER et al., 2016).

2.4.2 Flavonoides

Os flavonoides compõem o maior grupo dos compostos fenólicos, totalizando aproximadamente 6.500 compostos (BIESALKI e GRIMM, 2007). São derivados das chalconas e apresentam como estrutura básica três anéis (A, B e C), contendo 15 átomos de carbonos e um esqueleto C6-C3-C6, que pode conter diversos substituintes (ARON e KENNEDY, 2008; DAI e MUMPER, 2010). O anel A é um benzeno, condensado com o anel C de seis membros, que por sua vez apresenta o anel B (um fenil benzeno) unido na posição 2 (Figura 4) (CAROCHO e FERREIRA, 2013; ALTEMIMI et al., 2017).

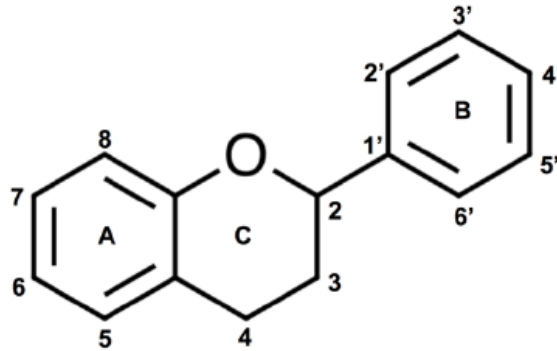


Figura 4. Estrutura geral de um flavonoide

Em geral, os flavonoides ocorrem como glicosídeos, ou seja, unido a uma molécula de glicose, embora também sejam encontrados na forma aglicona (BEHLING et al., 2004). Os flavonoides, de maneira geral, são classificados em seis subgrupos: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis ou flavanóis, isoflavonas e antocianidinas (GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011), os quais se diferem de acordo com o estado de oxidação do anel central C, além do grau e padrão de hidroxilação, metoxilação, prenilação ou glicosilação (DAI e MUMPER, 2010).

2.4.2.1 Flavonas

As flavonas constituem a maior subclasse de flavonoides, e derivam diretamente das flavanonas, pela substituição de dois átomos de hidrogênio por uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. Geralmente ocorrem como 7-O-glicosídeo, mas outros substituintes podem estar presentes (CAROCHO e FERREIRA, 2013). São encontrados em plantas aromáticas, como camomila, salsa e orégano, além de serem comuns em laranjas e cebolas (MOJZER et al., 2016).

Os representantes mais comuns deste grupo são apigenina, crisina, luteonina e rutina, os quais são descritos por apresentarem ação antioxidante, anticarcinogênica, antiviral, anti-inflamatória e antiaterosclerose (DAI e MUMPER, 2010; GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011)

2.4.2.2 Flavonóis

Os flavonóis compõem a subclasse com maior distribuição no reino vegetal, e mais estudada, dentre os flavonoides (MOJZER et al., 2016). Dentre os principais representantes deste grupo estão a quercetina, miricetina e kaempferol (CAROCHO e FERREIRA, 2013). A quercetina é o principal flavonoide da dieta humana, e seu consumo diário estimado varia de

50 e 500 mg (BEHLING et al., 2004), sendo abundante em vegetais (cebola, brócolis e repolho), frutas (maçã, damasco e frutas vermelhas) (DAI e MUMPER, 2010), nozes, sementes, chá preto, vinho e cacau (MOJZER et al., 2016).

Dentre as propriedades biológicas apresentadas pelos flavonóis, estão a proteção contra aterosclerose, osteoporose, diabetes mellitus e células cancerígenas (CAROCHO e FERREIRA, 2013). As formas agliconas de quercetina, kaempferol e miricetina são descritas por promoverem a morte celular por apoptose (CHEN et al., 2005). Quercetina é amplamente conhecida por seu potencial antioxidante, por inibir a peroxidação lipídica, além das propriedades anticâncer, atuando como antimetastático, antiangiogênico, antiproliferativo e pró-apoptótico (MOJZER et al., 2016).

2.4.2.3 Flavanonas

As flavanonas são caracterizadas pela ausência da dupla ligação e do centro quirál no anel C, e ocorrem de maneira limitada na natureza, sendo considerado o menor grupo dentre os flavonoides (CAROCHO e FERREIRA, 2013). Em geral, são encontradas em frutas cítricas, e a molécula mais conhecida dentre as flavanonas é a naringenina e hesperidina, abundantes na toranja e laranja, respectivamente (UMENO et al., 2016).

Estudos mostram o potencial antioxidante, antiobesidade, antihipertensão, antihiperlipemizante e cardioprotetor destes compostos, inclusive com estudos nas fases pré-clínica e clínica (ALAM et al., 2014; TESTAI e CALDERONE, 2017). Mojzer et al. (2016) também revelam as atividades anticâncer de flavanonas.

2.4.2.4. Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis ou flavanóis compõem a subclasse mais complexa dentre os flavonoides, e constituem as principais unidades monoméricas para formação de proantocianidinas poliméricas, chamados taninos condensados (ARON e KENNEDY, 2008). Os flavanóis se diferem das demais subclasses por não apresentarem estrutura planar, pois apresenta um elemento C3 saturado no anel C heterocíclico (CAROCHO e FERREIRA, 2013). Em geral, são abundantes em frutas, vegetais (DAI e MUMPER, 2010), grãos e bebidas, inclusive é constituinte majoritário do chá-verde (*Camelia sinensis*) (FAN et al., 2017).

Sua presença nos alimentos está diretamente relacionada aos parâmetros de adstringência, amargura, acidez, doçura, viscosidade, aroma e formação da coloração (ARON e KENNEDY, 2008). Dentre os flavanóis, a catequina e seus derivados são os mais amplamente

estudados, sendo descritos por suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades anticarcinogênica, cardioprotetora, antimicrobiana, antiviral, neuroprotetora e potente ação antioxidante (MOJZER et al., 2016). Diversos mecanismos de ação antioxidantes são descritos, incluindo captura direta de radicais livres, quelação de metais de transição e modulação de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (ARON e KENNEDY, 2008; FAN et al., 2017).

As atividades apresentadas pela catequina são decorrentes do grande número de grupos hidroxila presentes na molécula, localizadas no C5 e C7 do anel A, C3' e C4' no anel B e no C3 do anel C (FAN et al., 2017). De maneira geral, existem diferentes tipos de catequinas, incluindo epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina e epigalocatequina galato (ARON e KENNEDY, 2008). A epigalocatequina-3-galato é descrita por seu potencial anticâncer, promovendo inibição da angiogênese, invasão e proliferação em diversas linhagens celulares tumorais (GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011).

2.4.2.5 Isoflavonas

As isoflavonas apresentam o anel B unido ao anel C pelo C3, diferente dos representantes das demais subclasses de flavonoides, que apresentam ligação no C2 (CAROCHO e FERREIRA, 2013). Isoflavonas são também conhecidas como compostos fitoestrógenos, por apresentarem ação fitoestrogênicas (FRANKE et al., 2014). São encontradas somente em plantas leguminosas, sendo abundantes em grãos de soja (*Glycine max*) e kudzu (*Pueraria lobata*), espécie nativa do Japão (UMENO et al., 2016). Dentre seus principais representantes, estão a daidzeína, genisteína e gliciteína (DAI e MUMPER, 2010; GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011).

Estas moléculas são descritas na literatura por apresentarem benefícios à saúde, demonstrando ação antidiabética, cardioprotetora, redução dos riscos de desenvolvimento de câncer, em especial de mama e próstata (FRANKE et al., 2014; MOJZER et al., 2016), além de melhorar a saúde dos ossos ao estimular a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais, evitando a osteoporose (ZOFKOVA e BLAHOS, 2017).

2.4.2.6 Antocianidinas

Antocianinas são uma subclasse de flavonoides derivada do flavonol, que contém a fórmula $C_{15}H_{11}O^+$, com a carga positiva no átomo de oxigênio localizado na posição 1 no anel C, resultando no íon favilium (KHOO et al., 2017). Apresentam ligações duplas conjugadas nos três anéis (A, B e C), que dão coloração intensa aos pigmentos (LEE et al., 2017). Estes

compostos são responsáveis pela pigmentação vermelha, roxa e azul de flores, frutos, raízes e menos comumente nas folhas, sendo que a coloração é influenciada pelo pH do meio (KHOO et al., 2017).

Cianina-glicoside é uma das antocianinas mais abundantes, responsável pela coloração de frutas vermelhas, como groselha, framboesa e amora (DAI e MUMPER, 2010). As atividades biológicas deste grupo são atribuídas às formas agliconas, as antocianidinas. Cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina e petunidina são as antocianidinas mais comuns no reino vegetal (GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011; KHOO et al., 2017). Estes compostos têm sido descritos por apresentarem propriedades anti-inflamatória, imunomodulatória, antimicrobiana, antioxidante e antimutagênica, sendo então utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças, incluindo desordens da síndrome metabólica, câncer e doenças cardiovasculares (DAI e MUMPER, 2010; LEE et al., 2017).

2.4.3 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal, e apresentam grande quantidade de anéis fenólicos em sua estrutura (MOJZER et al., 2016). São moléculas capazes de precipitar alcaloides e proteínas, sendo utilizados por muito tempo na produção de couro a partir de pele de animais (ADAMCZYK et al., 2017). São abundantes em frutas como maçã, pêsego e uva, em grãos como feijão e ervilha, além de estarem presentes em bebidas como vinho e chá (MOJZER et al., 2016).

São classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (ALTEMIMI et al., 2017). Os taninos hidrolisáveis apresentam um núcleo central de álcool polihídrico, como a glicose, além de grupos hidroxilas que podem ser esterificados pelo ácido gálico, sendo denominado galotaninos (DAI e MUMPER, 2010; CAROCHO e FERREIRA, 2013). Quando estas moléculas são esterificadas com ácido hexahidroxi-difenico são denominadas elagitaninos (DAI e MUMPER, 2010; ADAMCZYK et al., 2017).

Já os taninos condensados são estruturalmente mais complexos, e são formados por monômeros de flavanóis, como procianidinas e prodelfidinas, unidos por uma ligação de carbono inter flavan (MOJZER et al., 2016; ADAMCZYK et al., 2017). Estes compostos também são conhecidos como proantocianidinas, pois sob condições ácidas podem liberar fenóis monoméricos, como antocianidinas (MA e ZHANG et al., 2017).

Os taninos, como muitos outros compostos fenólicos, desempenham importantes atividades biológicas, como antimicrobiana, anticarcinogênica, cardioprotetora, anti-

inflamatória, além de potente ação antioxidante decorrente da quelação de metais de transição, inibição de enzimas pró-oxidantes e de peroxidação lipídica (CAROCHO e FERREIRA, 2013; MOJZER et al., 2016).

2.4.4 Estilbenos

Os estilbenos compõem um pequeno grupo de compostos fenólicos, sendo descritas cerca de 200 moléculas, que apresentam a fórmula estrutural C6-C2-C6, derivadas da mesma via biossintética que os flavonoides (CAROCHO e FERREIRA, 2013). Dentre os compostos mais conhecidos, estão o piceatanol, pterostibene e resveratrol, sendo este último mais extensivamente estudado, demonstrando relevantes atividades biológicas, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, cardioprotetora e anticâncer (OVESNÁ et al., 2006; CAROCHO e FERREIRA, 2013; CHANG et al., 2017).

O resveratrol é encontrado de forma abundante em uvas e seus produtos, como o vinho, além de estar presente em frutas vermelhas (barries) e amendoim (MOJZER et al., 2016). Este composto é descrito por apresentar relevante ação antitumoral, inibindo a iniciação e promoção da progressão de várias linhagens celulares, incluindo de pele, mama, próstata, cólon, oral, gástrica e leucêmica (MOJZER et al., 2016). Mou et al. (2011) destacam que este composto fenólico apresenta grande potencial no desenvolvimento de droga antitumoral, estudos pré-clínicos demonstram sua atuação na modulação do fator nuclear NF- κ B, família de fatores transcricionais envolvidos na regulação de uma série de respostas biológicas, incluindo proliferação, migração celular e apoptose (DOLCET et al., 2005).

Ensaios clínicos evidenciaram a propriedade antitumoral de resveratrol na proliferação de células de leucemia mieloide aguda, além de reconstituir o número de células progenitoras hematopoéticas na medula óssea (AGGARWAL et al., 2004).

2.4.5 Lignan

Lignan são moléculas formadas pela união de dois resíduos de ácido cinâmico ou seus derivados, e estão presentes em todos os órgãos das plantas (CAROCHO e FERREIRA, 2013) e envolvidos na formação da parede de células vegetais (MOJZER et al., 2016). As principais fontes de lignanas são a semente de linhaça, gergelim e bardana (*Arctium lappa* L.) (ZHOU et al., 2016) e óleo de oliva, sendo a principal fração fenólica encontrada neste produto (MOJZER et al., 2016). Dentre as lignanas descritas estão sesaminol, sesamin e epissemi (DAI e MUMPER, 2010). Secoisolariciresinol e matairesinol podem ser convertidas em enterodiol e

enterolactona por bactérias do cólon humano, sendo formas mais biologicamente ativas e melhor absorvida pela circulação entero-hepática (MOJZER et al., 2016).

As lignanas são estruturalmente similares ao estradiol ou 17 β -estradiol (IDEHEN et al., 2017), hormônio sexual da classe dos esteroides, e estudos mostram seu potencial no tratamento de cânceres relacionados à ação hormonal, como câncer de mama, próstata e cólon (ZHOU et al., 2016). Imran et al. (2015) relatam que a lignana secoisolariciresinol diglucoside e seus metabólitos apresentam ação antitumoral, sendo correlacionada à sua ação antioxidante ou capacidade de inibir a ação de enzimas envolvidas no metabolismo de hormônios esteroides. Adicionalmente, lignanas também apresentam ação antiviral, antibacteriana, fungicida, inseticida e cardioprotetora (IDEHEN et al., 2017).

2.4.6 Curcuminoides

Curcuminoides são compostos fenólicos de pigmento amarelo, e são as principais moléculas bioativas presentes no rizoma de *Curcuma longa* L., conhecida popularmente por açafrão-da-terra ou açafrão-da-Índia, representando de 3 a 5% de sua composição (AGRAWAL e MISHRA, 2010). Esta planta é utilizada na culinária mundial há muito tempo como tempero, e apresenta a curcumina como principal composto bioativo (HEWLINGS e KAUMAN, 2017). Os curcuminoides também são utilizados comercialmente como conservantes e na coloração de alimentos, medicamentos e cosméticos, além de apresentarem ação antioxidante, cicatrizante, anti-inflamatória, e especialmente, propriedade antitumoral (MOJZER et al., 2016).

Como mecanismos de ação antioxidante, a curcumina é descrita por modular a ação de enzimas antioxidantes, como SOD e CAT, agindo na neutralização de radicais livres, como também pode inibir as enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio, como lipoxigenase/ciclooxygenase e xantina hidrogenase/oxidase (HEWLINGS e KAUMAN, 2017). Por ser um composto lipofílico, a curcumina atua na captura de radicais peroxila, gerados durante o processo de peroxidação na bicamada lipídica das células, similar à ação da vitamina E (tocoferol) (AGRAWAL e MISHRA, 2010).

A interação destes compostos com proteínas, resulta na modulação de vias relacionadas à adesão, crescimento e proliferação celular, além de inibir o processo de angiogênese e promover a apoptose de uma gama de linhagens de células tumorais, como de mama, pele, estômago, duodeno e cólon (MOJZER et al., 2016). Por apresentar significativa ação antitumoral, *in vitro* e *in vivo*, estudos clínicos estão sendo realizados visando o desenvolvimento de futuros agentes anticâncer (AGRAWAL e MISHRA, 2010).

Mou et al. (2011) relatam o efeito anticâncer da curcumina na fase II de estudo clínico, em que 25 pacientes com câncer pancreático foram tratados com este composto e apresentaram resultados satisfatórios, com destaque para a redução de 75% do volume tumoral em um dos pacientes.

2.5 Estresse oxidativo

Diversas doenças, como câncer, diabetes, aterosclerose, doenças inflamatórias, distúrbios neurológicos como Alzheimer, Parkinson e distrofia muscular, doenças cardiovasculares, além do envelhecimento precoce, estão relacionadas ao processo de estresse oxidativo (SULTAN, 2014; ANDRISIC et al., 2017; ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017). Este processo é resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a neutralização destas por agentes antioxidantes (VALKO et al., 2007; MIYATA et al., 2017).

As espécies reativas são geradas a partir de processos metabólicos comuns no organismo, em condições fisiológicas normais, como durante a respiração celular, fagocitose, inflamação, exercícios físicos em excesso, agregação de plaquetas e angiogênese (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017) ou por agentes externos, como fumaça de cigarro, poluentes ambientais, radiação ultravioleta, pesticidas, solventes industriais, dentre outros (SULTAN, 2014; ANDRISIC et al., 2017). Desta maneira, as moléculas formadas como subprodutos do processo redox celular podem desempenhar tanto função benéfica quanto tóxica ao organismo.

Dentre as espécies mais comumente formadas estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), as quais podem conter radicais livres, que são espécies químicas altamente reativas que possuem um elétron desemparelhado na órbita externa da molécula, ou espécies não radicalares, que embora não contenham um elétron desemparelhado, são altamente reativos por serem responsáveis pela formação dos radicais livres (FANG et al., 2002; SULTAN, 2014). Entre as EROs mais comuns, são destacados os radicais livres ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\bullet OH$), peroxila ($RO_2^{\bullet-}$), alcoxila (RO^{\bullet}) e hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), enquanto as ERNs têm como principais representantes o óxido nítrico ($\bullet NO$) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) (FANG et al., 2002; SULTAN, 2014). Estas moléculas podem ser convertidas em espécies reativas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

2.5.1 Espécies reativas de oxigênio

Em organismos aeróbicos a produção energética é decorrente do consumo de oxigênio, que também está envolvida em respostas imunológicas, detoxificação de xenobióticos e processos inflamatórios (ANDRISIC et al., 2017). Durante o metabolismo do oxigênio, são produzidas EROs decorrentes de uma série de vias metabólicas (Figura 5).

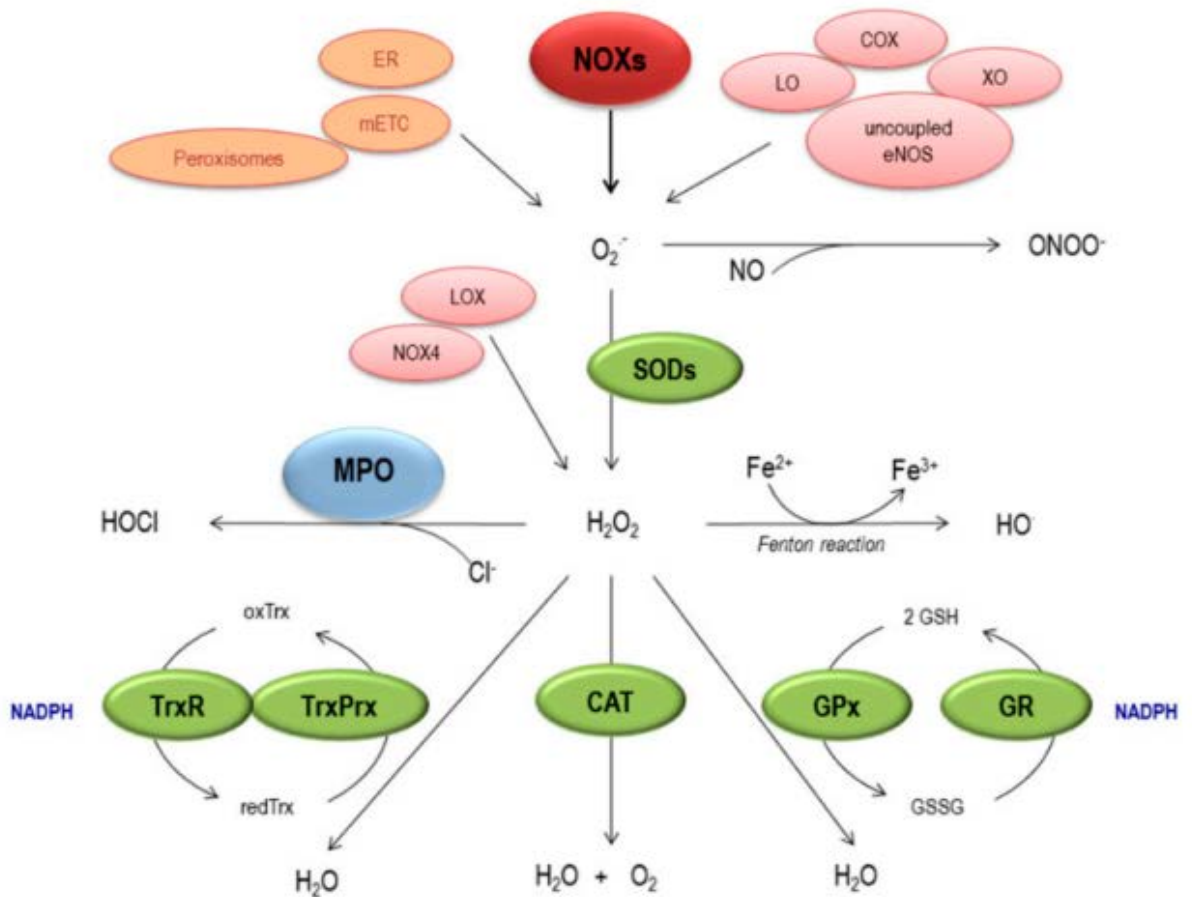


Figura 5. Vias metabólicas responsáveis pela geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Fonte: Martin-Ventura et al. (2017).

No processo de respiração normal, o oxigênio molecular (O_2) é reduzido nas mitocôndrias, através da transferência de quatro elétrons para gerar duas moléculas de água (H_2O) (VALKO et al., 2006). Neste processo de redução tetravalente do O_2 , moléculas de $O_2^{\cdot-}$ são formadas. Este processo é mediado por diferentes enzimas, incluindo NADPH oxidases (NOXs), xantina oxidase (XO), lipoxigenase (LO), ciclooxigenase (COX), isoformas citocromo

P450 (CYP450), monoxigenases e óxido nítrico sintase endotelial desacopladas (eNOS) (MARTIN-VENTURA et al., 2017; MIYATA et al., 2017). Além do processo enzimático, o O_2^- também pode ser formado de forma não enzimática, pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (mETC), retículo endoplasmático (ER) e peroxissomos (MARTIN-VENTURA et al., 2017).

Uma vez formado, o O_2^- pode reagir rapidamente com óxido nítrico (NO), promovendo a formação de peroxidonitrito ($ONOO^-$), ou pode ser transformado em H_2O_2 espontaneamente ou por meio de enzimas SOD (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017). Adicionalmente, alguns tipos de NOXs (NOX-1-5) e oxidases dual DUOX-1 e DUOX-2, podem atuar na transformação de O_2^- em H_2O_2 , especialmente durante o processo de formação dos vasos sanguíneos e infiltração de monócitos/macrófagos, mediados pela NADPH oxidase (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017), mas também esta transformação pode ser decorrente de subprodutos do metabolismo de diferentes enzimas, incluindo algumas que são importantes em doenças cardiovasculares, como a lisil oxidase (LOX) (MARTIN-VENTURA et al., 2017).

O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio, que, embora não apresente muita reatividade, se torna prejudicial por participar da reação que produz *OH (MORTEZAEI e KHANLARKHANI, 2017), molécula mais reativa nos sistemas biológicos, especialmente por atacar biomoléculas importantes ao funcionamento das células, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, acarretando em danos celulares e teciduais (VALKO et al., 2006; LOBO et al., 2010). O H_2O_2 pode ser convertido à *OH pela reação de Fenton (MORTEZAEI e KHANLARKHANI, 2017).

O ferro desempenha função primordial durante o metabolismo e proliferação celular, atua como constituinte funcional de várias enzimas, e geralmente está associado ao grupo heme, que contém o íon ferro como átomo central, fundamental na formação da hemoglobina nos eritrócitos. No estado metabólico normal, o O_2^- favorece a oxidação de ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}) à sua forma férrica (Fe^{3+}). Contudo, se a concentração intracelular de O_2^- é elevada, a reação favorece a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} perpetuando a reação de Fenton e formando mais *OH (MORTEZAEI e KHANLARKHANI, 2017).

Além de ser convertido à *OH , o H_2O_2 também pode ser convertido em outras moléculas reativas, como o HOCl pela mieloperoxidase (MPO), enzima que atua na ativação de neutrófilos, os quais desempenham propriedades pró-oxidante e pró-inflamatória, importantes no processo antimicrobiano e no sistema imunológico (MARTIN-VENTURA et al., 2017).

Entretanto, apesar da transformação de H_2O_2 em moléculas reativas, este pode ser transformado em moléculas de H_2O pelas enzimas antioxidantes catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx)/glutathione redutase (GR) (MORTEZAEE e KHANLARKHANI, 2017). A GPx catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O por meio da glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétron, sendo esta transformada em glutathione dissulfeto (GSSG), que é a forma oxidada, que pode ser convertida à GSH através da oxidação do NADPH pela glutathione redutase (VALKO et al., 2006).

Outro sistema de detoxificação de H_2O_2 em moléculas de água é pelo sistema tioredoxina (Trx), em que peroxidases dependentes de thiol, como a peroxiredoxina (PRx), atuam na remoção de espécies reativas rapidamente, por meio das enzimas tioredoxina redutase (TrxR) e tioredoxina peroxidase (TrxPrx) (MARTIN-VENTURA et al., 2017).

A produção excessiva de espécies reativas, em especial $\cdot OH$, pode gerar danos oxidativos no material genético, resultando nas primeiras etapas que resultam na mutagênese e carcinogênese (VALKO et al., 2007; ROBBINS e COTRAN, 2010). Diversas reações bioquímicas ocorrem durante a metabolização do oxigênio que leva a geração de moléculas intermediárias tóxicas ao DNA. De maneira geral, $\cdot OH$ reage com o DNA ao ser adicionado às suas fitas duplas ou sequestrar átomos de hidrogênio a partir do grupo metil de timina e das ligações C-H da desoxirribose, resultando na quebra da cadeia de DNA (COOKE et al., 2003). Os danos gerados ao DNA podem estimular vias que estão associadas com a carcinogênese, como a parada ou indução da transcrição, indução da via de transdução de sinal, erro na replicação e instabilidade genômica (VALKO et al., 2006).

Além dos danos gerados ao material genético, as espécies reativas também promovem sérios danos às proteínas, pois são encontradas abundantemente nos sistemas biológicos e são responsáveis por grande parte dos processos metabólicos (DALLE-DONNE et al., 2006). Em geral, os danos gerados nas proteínas podem comprometer sua estrutura e conseqüentemente sua função. O radical $\cdot OH$ pode inativar várias proteínas, ao oxidar grupos sulfidrilas ou ligação dissulfeto (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Este radical pode sequestrar um átomo de hidrogênio da estrutura de polipeptídeos de proteínas, para formar um radical centrado no carbono, que em condições aeróbicas, reage com O_2 para formar radicais peroxila ($RO_2\cdot$) (VALKO et al., 2006).

As EROs podem atacar proteínas estruturais e enzimáticas pela formação de ligações cruzadas, oxidação de aminoácidos residuais e grupos prostéticos (MORTEZAEE e KHANLARKHANI, 2017). A modificação desta biomolécula pode resultar na inibição das

atividades enzimáticas, aumento da susceptibilidade à agregação e proteólise, alteração na absorção destas proteínas pelas células, alteração nos processos de imunogenicidade e de proteínas transportadoras (VALKO et al., 2006). Como consequência destas alterações protéicas, outras biomoléculas são prejudicadas, como a inativação da DNA polimerase e enzimas reparadoras do DNA, o que contribuirá para o processo de envelhecimento precoce, mutagenicidade, além de diversas outras doenças (DALLE-DONNE et al., 2006).

Outro tipo de dano acarretado pelo excesso de espécies reativas no organismo é a peroxidação lipídica. As células são envoltas por membranas formadas por bicamada lipídica, que em contato com EROs são expostas à oxidação. Neste processo, os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares são oxidados devido a presença de grande quantidade de duplas ligações na estrutura, geralmente pela espécie reativa $\cdot\text{OH}$ (MORTEZAEI e KHANLARKHANI, 2017). Neste processo, $\cdot\text{OH}$ captura um átomo de H^{\bullet} de um grupo metileno alílico, entre uma ligação dupla do ácido graxo poli-insaturado, resultando em um radical lipídico centrado em carbono, altamente reativo, caracterizando a etapa de iniciação.

Em seguida, ocorre o processo de propagação, em que o radical lipídico geralmente é estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado (duas duplas ligações intercaladas com uma ligação simples entre carbonos), que pode reagir com o O_2 , formando o radical peroxila (RO_2^{\bullet}), que por sua vez sequestra outro H^{\bullet} da cadeia lateral de ácidos graxos poli-insaturados, propagando o processo de peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O radical RO_2^{\bullet} pode formar um peróxido cíclico, que se decompõe em seguida, formando uma série de produtos de degradação, como os aldeídos malondialdeído, 4-hidroxi-2-nonenal e 2-propenal (DALLE-DONE et al., 2006), amplamente utilizados como marcadores do processo de peroxidação lipídica.

Estes produtos apresentam fácil reatividade com várias biomoléculas, incluindo proteínas, DNA e fosfolipídios, gerando danos estruturais e funcionais, e conseqüentemente contribuindo para a patogênese de várias doenças (TURUNEN et al., 2004). O processo oxidativo de lipídios resulta em desorganização da membrana celular, levando à sua permeabilidade e conseqüente extravasamento de enzimas, promovendo a morte celular (MORTEZAEI e KHANLARKHANI, 2017).

2.5.2 Compostos antioxidantes

Substâncias antioxidantes são aquelas capazes de inibir e/ou reduzir os danos promovidos pelas espécies reativas, evitando a reação destas com as biomoléculas (MORTEZAEI e KHANLARKHANI, 2017). As substâncias com propriedades antioxidantes podem ser de origem sintética ou natural. Os antioxidantes sintéticos, tais como hidroxibutiltolueno (BHT), hidroxibutilanisol (BHA) e ácido etileno diamino tetracético (EDTA) são utilizados comercialmente em cosméticos e alimentos, porém, apresentam efeitos tóxicos e carcinogênicos em altas concentrações (GORJI et al., 2016).

Já os antioxidantes naturais são produzidos por sistemas biológicos, como em micro-organismos, plantas e animais. Em organismos animais, para inibir a ação deletéria das EROs a própria célula desenvolve meios de se proteger, pela síntese de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre as enzimas que atuam na neutralização de radicais livres estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (VALKO et al., 2007).

A enzima SOD está presente em células aeróbicas e fluidos extracelulares, e representa a primeira linha de defesa das células, atuando na dismutação do ânion $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 (FREI, 1994). São descritos três tipos de SOD, a forma citosólica Cu/Zn-SOD (SOD1), a mitocondrial Mn-SOD (SOD2) e extracelular EC-SOD (SOD3) (VALKO et al., 2006; LOBO et al., 2010).

O H_2O_2 formado pela SOD é metabolizado a H_2O e O_2 pelas reações enzimáticas catalisadas pela CAT e GPx (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017). A enzima CAT é a mais abundante no fígado, está presente nos peroxissomos (VALKO et al., 2006). Além desta, a enzima GPx atua na detoxificação de H_2O_2 e sua atividade é dependente da glutatona reduzida (GSH), que é oxidada em glutatona dissulfeto (GSSG) (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017). A manutenção dos níveis de GSH no interior da célula é realizada pela enzima glutatona redutase, que converte GSSG em GSH, pela oxidação de NADPH (LOBO et al., 2010).

Adicionalmente, os sistemas biológicos também utilizam mecanismos antioxidantes não enzimáticos na proteção contra a produção excessiva de espécies reativas. Dentre os antioxidantes não enzimáticos endógenos estão a glutatona, coenzima Q, ácido úrico e melatonina. A glutatona é um tripeptídeo que apresenta importantes funções nas células, como a ação antioxidante devido a presença do grupo tiol, além de ser um co-fator da família de enzimas GPx (LOBO et al., 2010). A coenzima Q ou ubiquinona, é um lipídio que atua como antioxidante na cadeia respiratória mitocondrial, impede a peroxidação em membranas lipídicas

ao inibir a formação de radicais RO_2^* , além de atuar na regeneração da vitamina E, outro importante agente antioxidante (TURUNEN et al., 2004).

Além destes, o ácido úrico, derivado do metabolismo das purinas, atua como inibidor da peroxidação lipídica (WEN et al., 2017). Em condições fisiológicas no corpo humano o ácido úrico é dissociado a urato, que tem a capacidade de quelar metais de transição, como o ferro, e impedir que radicais RO_2^* penetrem a membrana celular (VASCONCELOS et al., 2007). O urato é um antioxidante natural presente no cérebro e fluidos corporais, desempenha importante função neuroprotetora, como na doença de Parkinson (WEN et al., 2017).

Já a melatonina é um dos principais antioxidantes endógenos que protege o fígado, e exerce sua função diretamente pelo sequestro de radicais livres e indiretamente pela estimulação de enzimas antioxidantes (MORTEZAEE e KHANLARKHANI, 2017).

Além de produzir antioxidantes necessários para sua proteção, o organismo também pode utilizar compostos antioxidantes provenientes da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), compostos fenólicos e alguns terpenos. Estas substâncias são amplamente encontradas em fontes vegetais.

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é um poderoso antioxidante que atua em ambientes aquosos no corpo, capturando EROs pela rápida transferência de elétrons, que inibe a peroxidação lipídica (FLORA, 2009). Também atua na proteção contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, reduzindo a progressão da aterosclerose (FREI, 1994). Em sistemas biológicos, o ácido ascórbico se encontra na forma de ascorbato, que é a forma que age como antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007). Apesar da ampla gama de benefícios, em altas concentrações o ácido ascórbico atua como pró-oxidante, levando à peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O α -tocoferol, também conhecido como vitamina E, é o mais importante antioxidante de membranas e lipoproteínas, pois inibe a peroxidação lipídica ao capturar radicais RO_2^* (FREI, 1994). Durante este processo, o α -tocoferol doa um átomo de hidrogênio para estabilizar o radical RO_2^* , deste modo interrompe a reação e é estabilizado por ressonância (BIESALKI e GRIMM, 2007). Adicionalmente, protege proteínas e DNA contra as espécies reativas (FANG et al., 2002). Carotenoides, como o β -caroteno, apresentam ação antioxidante ao reagir com o radical RO_2^* para formar um radical centrado em carbono, assim inibe a propagação de EROs (FANG et al., 2002).

2.6. Câncer

O estresse oxidativo está diretamente envolvido no desenvolvimento e progressão tumoral, mas também pode ser um dos mecanismos de terapias anticâncer. O aumento da produção de EROs está relacionada à ativação de diferentes oncogenes ou mutação de genes de supressão tumoral, induzindo mutações de DNA adicionais (ANDRISIC et al., 2017).

A divisão e proliferação celular normal do organismo está sob efeito constante de mutações no material genético, que são reparados por proteínas e enzimas específicas da célula. Entretanto, falhas no mecanismo de reparo destas lesões ou mutações genéticas, por causas diversas e complexas, pode promover alterações no metabolismo celular, como distúrbio da proliferação e diferenciação celular, resultando o desenvolvimento do câncer (CLANCY, 2008; KARRAN e BREM, 2016).

O câncer está entre as principais doenças que acometem a humanidade, com estimativa de 14,1 milhões de casos e 8,2 milhões de mortes em todo o mundo (ISAH, 2016). A etiologia do câncer é multifatorial, podendo ser predisposição genética, fatores ambientais e/ou decorrente do estilo de vida, como tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, exposição a radiações ionizantes e agentes infecciosos específicos (ROBBINS e COTRAN, 2010).

2.6.1 Leucemias

Leucemias são tipos de cânceres que acometem as células sanguíneas brancas (Yan et al., 2014), responsáveis pela ativação do sistema imunológico. Podem ser classificadas de acordo com a origem celular, sendo linfoide ou mieloide, e quanto à evolução da doença, podendo ser aguda, quando as células alteradas se encontram em fase muito imatura, ou crônica, quando são mais maduras (American Cancer Society, 2013).

A leucemia linfoide aguda, também conhecida como leucemia linfoblástica aguda, afeta crianças e adultos, sendo a maior causa de mortalidade relacionada ao câncer infantil, totalizando cerca de 25% dos cânceres na faixa etária entre 2 e 5 anos (STARÝ e HRUŠÁK, 2016). Os fatores etiológicos que resultam neste tipo de câncer ainda são desconhecidos, embora cerca de 5% dos casos estão associados à fatores hereditários, como síndrome de Down's e síndrome de Bloom (PUI et al., 2008).

Leucemia linfoide crônica ou leucemia linfocítica crônica, afeta linfócitos B na maioria dos casos, e é caracterizada como uma doença linfoproliferativa. Células alteradas se acumulam

no sangue periférico, medula óssea e órgão linfoides sólidos, e embora apresente baixa mortalidade, esta doença não demonstra grandes chances de cura (GOMES et al., 2018). Já a leucemia mieloide aguda é caracterizada pela presença de células de origem mieloide indiferenciadas que se infiltram na medula óssea, sangue e outros tecidos por proliferação clonal (DÖHNER et al., 2010). Comum em adultos, este tipo de leucemia é curável em cerca de 35-40% dos pacientes com menos de 60 anos, e esta percentagem reduz para 5-15% em pessoas com mais de 60 anos de idade (DÖHNER et al., 2015).

Leucemia mieloide crônica é caracterizada como desordem mieloproliferativa que se desenvolve principalmente em adultos, com predominância em indivíduos do sexo masculino (CORTES, 2004). Aproximadamente 95 % dos casos diagnosticados de leucemia mieloide crônica são decorrentes de alteração genética, que acontece devido a translocação entre genes dos cromossomos 9 e 22, resultando no cromossomo denominado Philadelphia (Ph) (FADERL et al., 1999).

Para controlar ou inibir a proliferação destas células alteradas em pacientes leucêmicos, são realizados diferentes tratamentos combinados, como terapias químicas, radiológicas e transplantes de células-tronco (PORTH e MATFIN, 2010). Estudos fitoquímicos vêm sendo descritos buscando novas alternativas que possam auxiliar na prevenção e ou tratamento do câncer, incluindo os diferentes tipos de leucemias (ASMAA et al., 2014).

Os compostos fenólicos são um dos principais responsáveis pela ação citotóxica de linhagens tumorais. Dentre seus principais mecanismos de ação estão supressão da angiogênese, inibição de oncogenes como BCR/ABL, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (enzima promotora da divisão celular e inibidora da apoptose), ativação de caspases, ativação de macrófagos e parada do ciclo celular (FERREIRA e CAROCHO, 2013).

2.6.2 Mecanismos de ação citotóxica

Os métodos comumente utilizados no tratamento de diferentes tipos de cânceres são a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e combinação entre terapias (PORTH e MATFIN, 2010). Apesar dos avanços nas terapias contra o câncer, pelo avanço da biologia molecular e celular, a opção mais utilizada no tratamento desta doença é por meio da quimioterapia, que muitas vezes falha frente às células resistentes às drogas (MANSOORI et al., 2017). Desta maneira, drogas que promovem a morte de células cancerígenas por diferentes mecanismos de ação são de extrema importância, especialmente em linhagens celulares que apresentam resistência a determinados tipos de morte celular.

De maneira geral, as drogas quimioterápicas desencadeiam o processo de morte celular programada, chamada apoptose. Durante a apoptose, proteínas específicas ativam uma cascata de sinalização, que age de maneira organizada, sem promover um processo inflamatório local. Este tipo de morte celular está naturalmente envolvido em processos fisiológicos do corpo humano, como na involução dos tecidos dependentes de hormônio, morte das células que já tenham cumprido sua função, como em processos inflamatórios ou do sistema imune (PORTH e MATFIN, 2010), bem como na destruição programada das células durante o desenvolvimento embrionário ou que sofreram algum dano irreversível em seu material genético, e ainda no processo de envelhecimento (SUHAILI et al., 2017).

Drogas antitumorais como cisplatina, vimblastina e vincristina, induzem a morte celular por apoptose. Durante o processo de apoptose, ocorre a retração celular, condensação da cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos e, por último, ocorre a fagocitose destes corpos pelos macrófagos (PATEL et al., 2006). A indução da apoptose pode ser regulada por duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 6) (SUHAILI et al., 2017).

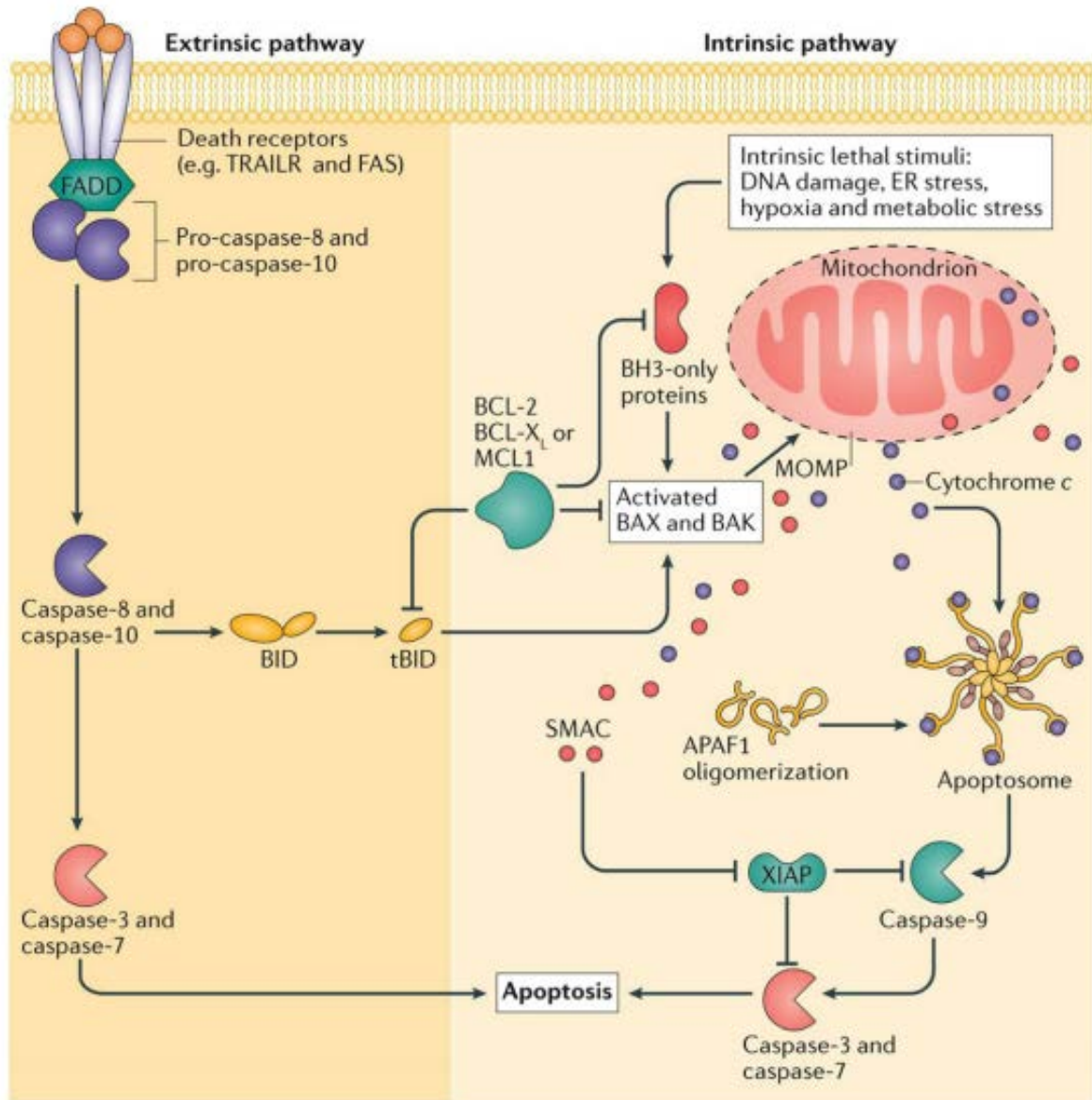


Figura 6. Morte celular programada: vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Fonte: Suhaili et al. (2017)

Em ambas as vias, a fase de execução é realizada pelas caspases, que são uma família de cisteína proteases aspartato-específicas, que estão presentes no citoplasma celular na forma inativa, sendo denominada procaspase, e são ativadas pela autoproteólise induzida pela interação com proteínas adaptadoras (domínios efetores de morte ou domínios de recrutamento de caspase) ou pela clivagem de outras proteases (KRYSKO et al., 2008).

A via extrínseca da apoptose é desencadeada após interações mediadas com receptores transmembrana com seus respectivos ligantes (DORN, 2013). Estes receptores de morte pertencem à família fator de necrose tumoral (TNFRF), que tem como membros os receptores FAS, TNF-R1 e TRAIL-R1 e 2, que tem como ligantes específicos o FAS ligante (FASL), TNF- α e TRAIL, respectivamente (SUHAILI et al., 2017). Esta interação resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras, como FADD para o receptor Fas, que recruta procaspase-8 e 10, formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC), ativando a autocatálise de caspase-8 e 10, tornando-as ativas (GRIVICICH et al., 2007). Estas caspases ativas desencadeiam a ativação das procaspases-3 e 7 em caspase-3 e 7, enzimas efetoras da apoptose (BRENTNALL et al., 2013).

A via intrínseca da apoptose requer a perda do potencial da membrana mitocondrial da célula, que promove a abertura dos poros da membrana mitocondrial, controlada por membros da família Bcl-2 (DORN, 2013). A família Bcl-2 contém moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) e pró-apoptóticas (Bax, Bid e Bak), que em células normais estão em equilíbrio, mas sob estímulos apoptóticos levam ao aumento da expressão de Bax, Bid e Bak, resultando na abertura dos poros da membrana mitocondrial (GRIVICICH et al., 2007).

A abertura dos poros da membrana mitocondrial resulta na liberação de moléculas pró-apoptóticas, como citocromo C, do espaço intermembranas da mitocôndria para o citosol, formando o complexo denominado apoptosomo, juntamente com a protease apoptótica APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1), procaspase-9 e ATP (KIM et al., 2003). Neste processo, a procaspase-9 é ativada, e passa a ser chamada de caspase-9, que ativa procaspases-3 e 7 em caspases-3 e 7, respectivamente (PROSKURYAKOV et al., 2003; SUHAILI et al., 2017). A caspase-3 é responsável pelas etapas finais de execução da apoptose (SAKULNARMRAT et al., 2013), atuando na clivagem proteolítica da enzima reparadora de DNA, a poli(ADP-ribose)polimerase (COHEN, 1997), resultando na morte celular, enquanto a caspase-7 efetora é necessária para promover o desprendimento das células apoptóticas (BRENTNALL et al., 2013). As vias extrínseca e intrínseca não são completamente independentes uma da outra, elas convergem na ativação das caspases, durante a cascata de sinalização, promovendo a formação dos corpos apoptóticos e engolfamento destes por fagocitose (SUHAILI et al., 2017).

Além da indução da morte celular por apoptose, algumas drogas quimioterápicas apresentam como mecanismo de ação a morte por necrose. Nas células que sofrem morte induzida por necrose a perda do potencial da membrana mitocondrial não é dependente de ATP,

e a abertura dos poros da membrana mitocondrial não são controlados por outras proteínas, consequentemente ocorre o inchaço osmótico da matriz mitocondrial, resultando na expansão, ruptura da membrana externa da mitocôndria (PROSKURYAKOV et al., 2003; DORN, 2013) e ocorre a liberação do conteúdo intracelular (KROEMER et al., 2009). Adicionalmente, estudos recentes evidenciam uma forma regulada de necrose, denominada necroptose. Nesta via, o mecanismo programado é decorrente de fenótipos característicos da morte celular por necrose, mas é desencadeado por uma série complexa de interação entre moléculas, especialmente o necrossoma, formado pela interação entre RIP1 (*receptor interacting protein kinase 1*), RIP3 (*receptor interacting protein kinase 3*) e MLKL (*lineage kinase domain-like protein*) (Figura 7) (HANSON, 2016).

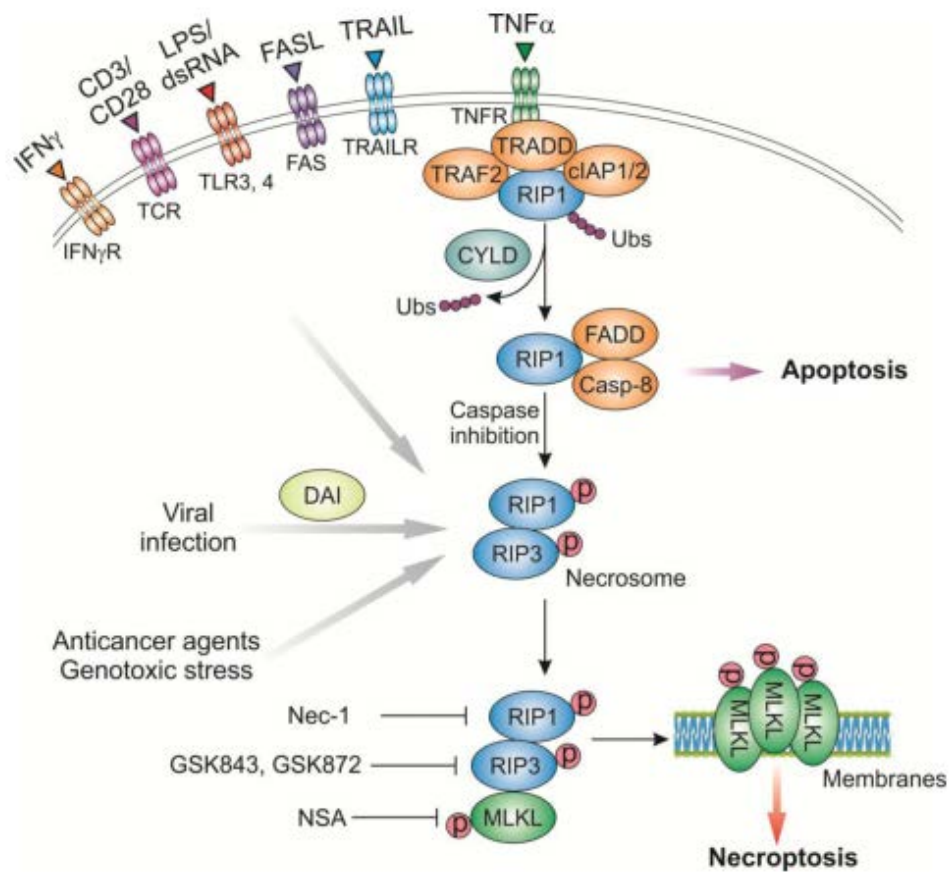


Figura 7. Mecanismos de ação de morte celular via necroptose. Fonte: Chen et al. (2016)

A morte celular necroptótica difere da morte por necrose por ser ativada em resposta à grave estresse celular e em situações em que a morte por apoptose é comprometida (CHO e PARK, 2017). Se a atividade de caspase-8 é inibida, na via extrínseca da apoptose, RIP1 se liga à RIP3 para formar um complexo denominado necrossomo, que promove auto-fosforilação de RIP3 e subsequente ativação desta proteína, que recruta MLKL fosforilada (CHEN et al., 2016). Oligômero de MLKL são inseridos na membrana e promovem ruptura na integridade das membranas celular e intracelular, promovendo a morte por necroptose (CHO e PARK, 2017).

De maneira geral, a morte por necroptose é ativada por receptores de morte, como o receptor TNF, mas pode ser estimulada por FASL, TRAIL, LPS, além de infecções virais, que ativam diretamente RIP3 através de *DNA-dependent activator of interferon regulatory factors* (DAI), adicionalmente, agentes anticâncer e estresse genotóxico também podem induzir necroptose dependente de RIP1/RIP3 (CHEN et al., 2016).

Além dos perfis de morte celular apresentados até o momento, outro mecanismo de ação de drogas quimioterápicas tem sido destaque, a chamada apoptose tardia, também conhecida como pós-apoptótica ou necrose secundária (PATEL et al., 2006). Neste tipo de morte celular ocorrem eventos moleculares e bioquímicos típicos da apoptose e necrose. É caracterizado como um processo apoptótico que não ocorre fagocitose e que são ativados mecanismos semelhantes aos da necrose (KRYSKO et al., 2008). A apoptose tardia é iniciada por fragmentação nuclear, intensa condensação da cromatina e liberação da caspase-3 ativada, características típicas da apoptose, e finalizando o processo apresentando inchaço citoplasmático e permeabilização da membrana celular, o que resulta na perda da integridade de membrana, processos que caracterizam a morte celular por necrose (KROEMER et al., 2009; SILVA, 2010).

Dentre os mecanismos de ação evidenciados como estratégia efetiva para eliminar células cancerígenas, está a indução da parada do ciclo celular (CHO et al., 2011). O ciclo celular é um processo complexo, que depende da participação de muitas moléculas regulatórias (ZHU et al., 2015). O metabolismo irregular das células tumorais está associado às falhas neste processo, resultando na proliferação celular descontrolada (ZHANG et al., 2015). Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas desempenham papel fundamental na progressão do ciclo celular, sendo responsáveis pela evolução do ciclo para as fases seguintes (CHANG et al., 2017). Inibidores de CDKs tem sido alvo de pesquisas anticâncer, pela habilidade de parada do ciclo de células tumorais e prevenção da proliferação celular. Dentre as proteínas envolvidas

nos mecanismos de proliferação e parada do ciclo celular estão as proteínas Ki-67 e retinoblastoma (Rb).

Ki-67 é uma proteína nuclear expressa durante a proliferação celular, em todas as fases ativas do ciclo, sendo necessária para manter os cromossomos mitóticos individuais dispersos no citoplasma após a desmontagem do envelope nuclear (TORQUATO et al., 2017). A redução da expressão desta proteína está associada à inibição da proliferação celular. Além desta, a proteína Rb, quando fosforilada por complexos Ciclina-CDK, induz a expressão do fator transcricional E2F, promovendo a progressão do ciclo celular (HAMILTON e INFANTE, 2016). Em células normais, a proteína Rb não está fosforilada e inibe a progressão do ciclo celular até a célula estar pronta para se dividir, e no estado fosforilado, permite a progressão do ciclo celular, já em células tumorais, Rb permanece constantemente no estado fosforilado, induzindo a divisão e proliferação celular (VÉLEZ-CRUZ e JOHNSON, 2017). Quimioterápicos que atuam na redução da expressão destas proteínas atuam no controle da proliferação de células tumorais.

3 OBJETIVOS

GERAL

Investigar a composição química, potencial farmacológico e mecanismos de ação dos extratos de *Senna velutina* e *Campomanesia adamantium*.

ESPECÍFICOS – ARTIGO I

Caracterizar a composição química do extrato etanólico de folhas de *S. velutina*;
Avaliar a atividade antioxidante do extrato pela captura do radical livre DPPH;
Investigar o potencial de inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos;
Analisar a ação citotóxica e mecanismos de ação do extrato contra as linhagens leucêmicas Jurkat e K562;

ESPECÍFICOS – ARTIGO II

Caracterizar a composição química dos extratos aquosos de folhas e raízes de *C. adamantium*;
Analisar a ação citotóxica e mecanismos de ação dos extratos contra a linhagem leucêmica Jurkat e células mononucleares de sangue periférico;

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK, B.; SIMON, J.; KITUNEN, V.; SYLWIA ADAMCZYK.; SMOLANDER, A. Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. **ChemistryOpen**, v. 6, p. 610- 614, 2017.

AGRA, M.F., FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AGRAWAL, D.K.; MISHRA, P.K. Curcumin and Its Analogues: Potential Anticancer Agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, p. 818-860, 2010.

AGGARWAL, B.B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R.S.; SEERAM, N.P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer Research**, v. 24, p. 2783-2840, 2004.

ALAM, M.A.; NUSRAT SUBHAN, N.; RAHMAN, M.M.; UDDIN, S.J.; REZA, H.M.; SARKER, S.D. American Society for Nutrition. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. **Advances in Nutrition**, v. 5, p. 404-417, 2014.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.G.; LIGHTFOOT, D.A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, v. 6, p. 1-26, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Leukemia-Chronic Myeloid (Myelogenous) Overview, p. 1-28, 2013.

ANDRÉ-LÉVIGNE, D.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M.S.; PITTET-CUÉNOD, B. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. **International Journal Molecular Science**, v. 18, p. 1-28, 2017.

ANDRISIC, L.; DUDZIK, D.; BARBAS, C.; MILKOVIC L.; GRUNE, T.; ZARKOVIC, N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. **Redox Biology**, v. 10, p. 47-58. 2017.

ANTUNES, K.A.; BALDIVIA, D.S.; ROCHA, P.S.; CASAGRANDE, J.C.; ARGANDOÑA, E.J.S.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, A.A.L.; E.J.; SANTOS, E.L.; DE PICOLI SOUZA, K. Antiobesity Effects of Hydroethanolic Extract of *Jacaranda decurrens* Leaves. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

ARON, P.M.; KENNEDY, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 79-104, 2008.

ASMAA, M.J.S.; AL-JAMAL, H.A.N.; ANG, C.Y.; ASAN, J.M.; SEENI, A.; JOHAN, M.F. Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 475-481, 2014.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. V. 78, p. 431-441, 2005.

BAKER, D.D.; CHU, M.C.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Report**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.

BARBIERI, R.L.; GOMES, J.C.C.; ALERCIA, A.; PADULOSI, S. Agricultural biodiversity in Southern Brazil: integrating efforts for conservation and use of neglected and underutilized species. **Sustainability**, v. 6, p. 741-757, 2014.

GOMES, L.C.; FERRÃO, A.L.M.; EVANGELISTA, F.C.G.; ALMEIDA, T.D.; BARBOSA, R.C.; CARVALHO, M.G.; SABINO, A.P. Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, 349–358, 2018.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.

BIESALKI, H.K.; GRIMM, P. Nutrição – Texto e Atlas. **Editora Artmed**, p. 1- 400, 2007.

BRAZIL, Ministry of the Environment. Secretariat of Biodiversity and Forests - SBF. Fifth National Report to the Convention on Biological Diversity: Brazil. **Brasília: Ministry of the Environment**, p. 1-231, 2015.

BRETNALL, M.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; GUEVARA, R.L.; CEPERO, E.; BOISE, L.H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**, v. 14, p. 1-9. 2013.

CARDOSO, C.A.L.; SALMAZZO, G.R.; HONDA, N.K.; PRATES, C.B.; VIEIRA, M.C.; COELHO, R.G. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 1273-1276, 2010.

CARNEIRO, N.S.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; EGEEA, M.B.; MARTINS, C.H.G.; SILVA, T.S.; BRETANHA, L.C.; BALLESTE, M.P.; MICKE, G.A.; SILVEIRA, E.V.; MIRANDA, M.L.D. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 1907-1915, 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1236- 1258, 2013.

CASAGRANDE, J.C.; MACORINI, L.F.B.; ANTUNES, K.A.; SANTOS, U.P.; CAMPOS, J.F.; DIAS-JÚNIOR, N.M.; SANGALLI, A.; CARDOSO, A.A.L.; VIEIRA, M.C.; RABELO, L.A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; SANTOS, E.L.; DE PICOLI SOUZA, K. Antioxidant and Cytotoxic Activity of Hydroethanolic Extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-8, 2014.

CHANG, G.; XIAO, W.; XU, Z.; YU, D.; LI, B.; ZHANG, Y.; SUN, X.; XIE, Y.; CHANG, S.; GAO, L.; CHEN, G.; HU, L.; XIE, B.; DAI, B.; ZHU, W.; SHI, J. Pterostilbene Induces Cell Apoptosis and Cell Cycle Arrest in T-Cell Leukemia/Lymphoma by Suppressing the ERK1/2 Pathway. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

CHEN, D.; DANIEL, K.G.; CHEN, M.S.; KUHN, D.J.; LANDIS-PIWOWAR, K.R.; DOU, K.P. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1421-1432, 2005.

CHEN, D.; YU, J.; ZHANG, L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, p. 228-236, 2016.

CHO, J.; LEE, J.; YANG, Y.; KIM, J.; AHN, J.; BAEK, N.; LWW, K.T.; CHOI, J.H. Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells. **Food Chemical and Toxicology**, v. 49, p. 1737-1744, 2011.

CHO, Y.S.; PARK, H.L. Exploitation of necroptosis for treatment of caspase-compromised cancers (Review). **Oncology Letters**, v. 14, p. 1207-1214, 2017.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v. 1, pp. 103. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-damage-repair-mechanisms-for-maintaining-dna-344>>. Acesso em: 20 fev. 2017

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **The Biochemical Journal**, v. 326, p. 1-16, 1997.

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

COUTINHO, I.D.; COELHO, R.G.; KATAOKA, V.M.F.; HONDA, N.K.; SILVA, J.R.M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L. Determination of phenolic compounds and evaluation of

antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, v. 33, p. 53-60. 2008.

COUTINHO, I.D.; CARDOSO, C.A.L.; RÉ-POPPI, N.; MELO, A.M.; VIEIRA, M.C.; HONDA, N.K.; COELHO, R.G. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 767-776, 2009.

CORTES, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leucemia. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 18, p. 569- 584, 2004.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Medicinals for the millennia: the historical record. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 953, p. 3-25, 2001.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, p. 601-623, 2006.

DISCOVER LIFE. Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Senna+Velutina>. Acesso em: 25 out. 2017.

DÖHNER, N.H.; ESTEY, E.H.; AMADORI, S.; APPELBAUM, F.R.; BÜCHNER, T.; BURNETT, A.K.; DOMBRET, H.; FENAUX, P.; GRIMWADE, D.; LARSON, R.A.; LO-COCO, F.; NAOE, T.; NIEDERWIESER, D.; OSSENKOPPELE, G.J.; SANZ, M.A.; SIERRA, J.; TALLMAN, M.S.; LÖWENBERG, B.; BLOOMFIELD, C.D. Diagnosis and management

of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia. **Blood**, v. 115, p. 453-474, 2010.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D.J.; BLOOMFIELD, C.D. Acute Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1136-1152, 2015.

DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J.; MATIAS-GUIU, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Archiv**, v. 446, p. 475-482, 2005.

DORN, G.W. Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. **Toxicologic Pathology**, v. 41, p. 227-234, 2013.

ESPINDOLA, P.T.; ROCHA, P.S.; CAROLLO, C.A.; SCHIMITZ, W.O.; PEREIRA, Z.V.; VIEIRA, M.C.; SANTOS, E.L.; DE PICOLI SOUZA. Antioxidant and anti-hyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-8. 2016.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M. The biology of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 164-172, 1999.

FAN, F.; SANG, L.; JIANG, M. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. **Molecules**, v. 22, p. 1-39, 2017.

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FARIED, A.; KURNIA, D.; FARIED, L.S.; USMAN, N.; MIYAZAKI, T.; KATO, H.; KUWANO, H. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 30, p. 605-613, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, L.C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C.A.; MICHEL, M.C.P.; GUIMARÃES, R.G.; REZENDE, S.A.; FILHO, J.D.S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, p. 100-108, 2013.

FLORA, S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 191- 206, 2009.

FRANKE, A.A.; LAI, J.F.; HALM, B.M. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 1-15, 2014.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. **The American Journal of Medicine**, v. 97, p. 5- 13, 1994.

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

GORJI, S.G.; SMYTH, H.E.; SHARMA, M.; FITZGERALD, M. Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 88-102, 2016.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose - Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.

HAGIWARA, Y.; KASUKABE, T.; KANEKO, Y.; NIITSU, N.; OKABE-KADO, J. Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced

differentiation of human leukemia HL-60 cells. **International Journal of Hematology**, v. 92, p. 136-143, 2010.

HAMILTON, E.; INFANTE, J. R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 45, p. 129-138, 2016.

HANSON, B. Necroptosis: A new way of dying? **Cancer Biology & Therapy**, v. 17, p. 899-910, 2016.

HEWLINGS, S.J.; KALMAN, D.S. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, p. 1-11, 2017.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 25 out. 2017.

IDEHEN, E.; TANG, Y.; SANG, S. Bioactive phytochemicals in barley. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 148-161, 2017.

IMRAN, M.; AHMAD, N.; ANJUM, F.M.; KHAN, M.K.; MUSHTAQ, Z.; NADEEM, M.; HUSSAIN, S. Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 1-7, 2015.

ISAH, T. Anticancer alkaloids from trees: development into drugs. **Pharmacognosy Review**, v. 10, 90-99, 2016.

KARRAN, P.; BREM, R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. **DNA Repair**, v. 44, p. 178-185, 2016.

KHAN, N.A.; SRIVASTAVA, A. Antifungal activity of bioactive triterpenoid saponin from the seeds of *Cassia angustifolia*. **Natural Product Research**, v. 23, p. 1128-1133, 2009.

KHOO, HE; AZLAN, A; TANG, S.T.; LIM, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v. 61, p. 1-21, 2017.

KIM, J.; HE, L.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 463-470, 2003.

KINGHORN, A. D. Review of anticancer agents from natural products. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2315-2315, 2015.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, p. 3- 11, 2009.

KUREK-GORECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GORECKI, M.; STOJKO, J.; SOSADA, M.; SWIERCZEK-ZIEBA, G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, p. 78-101, 2014.

LEE, Y.; YOON, Y.; YOON, H.; PARK, H.; SONG, K.; YEUM, K. Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. **Nutrients**, v. 9, p. 1-15, 2017.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, p. 118-126, 2010.

LOVERDE-OLIVEIRA, S.M.; FREITAS, M.N.; ARAÚJO, P.K.B.; Costa, I.B.C. Fragmento de Cerrado urbano da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Mato Grosso. **Revista Biodiversidade**, v. 9, p. 74-90, 2010.

MA, Z.F.; ZHANG, H. Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. **Antioxidants**, v. 6, p. 71, 2017.

MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A.; DAVUDIAN, S.; SHIRJANG, S.; BARADARAN, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, p. 339-348, 2017.

MARAZZI, B.; FORTUNATO, R.H.; ENDRESS, P.K.; SPICHIGER, R. *Senna* (Cassiinae, Leguminosae) in Paraguay: synopsis, occurrence, ecological role and ethnobotany. **Candollea**, v. 61, p. 315-329, 2006.

MARTIN-VENTURA, J.L.; RODRIGUES-DIEZ, R.; MARTINEZ-LOPEZ, D.; SALAICES, M.; BLANCO-COLIO, L.M.; BRIONES, A.M. Oxidative Stress in Human Atherothrombosis: Sources, Markers and Therapeutic Targets. **International Journal Molecular Science**, v. 18, p.1-21, 2017.

MAK, Y.W.; CHUAH, L.O.; AHMAD, R.; BHAT, R. Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and Cassia (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts. **Journal of King Saud University – Science**, v. 25, p. 275-282, 2013.

MIYATA, Y.; MATSUO, T.; SAGARA, Y.; OHBA, K.; OHYAMA, K.; SAKAI, H. A Mini-Review of Reactive Oxygen Species in Urological Cancer: Correlation with NADPH Oxidases, Angiogenesis, and Apoptosis. **International Journal Molecular Science**, v. 18, p. 1-21, 2017.

MOJZER, E.B.; HRNCIC, M.K.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Z.; BREN, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules**, v. 21, p. 1-38, 2016.

MORTEZAEE, K.; KHANLARKHANI, N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: a review. **Journal of Cellular Physiology**, 10.1002/jcp.26209, 2017.

NAGLE, A.; HUR, W.; GRAY, N.S. Antimitotic agents of natural origin. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 305-326, 2006.

NAVARRO, M.; MOREIRA, I.; ARNAEZ, E.; QUESADA, S.; AZOFEIFA, G.; ALVARADO, D.; MONAGAS, M.J. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. **Plants**, v.6, p. 1-13, 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; BADER, Y.; SAIKO, P.; HANDLER, N.; ERKER, T.; SZEKERES, T. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. **Oncology Reports**, v. 16, p. 617-624, 2006.

PASCOAL, A.C.R.F.; EHRENFRIED, C.A.; EBERLIN, M.N.; STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J. Free Radical Scavenging Activity, Determination of Phenolic Compounds and HPLC-DAD/ESI-MS Profile of *Campomanesia adamantium* Leaves. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 969-972, 2011.

PASCOAL, A.C.R.F.; EHRENFRIED, C.A.; LOPEZ, B.G.; ARAUJO, T.M.; PASCOAL, V.D.B.; GILIOLI, R.; ANHÊ, G.F.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**, v. 19, p. 1843-1855, 2014.

PATEL, V.A.; LONGACRE, A.; HSIAO, K.; FAN, H.; MENG, F.; MITCHELL, J.E.; RAUCH, J.; UCKER, D.S.; LEVINE, J.S. Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those

triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 4663-4670, 2006.

PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; COELHO, R.G.; COUTINHO, I.D.; HONDA, N.K.; CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; LEITE, S.R.A.; SATO, D.N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v, 32, p. 1222-1226, 2009.

PEREIRA, R.M.; FERREIRA-SILVA, G.A.; PIVATTO, M.; SANTOS, L.A.; BOLZANI, V.S.; PAULA, D.A.C.; OLIVEIRA, J.C.; VIEGAS JR, C.; IONTA, M. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 86-92, 2016.

PINTO, A.C. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PORTH, C.M.; MATFIN, G. Fisiopatologia. **Editora Guanabara Koogan**, v. 1, p. 1-911, 2010.

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

PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, v. 283, p. 1-16, 2003.

PUI, C.; ROBISON, L.L.; LOOK, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Seminar**, v. 371, p. 1030-1043, 2008.

ROBBINS.; COTRAN. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. **Elsevier**, v. 8, p. 1-1458, 2010.

SAIKI, P.T.O.; SILVA, B.; LOMÔNACO, C. Expressão de caracteres reprodutivos e vegetativos de *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) em dois ambientes distintos de Cerrado. **Revista Brasil**, v. 31, p. 363-369, 2008.

SAKULNARMRAT, K.; FENECH, M.; THOMAS, P.; KONCZAK, I. Cytoprotective and proapoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 136, p. 9-17, 2013.

SANTOS, U.P.; CAMPOS, J.F.; TORQUATO, H.F.V.; PAREDES-GAMERO, E.J.; CAROLLO, C.A.; ESTEVINHO, L.M.; DE PICOLI SOUZA, K.; SANTOS, E.L. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract from *Hancornia speciosa* Gomes. **PLoS One**, v. 11, p. 1-11, 2016.

SCALON, S.P.Q.; OSHIRO, A.M.; MASETTO, T.E.; DRESCH, D.M. Conservation of *Campomanesia adamantium* (CAMB.) O. Berg seeds in different packaging and at varied temperatures. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 262-269, 2013

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 11- 30, 2013.

SILVA, M.T. Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. **FEBS Letters**, v. 584, p. 4491-4499, 2010.

SOARES, S.E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOBEH, M.; MAHMOUD, M.F.; HASAN, R.A.; CHENG, H., EL-SHAZLY, A.M., WINK, M. *Senna singueana*: Antioxidant, Hepatoprotective, Antiapoptotic Properties and Phytochemical Profiling of a Methanol Bark Extract. **Molecules**, v. 22, p. 1-15, 2017.

SOUZA, V.C.; BORTOLUZZI, R.L.C. *Senna* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015 Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83725>>. Acesso em: 5 out. 2017

SOUZA, J.C.; PICCINELLI, A.C.; AQUINO, D.F.S.; SOUZA, V.V.; SCHMITZ, W.O.; TRAESEL, G. K.; CARDOSO, C.A.L.; KASSUYA, C.A.L.; ARENA, A.C. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, p. 23-31, 2017.

SRDIC-RAJIC, T.; TISMA-MILETIC, N.; CAVIC, M.; KANJER, K.; SAVIKIN, K.; GALUN, D.; KONIC-RISTIC, A.; ZORANOVIC, T. Sensitization of K562 leukemia cells to doxorubicin by the *Viscum album* extract. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 485- 495, 2016.

STARÝ, J.; HRUŠÁK, O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **F1000 Research**, v. 5, p. 1-9. 2016.

SUHAILI, S.H.; KARIMIAN, H.; STELLATO, M.; LEE, T.; AGUILAR, M. Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. **Biophys Reviews**, v. 9, p. 443–457, 2017.

SULTAN, S. Reviewing the protective role of antioxidants in oxidative stress caused by free radicals. **Asian Pacific Journal of Health Science**, v. 1, p 401-406, 2014.

SUSUNAGA-NOTARIO, A.C.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, S.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M.A.; ALMANZA-PÉREZ, J.C.; GUTIÉRREZ-CARRILLO, A.; ARRIETA-BÁEZ, D.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.L.; ROMÁN-RAMOS, R.; FLORES-SÁENZ, J.L.E.; ALARCÓN-AGUILAR, F.J. Bioassay-guided chemical study of the anti-inflammatory effect of *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-induced ear edema. **Molecules**, v. 19, p. 10261-10278, 2014.

TESTAI, L.; CALDERONE, V. Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. **Nutrients**, v. 9, p. 1-13, 2017.

THILAGAM, E.; PARIMALADEVI, B.; KUMARAPPAN, C.; MANDAL, S.C. α -Glucosidase and α -Amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, p. 24-30, 2013.

TIWARI, R.; RANA, C.S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, p. 661-670, 2015.

TORQUATO, H. F. V.; RIBEIRO-FILHO, A. C.; BURI, M. V.; JÚNIOR, R. T. A.; PIMENTA, R.; OLIVEIRA, J. S. R.; FILHO, V.C.; MACHO, A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; MARTINS, D.T.O. Canthin-6-one induces cell death, cell cycle arrest and differentiation in human myeloid leukemia cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 958-967, 2017.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1660, p. 171-199, 2004.

UMENO, A.; HORIE, M.; MUROTOMI, K.; NAKAJIMA, Y.; YOSHIDA, Y. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. **Molecules**, v. 21, p. 1-15, 2016.

VALLILO, M.I.; LAMARDO, L.C.A.; GABERLOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P.R.H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, p. 805-810, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323- 1338, 2007.

VIEIRA, M.C.; PEREZ, V.B.; HEREDIA, Z.N.A.; SANTOS, M.C.; PELLOSO, I.A.O.; PESSOA, S.M. Effect of nitrogen and phosphorus supply on initial development of guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivated in pots. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 542-549, 2011.

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; MIRANDA, A.L.P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, p. 1279-1286, 2006.

VISCARDI, D.Z.; OLIVEIRA, V.S.; ARRIGO, J.S.; PICCINELLI, A.C.; CARDOSO, C.A.L.; MALDONADE, I.R.; KASSUYA, C.A.L.; SANJINEZ-ARGANDONA, E.J. Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 220–227, 2017.

VÉLEZ-CRUZ, R.; JOHNSON, D.G. The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts. **International Journal Molecular Science**, v. 18, p. 1-16. 2017.

ZHANG, T.; CHEN, H.; WANG, L.; BAI, M.; WANG, Y.; JIANG, X.; LIU, M. Ellagic acid exerts anti-proliferation effects via modulation of TGF-B/Smad3 signaling in MCF-7 breast cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 273-276, 2014.

ZHANG, C.; ZHANG, J.; LI, X.; SUN, N.; YU, R.; ZHAO, B.; YU, D.; CHENG, Y.; LIU, Y. Huaier aqueous extract induces hepatocellular carcinoma cells arrest in S phase via JNK signaling pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

Zhou, Y.; Zheng, J.; Li, Y.; Xu, D.; Li, S.; Chen, Y.; Li, H. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. **Nutrients**, v. 8, p. 1-35, 2016.

ZHU, D.; XUE, W.; TAO, W.; LI, J. Biological effects of ray cartilage extract on human breast cancer cell line MCF-7 and its mechanism. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 7425-7429, 2015.

ZOFKOVA, I.; BLAHOS, J. New Molecules Modulating Bone Metabolism – New Perspectives in the Treatment of Osteoporosis. **Physiological Research**, v. 66, p. S341-S347, 2017.

YAN, H.; HU, W.; ZHANG, J.; WANG, Y.; XIA, K.; PENG, M.; LIU, J. Resveratrol induces human K562 cell apoptosis, erythroid differentiation, and autophagy. **Tumor Biology**, v. 35, p. 5381- 5388, 2014.

WANG, K.; ZHU, X.; ZHANG, K.; ZHU, L.; ZHOU, F. Investigation of Gallic Acid Induced Anticancer Effect in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 00, p. 1-7, 2014.

WEN, M.; ZHOU, B.; CHEN, Y.H., MA, Z.L.; GOU, Y.; ZHANG, C.L.; YU, W.F.; JIAO, L. Serum uric acid levels in patients with Parkinson's disease: A meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, p. 1-13, 2017.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo I: The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects

Publicado no periódico “Oxidative Medicine and Cellular Longevity” (Fator de impacto: 4.593, Qualis A1 para Medicina II). Data de publicação: 14/09/2016.

Link com as normas da revista: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/guidelines/>

Research Article

The Chemical Profile of *Senna velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects

Jaqueline Ferreira Campos,¹ David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro,¹ Marcio José Damião,¹ Heron F. Vieira Torquato,² Edgar J. Paredes-Gamero,^{2,3} Carlos Alexandre Carollo,⁴ Leticia M. Estevinho,⁵ Kely de Picoli Souza,¹ and Edson Lucas dos Santos¹

¹School of Environmental and Biological Science, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil

²Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, Rua Pedro de Toledo 669, 04039-032 São Paulo, SP, Brazil

³Interdisciplinary Center of Biochemistry Investigation, University of Mogi das Cruzes, Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, No. 200, Mogi das Cruzes, SP, Brazil

⁴Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

⁵Department of Biology and Biotechnology, Agricultural College of Bragança, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Santa Apolónia, 5301-855 Bragança, Portugal

Correspondence should be addressed to Edson Lucas dos Santos; edson.lucas@pq.cnpq.br

Received 4 June 2016; Accepted 14 September 2016

Academic Editor: Jerzy Kruk

Copyright © 2016 Jaqueline Ferreira Campos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Natural products can be a source of biomolecules with antioxidant activity which are able to prevent oxidative stress-induced diseases and show antitumor activity, making them important sources of new anticancer drug prototypes. In this context, this study aimed to analyze the chemical composition of an ethanol extract of *Senna velutina* leaves and to assess its antioxidant and cytotoxic activities in leukemic cells. The antioxidant properties were evaluated using a DPPH free radical scavenging assay and by examining the extract's inhibition of AAPH-induced lipid peroxidation in human erythrocytes. Its cytotoxicity and possible mechanisms of action were assessed in Jurkat and K562 leukemic cell lines. The ethanol extract contained flavonoids, such as epigallocatechin, epicatechin, kaempferol heteroside, rutin, and dimeric and trimeric proanthocyanidin derivatives. The extract exhibited antioxidant activity by scavenging free radicals and antihemolytic action, and it decreased malondialdehyde content in human erythrocytes. Furthermore, the extract also induced leukemic cell death by activating intracellular calcium and caspase-3, decreasing mitochondrial membrane potential, and arresting the cell cycle in S and G2 phases. Hence, *S. velutina* leaf extract contains antioxidant and antileukemic biomolecules with potential applications in diseases associated with oxidative stress and in the inhibition of tumor cell proliferation.

1. Introduction

Several diseases, including cancer, diabetes, atherosclerosis, inflammatory diseases, and premature aging, are related to oxidative stress [1]. Oxidative stress stems from excess of free radicals in the body and low antioxidant activity, resulting in damage to essential biomolecules such as nucleic acids, proteins, and lipids [2].

Cancer is an oxidative stress-related disease that causes high rates of morbidity and mortality in the global population [3]. Leukemias are cancers that affect the cells of the hematopoietic system; depending on their cellular origin and maturity stage, leukemias can be classified as either myeloid or lymphoid and as acute or chronic [4]. Surgery, radiotherapy, and chemotherapy [5] are among the main types of treatment for these cancers.

Biomolecules with anticancer activity at low therapeutic doses and with reduced side effects have been increasingly sought in recent decades [6]. Between 1940 and 2014, 49% of the 174 anticancer drugs that were made available on the market were either natural products or their derivatives [7]. Thus, there is a trend among the general population and the medical community to regard medicinal plants as alternative sources of antitumor drugs, provided that the therapeutic properties of such plants have been scientifically researched and proven [8]. The discoveries of paclitaxel [9], an anticancer drug, and of homoharringtonine [10], which is used in the treatment of acute and chronic myeloid leukemia, are examples of successful cases in the development of medicinal plant-derived drugs.

The search for new molecules with therapeutic properties, including antioxidant and anticarcinogenic activities, is facilitated by the vast biodiversity and bioprospecting potential in Brazil. *Senna* genus has been used in Brazilian folk medicine for its antioxidant, antimicrobial [11], anti-inflammatory [12], antidiabetic [13], and antitumor [14] activities, among other uses.

Taxonomically, some species have been transferred from *Cassia* genus to *Senna* genus [15]. This taxon currently comprises 500–600 species [14, 16], of which many have not been yet characterized with respect to their chemical compositions and biological properties as the arboreal species *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Fabaceae, Caesalpinioideae). In this context, the aim of the present study was to determine the chemical composition of an ethanol extract of *S. velutina* leaves and to evaluate its antioxidant and antileukemic activities.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Extract Preparation. *S. velutina* leaves were collected following the identification of the plant and authorization of the SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, permit number 54470-1) in Dourados, Mato Grosso do Sul (S 22°05'545" and W 055°20'746"), Brazil, oven-dried with the air circulation at a temperature of 45±5°C, and then ground in a Willy-type knife mill. An exsiccated sample was deposited in the Herbarium of the Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil, with registration number 4665.

The extract was then prepared by macerating the plant material in an ethanol 95% mixture at room temperature in the dark for 7 days. Then, the extract was filtered, and the residue was further extracted twice using the same process. After 21 days, the filtrate was concentrated in a rotary vacuum evaporator (Gehaka, São Paulo, SP, Brazil) to obtain the ethanol extract of *S. velutina* leaves (ESV). The dry extract yield was 29%, calculated using the following formula: extraction yield (%) = (weight of the freeze-dried extract × 100)/ (weight of the original sample). The ESV was stored at –20°C protected from light.

2.2. Chemical Analysis. The extract was analyzed by Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) (Shimadzu) coupled to Diode Array Detector (DAD) (240–800 nm, Shimadzu)

and electrospray ionization time-of-flight (ESI-QTOF-microTOF QII) (operating in positive and negative mode, 120–1200 Da, Bruker Daltonics). A C-18 column was used (Kinetex, 2.6 μm, 150 × 2.2 mm, Phenomenex) protected by a guard column of the same material. The mobile phase was as follows: water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) both with 0.1% of formic acid in a gradient of 0–2 min 3% B, 2–25 min 3–25% B, and 25–40 min 25–80% B followed by washing and reconditioning of the column (8 minutes). The flow rate was 0.3 mL/min and 1 μL (1 mg/mL) of extract was injected. The other microTOF-QII parameters were as follows: temperature, 200°C; N₂ drying gas flow rate, 9 L/min; Nebulizer, 4.0 bar; capillary voltage, –3500 V (negative) and +4500 V (positive); and internal calibration with TFA-NA injected at the end of the chromatographic analysis. The rutin and epicatechin standards were obtained from Sigma-Aldrich with a purity of ≥95%.

2.3. Antioxidant Activity

2.3.1. DPPH Free Radical Scavenging Activity. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of ESV was evaluated as described in D. Gupta and R. K. Gupta [17], with modifications. In this assay, 0.2 mL of ESV at different concentrations (1–1000 μg/mL) was added to 1.8 mL of DPPH solution (0.11 mM) in 80% ethanol. The mixture was incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Absorbance at 517 nm was then measured spectrophotometrically. Ascorbic acid and butylhydroxytoluene (BHT) were used as reference antioxidants. As a control, 0.2 mL of solvent used to dilute the extract was added to 1.8 mL of DPPH solution (0.11 mM) in 80% ethanol. Two independent experiments were performed in triplicate. The percentage inhibition was calculated relative to the control using the following equation:

$$\text{inhibition of DPPH radical (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100. \quad (1)$$

2.3.2. Inhibition of Lipid Peroxidation in Human Erythrocytes

(1) Preparation of Erythrocyte Suspension. After approval by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa, CEP) of the University Center of Grande Dourados (UNIGRAN, Brazil (CEP process number: 123/12)), peripheral blood from healthy donors was collected into tubes containing sodium citrate which were then centrifuged at 400 ×g for 10 min. The plasma and leukocyte layer were discarded, and the erythrocytes were washed 3 times with 0.9% sodium chloride solution (NaCl) and centrifuged. Finally, 10% erythrocyte suspension was prepared in 0.9% NaCl solution to attain a 2.5% final concentration for further analysis.

(2) Hemolytic Activity and Inhibition of Oxidative Hemolysis. The ability of ESV to protect against lipid peroxidation was

evaluated using an antihemolytic assay in human erythrocytes that were incubated with the oxidant 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), a thermoinducible initiator of lipid peroxidation, as described by Campos et al. [18]. To evaluate hemolytic activity and inhibition of oxidative hemolysis, erythrocytes were preincubated with either ESV or ascorbic acid (25–125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C for 30 min before the addition of 0.5 mL of either 0.9% NaCl or 50 mM AAPH (dissolved in 0.9% NaCl). In the assay, 1% ethanol was used as a solvent control, while 0.9% NaCl was used as the baseline hemolysis control. Total hemolysis was induced by incubating erythrocytes with distilled water. Samples were incubated at 37°C with regular stirring. The extent of hemolysis was determined at 60-minute intervals for an incubation period of 5 h. Tubes were centrifuged at 700 $\times g$ for 5 minutes; 0.2 mL of the supernatant was collected and added to 1.8 mL of 0.9% NaCl for spectrophotometric reading at 540 nm. The hemolysis percentage was calculated using the formula $A/B \times 100$, where A is the sample absorbance and B is the absorbance of the total hemolysis sample. Three independent experiments were performed in triplicate.

(3) *Malondialdehyde (MDA) Measurements.* The inhibition of malondialdehyde (MDA) production, which is a byproduct of lipid peroxidation, was evaluated according to the method described by Campos et al. [18]. Erythrocytes were preincubated at 37°C for 30 min with either ESV or ascorbic acid (25–125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) before the addition of 0.5 mL of 50 mM AAPH solution. The mixtures were incubated at 37°C with regular stirring; 1% ethanol was used as a negative control. The MDA concentration was determined at 60-minute intervals for a total of 5 h. To determine the MDA concentration, samples were centrifuged at 700 $\times g$ for 5 min; 0.5 mL of each supernatant was collected and transferred to a tube containing 1 mL of 10 nM thiobarbituric acid (TBA), dissolved in 75 mM monobasic potassium phosphate buffer at pH 2.5. The standard controls used were 500 μL of a 20 mM MDA solution and 1 mL of TBA. Samples were incubated at 96°C for 45 min and allowed to cool before adding 4 mL of *n*-butyl alcohol and centrifuging at 1600 $\times g$ for 5 min. The resulting supernatant was read at 532 nm in a spectrophotometer. Two independent experiments were performed in triplicate. Sample MDA levels were expressed in nM/mL, according to the following formula:

$$\text{MDA} = \text{Abs}_{\text{sample}} \times \left(\frac{20 \times 220.32}{\text{Abs}_{\text{standard}}} \right). \quad (2)$$

2.4. Cytotoxic Activity

2.4.1. Cell Culture. Leukemia human cell lines Jurkat and K562 were cultivated in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Germany) culture medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, Germany), and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Sigma-Aldrich, Germany). Cells were cultured in a humidified incubator containing 5% CO_2 at 37°C.

2.4.2. Cytotoxicity and Cell Death Profile. Cytotoxic activity and the cell death profile were evaluated according to the

method described by Paredes-Gamero et al. [19]. Leukemic cells were seeded at 10^5 cells/mL in 96-well microplates and treated with ESV (0–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Then, the cells were centrifuged 600 $\times g$ for 6 min and resuspended in binding buffer (0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , 0.01 M HEPES, and pH 7.4) and incubated at room temperature with 1 μL of Annexin V-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI) Becton Dickinson, USA for 20 min. Sample analysis was performed using Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA), with acquisition of 3,000 events.

2.4.3. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential. To evaluate the possible effects of ESV on mitochondrial membrane potential, leukemic cells were incubated with the fluorescent marker JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the method described by Moraes et al. [20]. JC-1 probe accumulates in mitochondria in a potential-dependent manner. Viable cells with high mitochondrial membrane potential are stained red. Upon reduction of the mitochondrial membrane potential, cells appear green. In this assay, cells were seeded into 24-well plates (10^5 cells/mL) containing supplemented media and were then incubated with 27.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jurkat cells) or 67.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (K562 cells) ESV for 24 h. The cells were then centrifuged and incubated with JC-1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 min at room temperature. Fluorescence readings were performed in a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). A total of 10,000 events were collected per sample.

2.4.4. Caspase-3 Activity. Caspase-3 activity was assessed according to the method described by Moraes et al. [20], with minor modifications. Caspase activity was measured by flow cytometer. Leukemic lineages were treated with ESV (27.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 24-well microplates (10^5 cells/mL) for 24 h. Then the cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min and permeabilized with 0.01% saponin for 15 min at room temperature. Next, the cells were incubated for 1 h at 37°C with anti-cleaved-caspase 3-FITC antibody (Becton Dickinson, USA). After incubation for 40 min, the fluorescence was analyzed by Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA). A total of 10,000 events were acquired.

2.4.5. Intracellular Calcium and Pan-Caspase Inhibitors. The roles of intracellular calcium and caspases in ESV-promoted cytotoxicity were evaluated according to Bechara et al. [21], with minor modifications. Jurkat cells were pretreated for 1 h at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere with either the intracellular calcium chelator BAPTA-AM or the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK; ESV (27.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was then added to the cells and allowed to incubate for 24 h. Control and treated cells were resuspended in culture medium containing 0.05% trypan blue and were counted in a hemocytometer chamber to determine cell viability (trypan blue exclusion assay).

2.4.6. Cell Cycle Phases. Distribution of cell cycle was determined by PI staining and flow cytometry analysis. Leukemic

lineages (10^5 cells/mL) were treated with ESV (27.6 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and then were fixed and permeabilized as previously described and treated with 4 mg/mL RNase (Sigma-Aldrich, Germany) for 45 min at 37°C. For DNA labeling, cells were incubated with 5 $\mu\text{g/mL}$ of PI (Sigma Aldrich, Germany). Percentages of cells within cell cycle compartments (G1, S, and G2/M) were determined by Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA). A total of 10,000 events were acquired.

2.5. Statistical Analyses. The data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed for statistical significant differences between the groups using Student's *t*-test for comparison between two groups and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for comparison of more than two groups using Prism 5 GraphPad Software. The results were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical Composition of ESV. The metabolites in ESV were identified by interpreting the UV absorption and mass spectra and comparing them with data in the literature. When available, compounds were compared with authentic standards for confirmation.

The identification of compound 2, with m/z 305.0660 $[\text{M-H}]^-$, was based on the fragmentation pattern of epigallocatechin proposed by Dou et al. [22], namely, m/z 261 $[\text{M-CO}_2]^-$, m/z 219 $[\text{M-C}_4\text{H}_6\text{O}_2]^-$, m/z 179 $[\text{M-C}_6\text{H}_6\text{O}_3]^-$, m/z 167 $[\text{M-C}_7\text{H}_6\text{O}_3]^-$, and m/z 165 $[\text{M-C}_7\text{H}_8\text{O}_3]^-$, and also on the detection of UV absorption at 270 nm.

Compounds 4, 8, and 9 showed UV absorption patterns that were characteristic of flavonols (270 and 340 nm). Their fragmentation patterns were consistent with those of heteroside derivatives of kaempferol, whose main fragment consists of m/z 285 $[\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6]^-$. Several compounds of this class have been described in *Senna* genus [23, 24].

Dimeric (compounds 6, 7, and 10–14) and trimeric (compounds 15–22) proanthocyanidins, comprising cassiaflavan, afzelechin, epicatechin, epigallocatechin, and naringenin subunits, were also observed. These derivatives, although rare in nature, are often reported in *Senna* genus; some authors consider them to be chemical markers for the genus [25–27]. The UV absorption maxima at 280 nm and the increase in reverse-phase retention time concomitant with decreased hydroxyl group content or increased degree of polymerization are in agreement with the study by Callemien and Collin [28]. Fragmentation patterns obtained by retro-Diels-Alder (RDA) fission, heterocyclic ring fission (HRF), and quinone methide (QM) can be used to characterize the subunits that make up proanthocyanidins [29]. A complete discussion on the elucidation of this class of compounds may be found in the literature [29, 30]. Thus, based on retention times, fragmentation profiles, and comparisons with previously published data, 22 compounds in ESV were characterized (Figure 1 and Table 1).

3.2. DPPH Free Radical Scavenging Activity. ESV was able to scavenge the DPPH free radical, with a 2.5-fold higher IC_{50}

and maximum activity values relative to ascorbic acid; however, these values were lower than those obtained with BHT (Table 2).

3.3. Hemolytic Activity and Inhibition of Oxidative Hemolysis. Over the range of tested concentrations, ESV showed no hemolytic activity in human erythrocytes, as no hemolysis was observed after up to 5 h of incubation (Figure 2(a)).

The control antioxidant, ascorbic acid, was able to protect erythrocytes from hemolysis for up to 4 h of incubation when they were exposed to the oxidant AAPH (data not shown). ESV was able to protect erythrocytes for 5 h over the tested 50–125 $\mu\text{g/mL}$ concentration range (Figure 2(b)), demonstrating its powerful antihemolytic activity.

3.4. MDA Measurements. The degree of protection conferred by ESV against AAPH-induced lipid peroxidation in human erythrocytes was evaluated by measuring MDA levels. At ESV concentrations of 100 and 125 $\mu\text{g/mL}$, the MDA levels were decreased throughout the course of the assay (data not shown) and after 5 h of incubation (Figure 2(c)).

3.5. Cytotoxic Activity and Cell Death Profile. ESV promoted cell death in both tested cell lines. IC_{50} values indicated that ESV was more effective in Jurkat cells than in the erythroleukemic cell line K562 ($\text{IC}_{50} = 27.6 \mu\text{g/mL}$ and 67.5 $\mu\text{g/mL}$, resp.) (Figures 3(a) and 3(b)). ESV treatment promoted double staining in both cell lines. This type of death was evident in $71.9 \pm 5.7\%$ of Jurkat cells and $30.1 \pm 2.8\%$ of K562 cells after treatment with 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$ of extract, respectively (Figures 4(a) and 4(b)).

3.6. Mitochondrial Membrane Potential. The mitochondrial membrane potentials of Jurkat and K562 leukemic cells decreased after 24 h of incubation with ESV, as evidenced by a decrease in red fluorescence and an increase in green fluorescence compared to untreated cells. The mitochondrial membrane potential was reduced by $91.0 \pm 4.3\%$ in Jurkat cells and by $74.7 \pm 7.3\%$ in K562 cells after treatment with 27.6 and 67.5 $\mu\text{g/mL}$ of extract, respectively (Figures 5(a) and 5(b)).

3.7. Caspase-3 Activity. The Jurkat cell line, which was more sensitive to ESV activity, was used to investigate ESV-promoted cell death mechanisms. The fluorescence histogram (Figure 6(a)) showed a rightward shift (greater fluorescence values), indicating the activation of the apoptosis-inducing enzyme caspase-3. Cleaved caspase-3 levels increased 4.5-fold in ESV-treated cells relative to untreated cells (Figure 6(b)).

3.8. Pan-Caspase Inhibition and Intracellular Calcium Chelation. Jurkat cells were preincubated with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK to assess whether ESV cytotoxicity was mainly mediated by caspase activation. Z-VAD-FMK pretreatment did not decrease ESV-induced cell death (Figure 7). However, the intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM partially inhibited ESV-induced death in Jurkat cells (Figure 7).

TABLE 1: Compounds identified in ESV by UFLC-DAD-ESI-QTOF-microTOF QII.

ID	Time (min)	UV	[M-H] ⁻ (m/z)	Molecular formula	Error (ppm)	MS/MS	Compound
1	1.1	—	341.1086	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₁	0.6	341: 179	Sugar derivative
2	8.6	270	305.0660	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	2.3	305: 261, 219, 179, 167, 165	Epigallocatechin
3	12.5	280	289.0714	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1.3	289: 245, 205, 203	Epicatechin
4	19.1	270/346	593.1524	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	2.1	593: 447, 285	Kaempferol-O-hexoside-deoxyhexoside
5	19.7	270/346	609.1450	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1.9	609: 463, 301	
6	20.5	280	545.1440	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	2.5	545: 305, 239, 219, 167, 165	Cassiaflavan-epigallocatechin
7	20.8	280	545.1440	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	2.5	545: 305, 239, 219, 167, 165	Cassiaflavan-epigallocatechin
8	21.2	268/338	593.1522	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1.6	593: 447, 285	Kaempferol-O-hexoside-deoxyhexoside
9	22.3	270/342	593.1521	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1.5	593: 447, 285	
10	22.6	280	529.1489	C ₃₀ H ₂₆ O ₉	2.9	529: 289, 245, 239, 203	Kaempferol-O-hexoside-deoxyhexoside
11	23.5	280	529.1484	C ₃₀ H ₂₆ O ₉	3.7	529: 289, 245, 239, 203	Cassiaflavan-epicatechin
12	24.9	280	529.1489	C ₃₀ H ₂₆ O ₉	2.9	529: 267, 257, 239, 151	Cassiaflavan-epicatechin
13	28.3	280	513.1551	C ₃₀ H ₂₆ O ₈	0.8	513: 267, 255, 239	Naringenin-afzelechin
14	28.8	280	513.1541	C ₃₀ H ₂₆ O ₈	2.8	513: 267, 255, 239	Cassiaflavan-afzelechin
15	30.2	280	785.2266	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₃	3.4	785: 435, 305, 239	Cassiaflavan-afzelechin
16	30.4	280	785.2285	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₃	1.7	785: 435, 305, 239	Cassiaflavan-cassiaflavan-epigallocatechin
17	30.5	280	785.2255	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₃	2.0	785: 435, 305, 239	Cassiaflavan-cassiaflavan-epigallocatechin
18	31.1	280	769.2310	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₂	2.6	769: 529, 419, 289	Cassiaflavan-cassiaflavan-epicatechin
19	31.3	280	769.2303	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₂	1.6	769: 529, 419, 289	Cassiaflavan-cassiaflavan-epicatechin
20	31.5	280	769.2295	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₂	0.6	769: 377, 267, 239	Cassiaflavan-naringenin-afzelechin
21	31.7	280	769.2310	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₂	2.6	769: 377, 267, 239	Cassiaflavan-naringenin-afzelechin
22	31.8	280	769.2297	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₂	0.9	769: 377, 267, 239	Cassiaflavan-naringenin-afzelechin

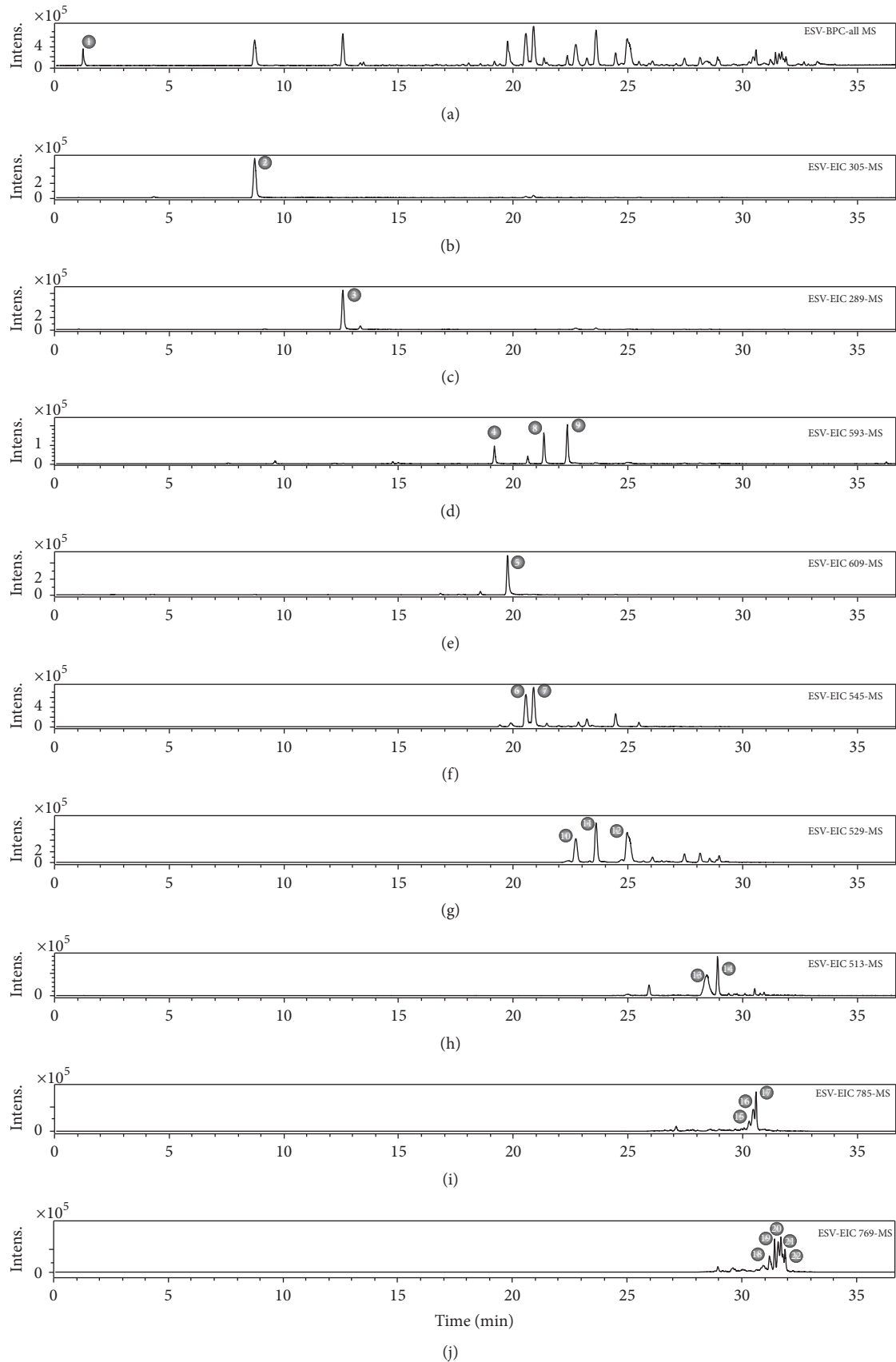


FIGURE 1: UFLC-DAD-ESI-QTOF-microTOF QII chemical profiling (negative mode) of an ethanol extract of *S. velutina* leaves. (a) Base peak chromatograms (BPC). (b) Extract ion chromatogram (EIC) of m/z 305. (c) EIC of m/z 289. (d) EIC of m/z 593. (e) EIC of m/z 609. (f) EIC of m/z 545. (g) EIC of m/z 529. (h) EIC of m/z 513. (i) EIC of m/z 785. (j) EIC of m/z 769.

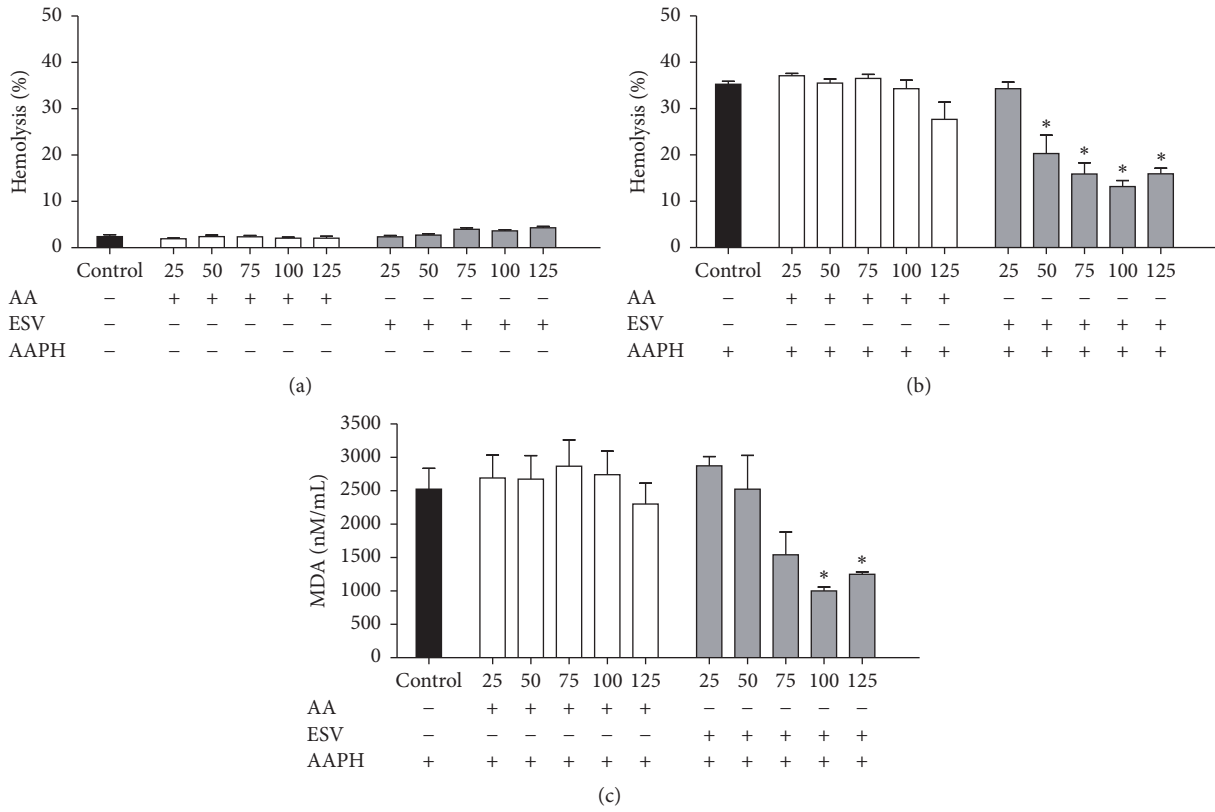


FIGURE 2: Hemolysis and MDA content in human erythrocytes incubated for 5 hours with ascorbic acid (AA) and ESV (50–125 $\mu\text{g/mL}$). (a) Hemolytic activity of ESV in the absence of AAPH. (b) Antihemolytic activity after addition of AAPH. (c) Malondialdehyde (MDA) concentration (nM/mL) after addition of the oxidizing agent. * $P < 0.05$ compared to the AAPH-only control (erythrocytes incubated with oxidant only).

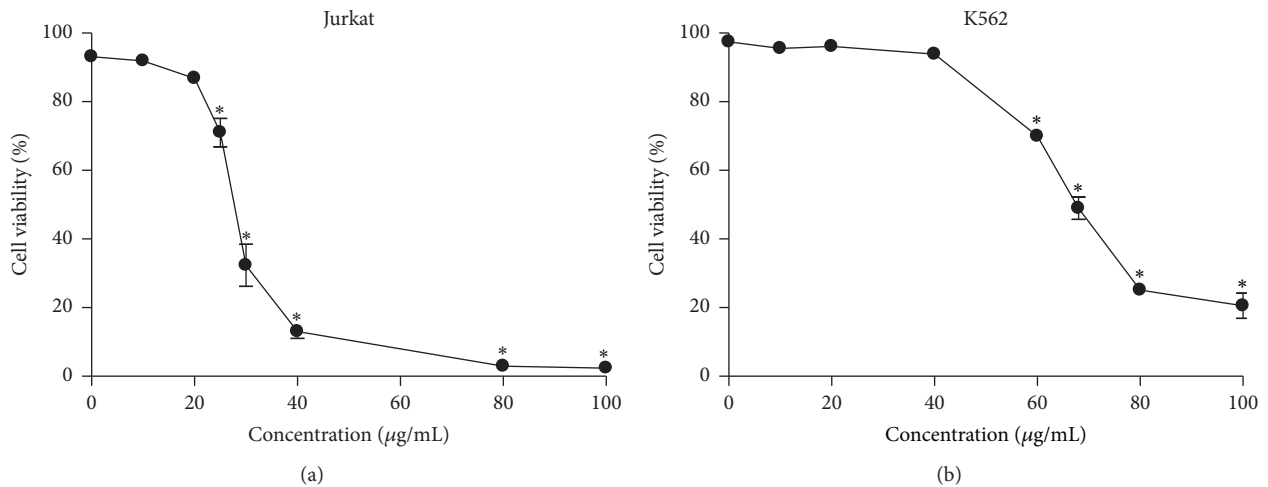


FIGURE 3: Viability of leukemic Jurkat (a) and K562 (b) cells after treatment with different concentrations of ESV. * $P < 0.05$ compared to the untreated control group.

3.9. Cell Cycle Phases. Histograms were used to show the distributions of cell cycle phases in control and ESV-treated Jurkat cells after 24 h of incubation (Figure 8(a)). The results show a decreased portion of cells in G0/G1 phase ($17.4 \pm 0.6\%$)

and increased portions of cells in S and G2/M phases ($30.7 \pm 1.8\%$ and $26.5 \pm 1.9\%$, resp.) (Figure 8(b)). These results indicate that ESV inhibits the progression of cell cycle transitions.

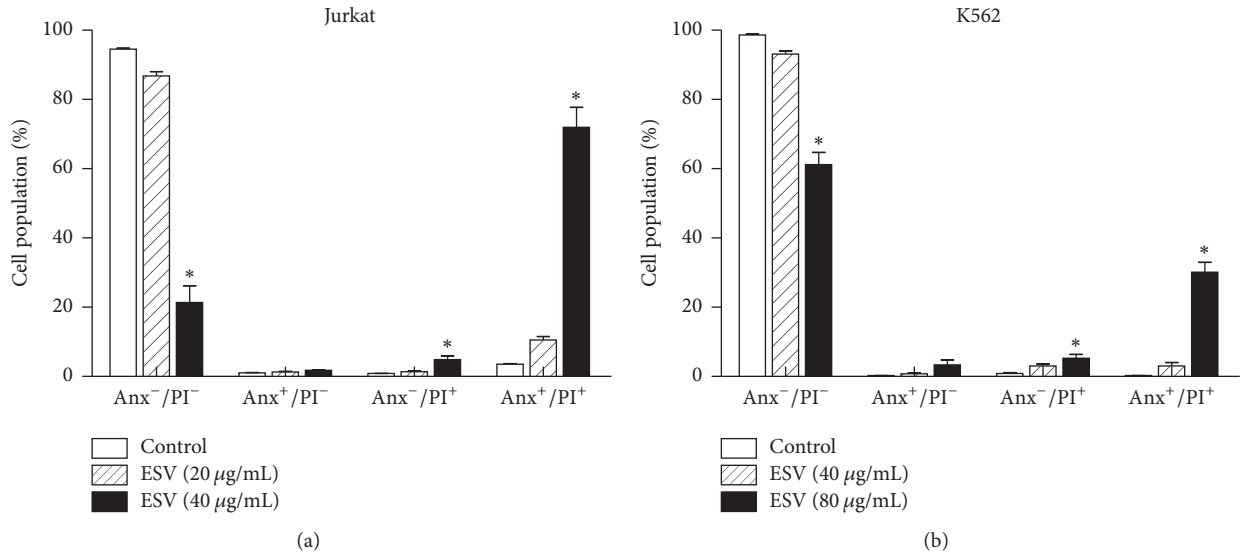


FIGURE 4: Cell death profiles of ESV-treated Jurkat (a) and K562 (b) cells. Anx⁻/PI⁻, viable cells; Anx⁺/PI⁻, apoptotic cells; Anx⁻/PI⁺, necrotic cells; and Anx⁺/PI⁺, late apoptotic cells. * *p* < 0.05 compared to the respective control groups.

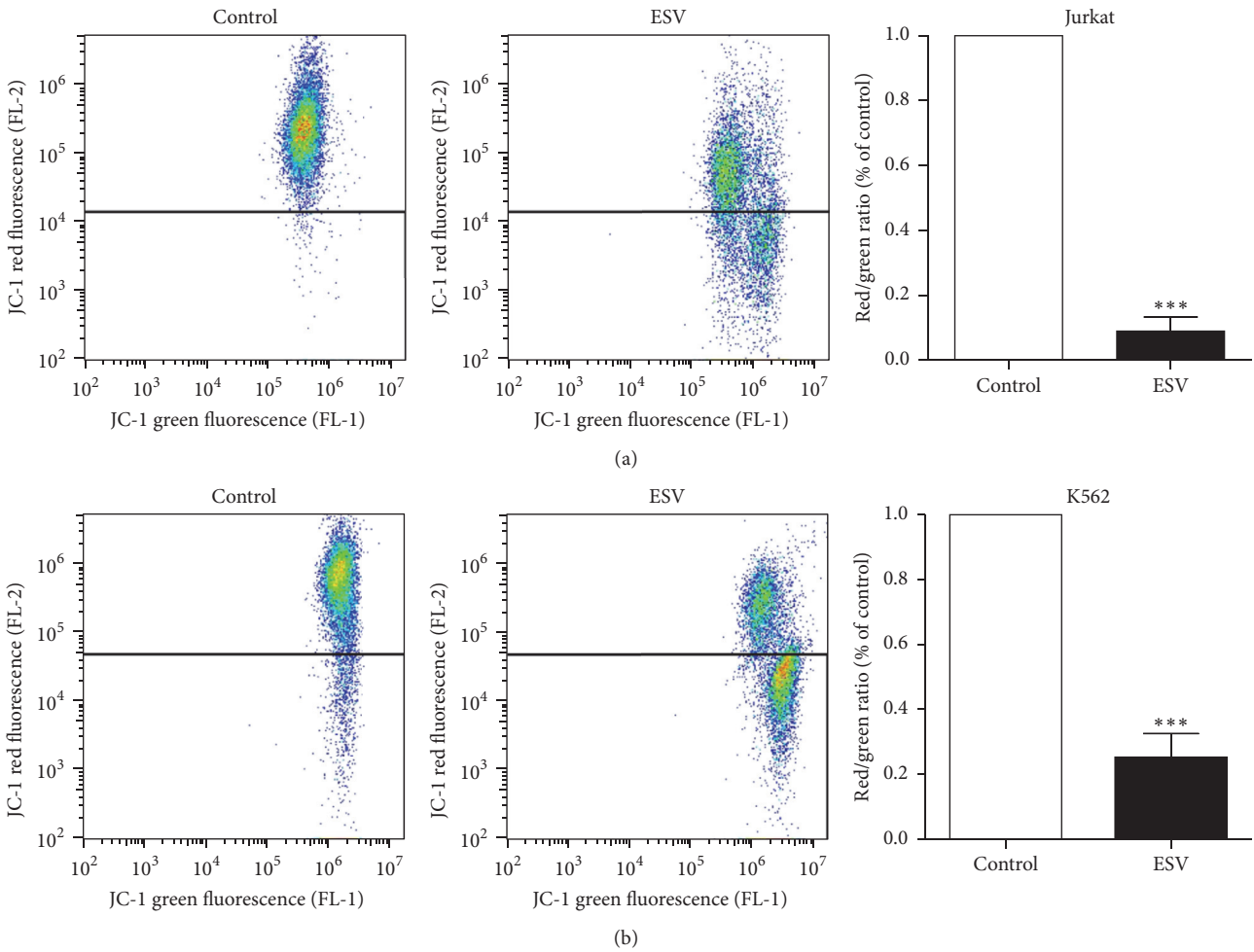


FIGURE 5: Mitochondrial membrane potential of leukemic Jurkat (a) and K562 (b) cells treated with different ESV concentrations. *** *p* < 0.0001 compared to the untreated control group.

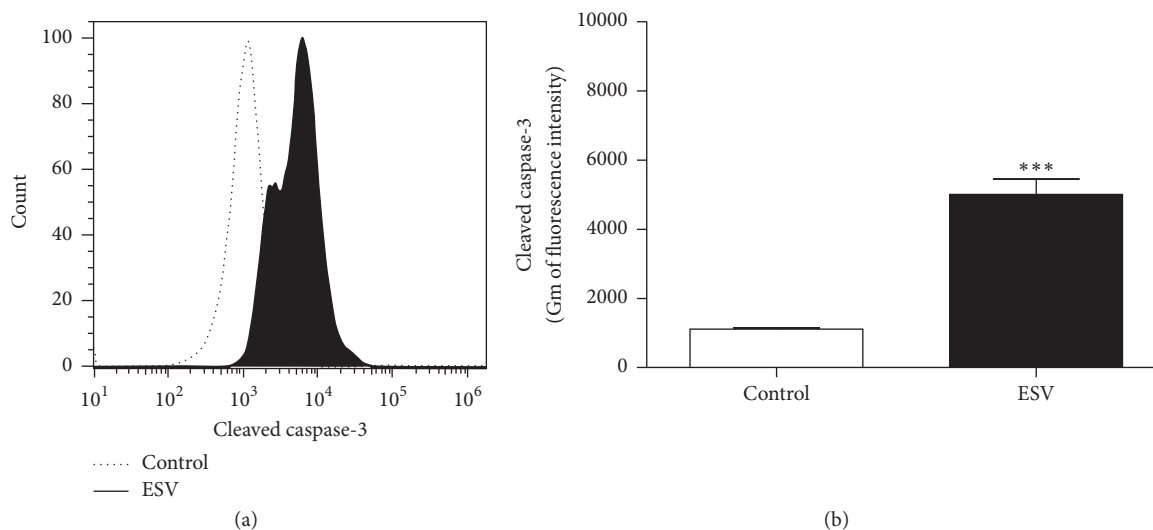


FIGURE 6: Histogram (a) and representative graph (b) of caspase-3 activation in ESV-treated Jurkat cells. *** $P < 0.0001$ compared to the untreated control group.

TABLE 2: IC_{50} and maximal DPPH radical scavenging activity of standard antioxidants and of ESV.

Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Maximal inhibition	
		%	$\mu\text{g/mL}$
Ascorbic acid	2.6 ± 0.8	90.9 ± 1.6	10
BHT	21.3 ± 1.2	92.4 ± 1.2	250
ESV	6.3 ± 1.3	92.4 ± 0.4	25

Values are means \pm SEM.

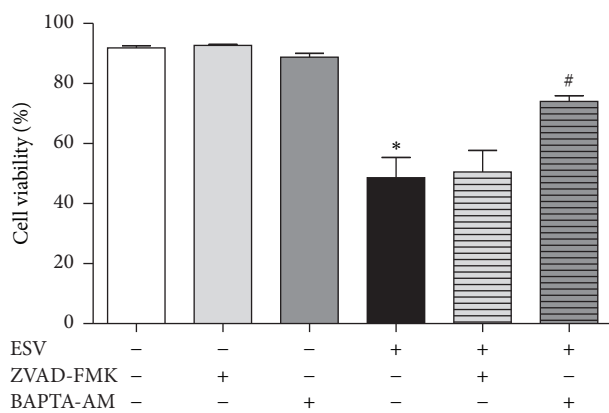


FIGURE 7: Involvement of caspases (via the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK) and intracellular calcium (using the chelator BAPTA-AM) in ESV-induced Jurkat cell cytotoxicity. * $P < 0.05$ compared to the untreated control group. # $P < 0.05$ compared to the ESV group.

4. Discussion

Brazilian biodiversity is rich in active compounds with high potential for development of new therapeutic drugs, particularly antioxidants and anticancer agents. Several plant species found in Brazil have been characterized for their antioxidant and cytotoxic activities in several tumor cell lines [31–33].

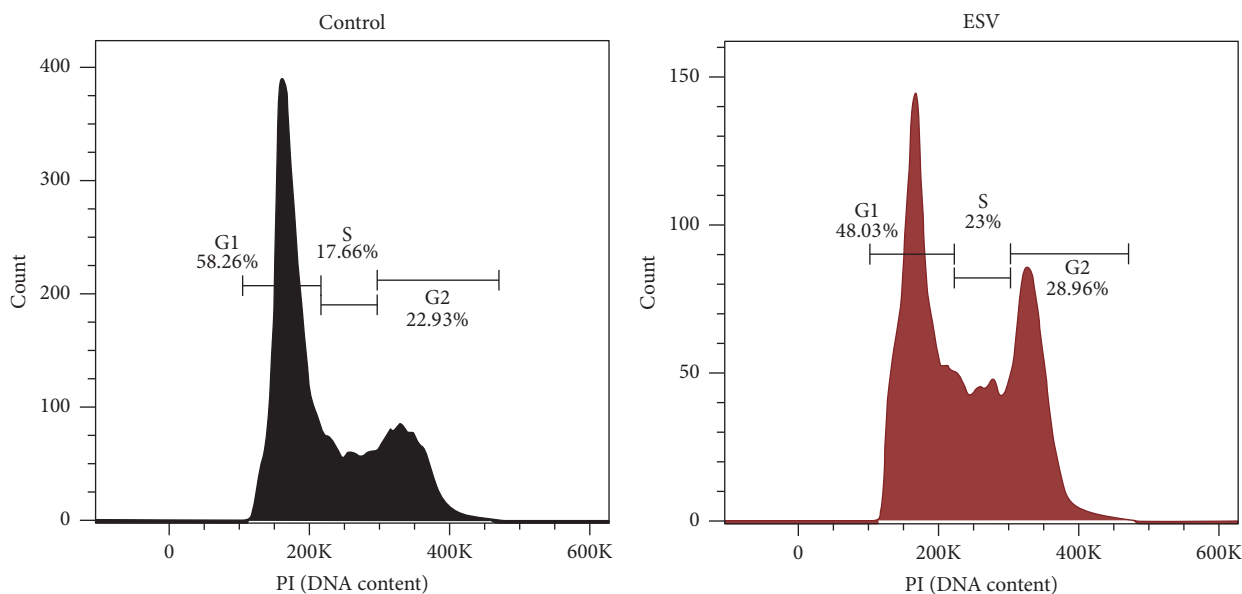
In the present study, an ethanol extract of *S. velutina* leaves exhibited antioxidant activity and showed cytotoxic effects against two leukemic cell lines, Jurkat and K562. The antioxidant activity of ESV was demonstrated in AAPH-incubated human erythrocytes; DPPH free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation led to decreases in oxidative hemolysis and malondialdehyde production. This activity of ESV is likely related to the presence of flavone derivatives with antioxidant activity, such as epigallocatechin, epicatechin, rutin, kaempferol glycosides, and dimeric and trimeric proanthocyanidins, in the leaves [34–37].

Flavonoids can donate hydrogen atoms to radicals, protecting against lipid peroxidation, and this ability is associated with the presence of a dihydroxylated B-ring [38]. Similar to other phenolic compounds, the antioxidant activity of flavonoids is ascribed to the presence of free hydroxyl groups in the molecule, and the level of antioxidant activity increases concomitantly with the number of hydroxyl groups [39].

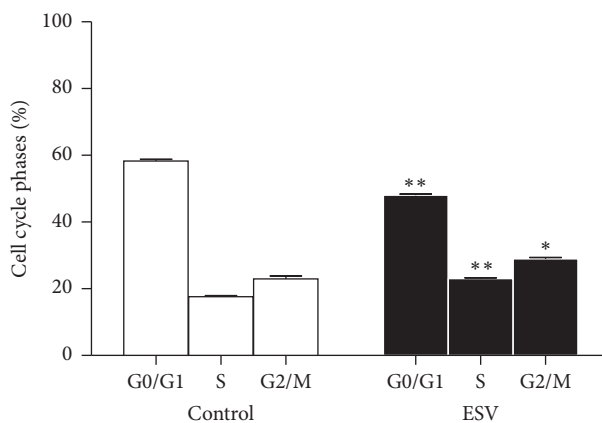
Excess free radicals in the body can promote not only lipid peroxidation but also oxidative DNA damage, leading to the development of early stages of mutagenesis and carcinogenesis [40, 41]. Thus, compounds with antioxidant properties have fundamental roles in preventing diseases such as cancer.

The cytotoxic activity of ESV against leukemic lines was evaluated with an Annexin/PI-stain cell death assay. Furthermore, activation of caspase-3 was observed but was not confirmed to be a main mechanism of cell death when the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK was used. Different extracts can promote several different death mechanisms simultaneously because of their different compositions. This fact complicates the analysis and identification of specific cell death pathways.

The ESV-induced decrease in mitochondrial membrane potential is consistent with the observed cytotoxic effect of ESV against leukemic cells. The changes in potential are likely due to increased mitochondrial membrane permeability



(a)



(b)

FIGURE 8: Histogram (a) and representative graph (b) of cell cycle distribution after 24 h of treatment with ESV. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ compared to the untreated control group.

arising from an increase in intracellular calcium levels, a characteristic of necrotic cell death [42, 43].

The present study demonstrated the involvement of calcium in cell death, as the reduced cell viability of extract-treated cells was reversed by incubation with the calcium chelator BAPTA-AM. High calcium levels promote the opening of mitochondrial permeability transition pores; these pores are nonselective and thus release the contents of the intermembrane space of the mitochondrion [44].

Another mechanism of the ESV-induced cytotoxicity against Jurkat cells consists of cell cycle arrest. ESV promoted a decrease in the number of cells in G0/G1 phase and an increase in the number of cells in S and G2 phases. Established anticancer drugs, such as cisplatin and doxorubicin, exert a similar profile change in the tumor cell cycle [14, 45]. Mueller et al. [46] observed that cisplatin is likely to be active in G2/M phases because cells in these phases are more sensitive to

DNA damage, as DNA repair mechanisms are less active than in G1/S phases. Flavonoids are phytochemicals that are known to induce cell cycle arrest by decreasing cellular levels of cyclin B and cyclin-dependent kinase 1, which are responsible for controlling cell cycle progression between S and M stages [47]. Furthermore, one of the major anticancer mechanisms ascribed to flavonoids is their ability to induce cell cycle changes in tumor cell lines [48]. Thus, cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) have generated great interest for their ability to arrest the tumor cell cycle and prevent tumor cell proliferation; such cell cycle arrest may be the main mechanism through which ESV operates [49]. However, plant extracts are natural products with complex chemical composition, and biologically active compounds in extracts may act alone or synergistically through different pathways.

In conclusion, an ethanol extract of *S. velutina* leaves exhibited antioxidant activity and showed cytotoxic effects

on leukemic cells by activating intracellular calcium and caspase-3, decreasing mitochondrial membrane potential, and arresting the cell cycle in S and G2 phases.

Abbreviations

AA:	Ascorbic acid
AAPH:	2,2'-Azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
Abs:	Absorbance
Anx:	Annexin V-FITC
BHT:	Butylhydroxytoluene
Ca ²⁺ :	Calcium
CaCl ₂ :	Calcium chloride
DAD:	Diode Array Detector
DPPH:	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI-QTOF-microTOF QII:	Electrospray ionization time-of-flight
ESV:	Ethanol extract of <i>S. velutina</i> leaves
JC-1:	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
MDA:	Malondialdehyde
NaCl:	Sodium chloride
PI:	Propidium iodide
SEM:	Standard error of the mean
TBA:	Thiobarbituric acid
UFLC:	Ultra Fast Liquid Chromatography.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by grants of the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Edson Lucas dos Santos, Carlos Alexandre Carollo, and Edgar J. Paredes-Gamero are recipients of fellowships from Brazilian National Research Council (CNPq), Brazil.

References

- [1] S. Sultan, "Reviewing the protective role of antioxidants in oxidative stress caused by free radicals," *Asian Pacific Journal of Health Science*, vol. 1, pp. 401–406, 2014.
- [2] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, "Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health," *Pharmacognosy Reviews*, vol. 4, no. 8, pp. 118–126, 2010.
- [3] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2013," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 63, no. 1, pp. 11–30, 2013.
- [4] American Cancer Society, *Leukemia-Chronic Myeloid (Myelogenous) Overview*, 2013.
- [5] M. J. S. Asmaa, H. A. N. Al-Jamal, C. Y. Ang, J. M. Asan, A. Seeni, and M. F. Johan, "Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, no. 1, pp. 475–481, 2014.
- [6] T. Srdic-Rajic, N. Tisma-Miletic, M. Cavic et al., "Sensitization of K562 leukemia cells to doxorubicin by the *Viscum album* extract," *Phytotherapy Research*, vol. 30, no. 3, pp. 485–495, 2016.
- [7] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 3, pp. 629–661, 2016.
- [8] M. J. Balunas and A. D. Kinghorn, "Drug discovery from medicinal plants," *Life Sciences*, vol. 78, no. 5, pp. 431–441, 2005.
- [9] A. Nagle, W. Hur, and N. S. Gray, "Antimitotic agents of natural origin," *Current Drug Targets*, vol. 7, no. 3, pp. 305–326, 2006.
- [10] O. Prakash, A. Kumar, P. Kumar, and Ajeet, "Anticancer potential of plants and natural products: a review," *American Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 1, no. 6, pp. 104–115, 2013.
- [11] Y. W. Mak, L. O. Chuah, R. Ahmad, and R. Bhat, "Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and Cassia (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts," *Journal of King Saud University-Science*, vol. 25, pp. 275–282, 2013.
- [12] A. C. Susunaga-Notario, S. Pérez-Gutiérrez, M. Á. Zavala-Sánchez et al., "Bioassay-guided chemical study of the anti-inflammatory effect of *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-induced ear edema," *Molecules*, vol. 19, no. 7, pp. 10261–10278, 2014.
- [13] E. Thilagam, B. Parimaladevi, C. Kumarappan, and S. C. Mandal, "α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*," *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, vol. 6, no. 1, pp. 24–30, 2013.
- [14] R. M. Pereira, G. Á. Ferreira-Silva, M. Pivatto et al., "Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (–)-cassine and (–)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression," *Toxicology in Vitro*, vol. 31, pp. 86–92, 2016.
- [15] C. Viegas Junior, A. de Rezende, D. H. S. Silva et al., "Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*," *Química Nova*, vol. 29, no. 6, pp. 1279–1286, 2006.
- [16] L. Delumlle and K. Demeyer, *Anthraquinones in Plants—Source, Safety and Applications in Gastrointestinal Health*, Nottingham University Press, 2008.
- [17] D. Gupta and R. K. Gupta, "Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *in vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, article 13, pp. 1–9, 2011.
- [18] J. F. Campos, U. P. Das Santos, P. D. S. Da Rocha et al., "Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 296186, 11 pages, 2015.
- [19] E. J. Paredes-Gamero, M. N. C. Martins, F. A. M. Cappabianco, J. S. Ide, and A. Miranda, "Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption," *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1820, no. 7, pp. 1062–1072, 2012.
- [20] V. W. R. Moraes, A. C. F. Caires, E. J. Paredes-Gamero, and T. Rodrigues, "Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human

- myeloid leukemia cells," *Cell Death & Disease*, vol. 4, article e658, 8 pages, 2013.
- [21] A. Bechara, C. M. V. Barbosa, E. J. Paredes-Gamero et al., "Palladacycle (BPC) antitumour activity against resistant and metastatic cell lines: the relationship with cytosolic calcium mobilisation and cathepsin B activity," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 79, pp. 24–33, 2014.
- [22] J. Dou, V. S. Y. Lee, J. T. C. Tzen, and M.-R. Lee, "Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 18, pp. 7462–7468, 2007.
- [23] K. V. Rao, A. G. Damu, B. Jayaprakasam, and D. Gunasekar, "Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*," *Journal of Natural Products*, vol. 62, no. 2, pp. 305–306, 1999.
- [24] N. H. El-Sayed, A. M. A. Dooh, S. A. M. El-Khrisy, and T. J. Mabry, "Flavonoids of *Cassia italica*," *Phytochemistry*, vol. 31, no. 6, p. 2187, 1992.
- [25] S. Morimoto, G. Nonaka, R. Chen, and I. Nishioka, "Tannins and related compounds. LXI. Isolation and structures of novel bi- and triflavanoids from the leaves of *Cassia fistula* L.," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 36, no. 1, pp. 39–47, 1988.
- [26] T. Hatano, A. Yamashita, T. Hashimoto et al., "Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*," *Phytochemistry*, vol. 46, no. 5, pp. 893–900, 1997.
- [27] J. Coetzee, L. Mciteka, E. Malan, and D. Ferreira, "Structure and synthesis of butiniflavan-epicatechin and -epigallocatechin probutinidins," *Phytochemistry*, vol. 52, no. 4, pp. 737–743, 1999.
- [28] D. Callemien and S. Collin, "Use of RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts," *The Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 66, pp. 109–115, 2008.
- [29] L. Gu, M. A. Kelm, J. F. Hammerstone et al., "Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 38, no. 12, pp. 1272–1280, 2003.
- [30] S. A. Lazarus, G. E. Adamson, J. F. Hammerstone, and H. H. Schmitz, "High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 3693–3701, 1999.
- [31] J. C. Casagrande, L. F. B. Macorini, K. A. Antunes et al., "Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, Article ID e112748, pp. 1–8, 2014.
- [32] J. M. Serpeloni, A. F. Leal Specian, D. L. Ribeiro et al., "Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 176, pp. 345–355, 2015.
- [33] A. S. N. Formagio, D. D. Ramos, M. C. Vieira et al., "Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 75, no. 1, pp. 69–76, 2015.
- [34] J. Yang, J. Guo, and J. Yuan, "In vitro antioxidant properties of rutin," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 41, no. 6, pp. 1060–1066, 2008.
- [35] L. S. Chua, "A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 150, no. 3, pp. 805–817, 2013.
- [36] E. D. Pauli, G. B. Malta, P. M. Sanchez, I. C. Moreira, and I. S. Scarminio, "Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves," *Analytical Chemistry Research*, vol. 2, pp. 23–29, 2014.
- [37] G. W. Plumb, S. De Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, V. Cheynier, and G. Williamson, "Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation," *Free Radical Research*, vol. 29, no. 4, pp. 351–358, 1998.
- [38] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, 2006.
- [39] A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada, and G. Swierczek-Zieba, "Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis," *Molecules*, vol. 19, no. 1, pp. 78–101, 2014.
- [40] B. Frei, "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action," *The American Journal of Medicine*, vol. 97, no. 3, pp. 5–13, 1994.
- [41] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.
- [42] J. J. Lemasters, T. Qian, C. A. Bradham et al., "Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death," *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 31, no. 4, pp. 305–319, 1999.
- [43] N. Festjens, T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics*, vol. 1757, no. 9–10, pp. 1371–1387, 2006.
- [44] K. W. Kinnally, P. M. Peixoto, S.-Y. Ryu, and L. M. Dejean, "Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both?" *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 4, pp. 616–622, 2011.
- [45] W. Wang, K. Chen, Q. Liu et al., "Suppression of tumor growth by *Pleurotus ferulae* ethanol extract through induction of cell apoptosis, and inhibition of cell proliferation and migration," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 7, Article ID e102673, pp. 1–14, 2014.
- [46] S. Mueller, M. Schittenhelm, F. Honecker et al., "Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin *in vitro*," *International Journal of Oncology*, vol. 29, no. 2, pp. 471–479, 2006.
- [47] M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, "The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 8, pp. 1236–1258, 2013.
- [48] R. P. Singh and R. Agarwal, "Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells," *Current Drug Targets*, vol. 7, no. 3, pp. 345–354, 2006.
- [49] G. K. Schwartz and M. A. Shah, "Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy," *Journal of Clinical Oncology—Biology of Neoplasia*, vol. 23, no. 36, pp. 9408–9421, 2005.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



5 APÊNDICES

5.2 Artigo II: Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3

Publicado no periódico “Frontiers in Pharmacology” (Fator de impacto: 4.400, Qualis A1 para Medicina II). Data de publicação: 14/08/2017.

Link com as normas da revista: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology#author-guidelines>



Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3

OPEN ACCESS

Edited by:

Thomas Efferth,
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz, Germany

Reviewed by:

Subhalakshmi Ghosh,
Jadavpur University, India
Qing Chun Zhao,
Shenyang Pharmaceutical University,
China

*Correspondence:

Edson L. dos Santos
edsonsantospd@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 13 January 2017

Accepted: 30 June 2017

Published: 14 August 2017

Citation:

Campos JF, Espindola PPD, Torquato HFV, Vital WD, Justo GZ, Silva DB, Carollo CA, de Picoli Souza K, Paredes-Gamero EJ and dos Santos EL (2017) Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. *Front. Pharmacol.* 8:466. doi: 10.3389/fphar.2017.00466

Jaqueline F. Campos¹, Priscilla P. de Toledo Espindola¹, Heron F. V. Torquato^{2,3}, Wagner D. Vital⁴, Giselle Z. Justo^{2,5}, Denise B. Silva⁶, Carlos A. Carollo⁶, Kely de Picoli Souza¹, Edgar J. Paredes-Gamero^{2,4} and Edson L. dos Santos^{1*}

¹ Research Group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil, ² Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Faculty of Pharmacy, Braz Cubas University, Mogi das Cruzes, Brazil, ⁴ Interdisciplinary Center of Biochemistry Investigation, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil, ⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁶ Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brazil

Phytochemical studies are seeking new alternatives to prevent or treat cancer, including different types of leukemias. *Campomanesia adamantium*, commonly known as guavira or guabiroba, exhibits pharmacological properties including antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities. Considering the anticancer potential of this plant species, the aim of this study was to evaluate the antileukemic activity and the chemical composition of aqueous extracts from the leaves (AECL) and roots (AECR) of *C. adamantium* and their possible mechanisms of action. The extracts were analyzed by LC-DAD-MS, and their constituents were identified based on the UV, MS, and MS/MS data. The AECL and AECR showed different chemical compositions, which were identified as main compounds glycosylated flavonols from AECL and ellagic acid and their derivatives from AECR. The cytotoxicity promoted by these extracts were evaluated using human peripheral blood mononuclear cells and Jurkat leukemic cell line. The cell death profile was evaluated using annexin-V-FITC and propidium iodide labeling. Changes in the mitochondrial membrane potential, the activity of caspases, and intracellular calcium levels were assessed. The cell cycle profile was evaluated using propidium iodide. Both extracts caused concentration-dependent cytotoxicity only in Jurkat cells via late apoptosis. This activity was associated with loss of the mitochondrial membrane potential, activation of caspases-9 and -3, changes in intracellular calcium levels, and cell cycle arrest in S-phase. Therefore, the antileukemic activity of the AECL

and AECR is mediated by mitochondrial dysfunction and intracellular messengers, which activate the intrinsic apoptotic pathway. Hence, aqueous extracts of the leaves and roots of *C. adamantium* show therapeutic potential for use in the prevention and treatment of diseases associated the proliferation of tumor cell.

Keywords: natural products, medicinal plant, LC-MS, cancer, bioprospecting

INTRODUCTION

Leukemias are cancers that affect white blood cells (Yan et al., 2014), which are responsible for activation of the immune system. Leukemia can be classified as lymphocytic or myeloid according to the cellular origin and as either acute or chronic according to the progression of the disease.

To control or inhibit the proliferation of altered leukemic cells in patients, various treatment strategies can be combined, including chemical treatment, radiological treatment, and stem cell transplantation. In this context, the natural products have been suggesting novel alternatives to prevent or treat cancer, including different types of leukemias (Asmaa et al., 2014; Kinghorn, 2015).

Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae), commonly known as guavira or guabiroba, is a small tree endemic to Brazil that produces edible fruits that are widely used in the production of liqueurs, juices, and jellies (Coutinho et al., 2008; Pavan et al., 2009). The leaves and fruits of *C. adamantium* are used in the traditional medicine as anti-inflammatory, antidiarrheal, and are effective against urinary infections diseases (Vieira et al., 2011), and the roots are used in the treatment of diabetes (Coutinho et al., 2008).

Studies on the chemical composition from *C. adamantium* have indicated the presence of phenolic compounds, such as chalcones (Pavan et al., 2009; Pascoal et al., 2011, 2014), flavanones and flavonols (Coutinho et al., 2010), as well as gallic acid, and ellagic acid (Espindola et al., 2016).

Besides, previous studies have reported antimicrobial (Pavan et al., 2009; Cardoso et al., 2010), antiproliferative (Pascoal et al., 2014), anti-inflammatory, antidepressant, antihyperalgesic, and antidiarrheal activities of the fruits (Lescano et al., 2016; Souza et al., 2017). The roots exhibits antioxidant and antihyperlipidemic effects (Espindola et al., 2016). In addition, the essential oil of the leaves exhibits antimicrobial and antioxidant properties (Coutinho et al., 2009), and leaf extracts show anti-inflammatory, antinociceptive (Ferreira et al., 2013), antioxidant (Coutinho et al., 2010; Pascoal et al., 2011), and antiproliferative activity against prostate cancer cells by decreased the expression of NFκB1 and induction of apoptosis (Pascoal et al., 2014). However, to the best of our knowledge, no previous studies have described the activities of this plant species in leukemic cells.

Considering the anticancer potential of *C. adamantium*, the aim of this study was to evaluate the antileukemic activity of aqueous extracts of its leaves and roots, their mechanisms of action as well as its chemical composition.

MATERIALS AND METHODS

Botanical Specimens and Preparation of Extracts

C. adamantium O. Berg leaves and roots were collected following the identification of the plant and authorization of the SISBIO (*Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade*, permit number 54470).

Leaves and roots of *C. adamantium* O. Berg were collected in Dourados, in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil (coordinates: 22° 02' 47.9 S' and 055° 08' 14.3 W). The samples were cleaned, dried in a convection oven at 45°C, and ground using a Croton knife mill. An exsiccated sample was deposited in the Herbarium of the Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil, with registration number 4108.

Extracts were prepared from the powdered material using an accelerated solvent extractor (ASE[®]-150, Dionex), as described by Espindola et al. (2016). The samples were placed in a cell of 100 mL and extracted with distilled water at temperature of 125°C through two 5 min static cycles, with an 80% flush volume and a 60 s purge. The extracts were lyophilized to obtain the dry extract. Thus, the aqueous extracts of *Campomanesia* leaves (AECL) and roots (AECR) were obtained with a yield of 13 and 6%, respectively.

Identification of Constituents by Liquid Chromatography Coupled to Array Diode Detector and Mass Spectrometry (LC-DAD-MS)

The analyses were performed at a Shimadzu Prominence UFLC coupled to a diode array detector (DAD) and a mass spectrometer (MicroTOF-Q III, Bruker Daltonics) with an electrospray ion source. Kinetex C18 (2.6 μm, 150 × 2.1 mm, Phenomenex) chromatographic column was used. The AECL and AECR extracts were prepared at concentration 1 mg/mL and the volume of 1 μL was injected on the chromatography. The flow rate and oven temperature were 0.3 mL/min and 50°C, respectively. Formic acid 0.1% (v/v) in both water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) were used as mobile phase, applying the following gradient elution profile: 0–8 min at 3% B, 8–30 min at 3–25% B, 30–60 min at 25–80% B, and 60–63 min at 80% B. The MS analyses were carried out both ion modes (positive and negative), applying 2.5 kV of capillary voltage. Nitrogen was used as nebulizer gas (4 Bar), dry (9 L/min) and collisional gas.

Cell Line and Culture Conditions

Human peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were collected after informed patient consent. Separation of

mononuclear cells was performed by gradient centrifugation methods using Ficoll Histopaque-1077 (1.077 g/cm³) (Sigma–Aldrich, Germany) follow the manufacturer's instructions at 400 g for 30 min. The use of human samples was approved by the local Ethical Committee of the University Center of the Grande Dourados under protocol number 123/12.

The Jurkat (human acute T lymphocytic leukemia) cell line was cultured in suspension in RPMI 1640 medium (Cultilab, Brazil) supplemented with 10% fetal calf serum (FBS, Cultilab, Brazil), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C under 5% CO₂.

Cytotoxic Activity

Peripheral blood mononuclear cells and Jurkat cells were seeded (10⁵ cells/mL) in 96-well microplates containing medium with vinblastine (positive control), AECL or AECR at different concentrations. After incubation for 24 h, the treatments were removed and 100 µL of 10% Alamar Blue solution was added. After 5 h, the fluorescence was read at 530 nm (Ex) and 590 nm (Em) in a microplate reader FlexStation 3 (Molecular Devices, USA). Each experiment was performed in triplicate.

Cell Death Profile

The cell death profile was evaluated according to the methods described by Paredes-Gamero et al. (2012), with minor modifications. Jurkat cells were seeded in 96-well plates (10⁵ cells/mL) and cultured in medium containing 10% FBS for 24 h with IC₅₀ of AECL (40 µg/mL) or AECR (80 µg/mL) and the double of these concentrations. After this period, the cells were washed with PBS and resuspended in annexin labeling buffer (0.01 M Hepes, pH 7.4, 0.14 M NaCl, and 2.5 mM CaCl₂). The suspensions were labeled with annexin-FITC and propidium iodide (PI) (Becton Dickinson, USA) according to the manufacturer's instructions, and the cells were incubated at room temperature for 15 min. Finally, 10,000 events were collected per sample through analysis in a Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using FlowJo v10.2 LCC software (Oregon, USA).

Measurement of the Mitochondrial Membrane potential ($\Delta\Psi_{mit}$)

Mitochondrial depolarization was evaluated through the incorporation of JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the method described by Moraes et al. (2013). JC-1 is cationic dye that shows potential-dependent accumulation in mitochondria via fluorescence emission. Cells that stained red were classified as exhibiting a high mitochondrial membrane potential, while those that stained green were classified as exhibiting a low membrane potential. For these assays, cells were seeded in 24-well plates (10⁵ cells/mL), where they were cultured in medium containing 10% FBS and treated with IC₅₀ of the AECL or AECR, for 24 h. After treatment, the cells were centrifuged and incubated with JC-1 (1 µg/mL) at room temperature for 15 min. Fluorescence was analyzed in a FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson,

USA) using CellQuest software (10,000 events were collected per sample).

Western Blot Analysis

Antibodies against actin, Bcl-2 and Bax were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), whereas the monoclonals anti-cleaved caspase-9 and anti-cleaved caspase-8 antibodies were from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against rabbit (goat anti-rabbit), mouse (goat anti-mouse), and goat (donkey anti-goat) were from Millipore (Temecula, CA, USA).

After treatment with IC₅₀ of the AECL or AECR, cells were harvested in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4), 1% Tween-20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM o-Vanadate, 1mM NaF, and 1X protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) on ice for 2 h, and after clarification, protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Equal volume of 2X SDS gel loading buffer was added and samples were boiled for 5 min. Cellular extracts were subjected to SDS-PAGE (10%) and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were probed overnight at 4°C with appropriate primary antibodies at 1:1,000 dilutions. After washing in TBS/0.05% Tween-20, membranes were incubated with anti-goat, anti-rabbit, or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at 1:3,000 dilutions for 1 h. Blots were imaged using Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) on a LAS-3000 imaging system.

Caspase-3 Activity

The activation of caspase-3 was evaluated via flow cytometry according to the method described by Moraes et al. (2013), with minor modifications. Cells were seeded in 24-well plates (10⁵ cells/mL), where they were cultured in medium containing 10% FBS and treated with IC₅₀ of the AECL or AECR, for 24 h. After treatment, the cells were centrifuged, washed, and fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min. The cells were then washed with glycine (0.1 M) in PBS, permeabilized with 0.01% saponin for 30 min, and blocked in PBS containing 1% BSA for 30 min at room temperature. Subsequently, the cells were incubated with an anti-active-caspase-3 monoclonal antibody conjugated with FITC (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) in the dark at room temperature for 40 min. After incubation, fluorescence was analyzed in a FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, USA) using CellQuest software (10,000 events were collected per sample).

Pan-Caspase Inhibitor and Intracellular Calcium

The importance of caspases and calcium for AECL or AECR cytotoxicity was evaluated according to the method described by Bechara et al. (2014), with minor modifications. Briefly, Jurkat cells that had been pretreated for 1 h with 10 µM of the Z-VAD-FMK (general caspases inhibitor) or 10 µM of the BAPTA-AM

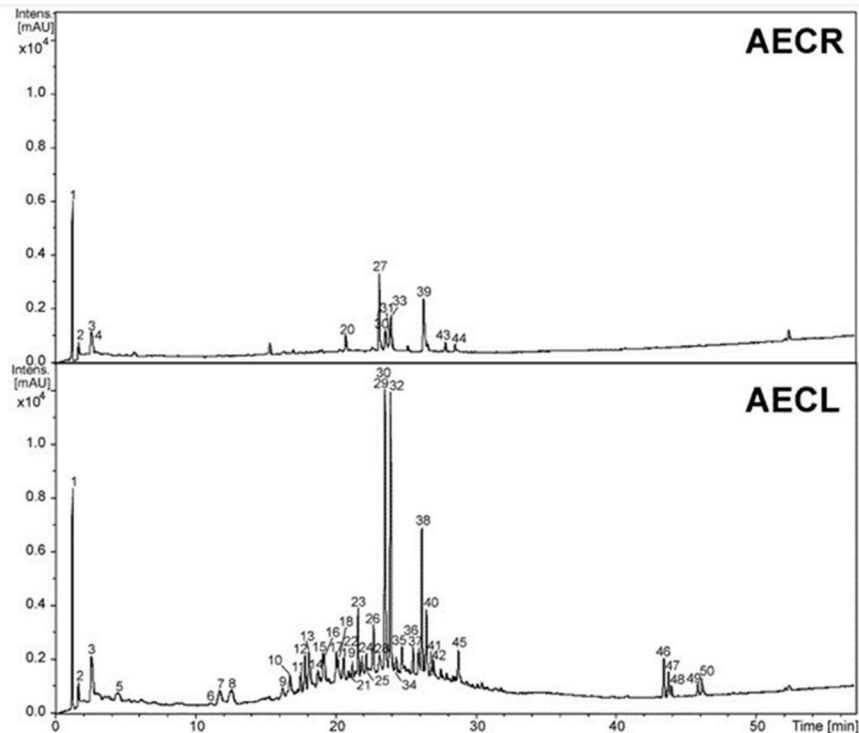


FIGURE 1 | Chromatographic profile at wavelength 230–350 nm of the aqueous extracts of roots (AECR) and leaves (AECL) from *C. adamantium*.

(a calcium chelator) before AECL or AECR incubation for 24 h, both with IC_{50} values, were subjected to trypan blue exclusion assays. To assess cell viability, control and treated cells were resuspended in equal volumes of medium and trypan blue (0.05% solution) and were counted using a hemocytometer chamber.

Ca²⁺ Measurement

Cytosolic Ca²⁺ concentration [Ca²⁺]_{cyt} was determined by incubating 10⁵ Jurkat cells/well in black 96-well microplates with the Fluo-4 Direct Calcium Assay reagent according to the manufacturer's instructions (Life, USA). After 1 h of indicator incorporation at 37°C, cells were stimulated with IC_{50} of the AECL or AECR and the fluorescence was quantified in a FlexStation 3 microplate reader (Molecular Devices, USA). Ionomycin 0.1 μM, was used as positive control to obtain the maximal fluorescence. The Fluo-4 was excited at 490 nm, and the emission was detected at 525 nm (Leon et al., 2011). The records of fluorescence intensity as a function of time correspond to the mean of experiment performed in quadruplicate.

Cell Cycle Phases

To determine the cell cycle distribution, Jurkat cells were seeded (10⁵ cells/mL) and cultured in medium containing 10% FBS and were treated with IC_{50} of the AECL or AECR, for 24 h. After this period, the cells were washed, fixed and permeabilized as described previously. Then, the cells were treated with 4 μg/mL RNase type I for 1 h at 37°C and resuspended in PBS. The cells

were subsequently stained with 5 μg/mL PI and analyzed (12,000 events collected per sample) in an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA). The DNA content was evaluated using an FL2A detector on a linear scale. The dead cells were excluded to cell cycle analysis. The analyses of the cell percentage in the G1/S/G2 phases were performed using FlowJo v10.2 LCC software.

Intracellular Protein Labeling

To investigate the mechanisms of extracts-induced cell cycle arrest, Jurkat cells were seeded in 24-well plates (10⁵ cells/mL), where they were cultured in medium containing 10% FBS and treated with IC_{50} of the AECL or AECR, for 24 h. After this period, were fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min, washed with BD Perm/Wash buffer and permeabilized with BD Perm Buffer III for 30 min. Then, the cells were labeled with 5 μL Ki-67-FITC antibody (Becton Dickinson, USA). To label phosphorylated retinoblastoma protein (p-Rb) anti-p-Rb (Ser780) (Cell Signaling, USA) antibody was used. After permeabilization intracellular protein was incubated for 1 h. Then, anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Life, USA) were used for 40 min. Protein analyses were performed by quantification of the fluorescence geometric mean (Gm). The cells were analyzed in an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using FlowJo v10.2 LCC software (Torquato et al., 2017).

TABLE 1 | Identification of the constituents of aqueous extract from *C. adamantium* by LC-DAD-MS.

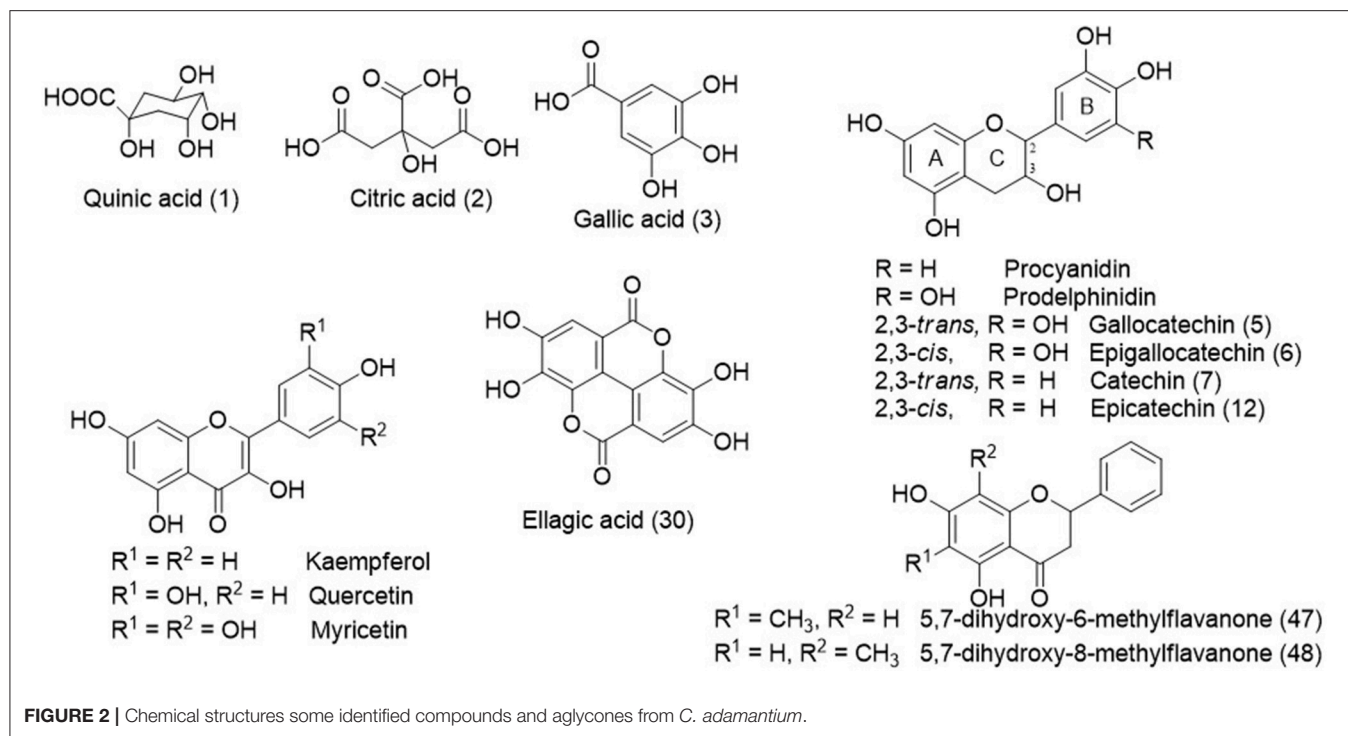
Peak	Retention time (min)	Compound	UV (nm)	Molecular formula	Negative mode (m/z)		Positive mode (m/z)	
					MS [M-H] ⁻ (*)	MS/MS	MS (*)	MS/MS
1	1.1	Di-hexoside	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.1084 (1.5)	-	-	-
		Quinic acid	-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0545 (8.3)	-	193.0700 (0.7)	-
2	1.7	Citric acid	-	C ₆ H ₈ O ₇	191.0193 (2.2)	-	193.0350 (0.7)	-
3	2.6	Gallic acid ^{st-1}	270	C ₇ H ₆ O ₅	169.0141 (1.1)	-	171.0274 (7.9)	-
4	2.6	NI	270	C ₁₀ H ₁₈ O ₈	265.0931 (0.9)	-	289.0891 (3.5) ^{Na}	-
5	4.6	Gallocatechin ^{st-2}	275	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0654 (4.1)	219, 179, 165	307.0815 (0.9)	195, 163, 159
6	11.2	Epigallocatechin ^{st-3}	278	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0664 (1.0)	-	307.0814 (0.5)	-
7	11.7	Catechin ^{st-4}	275	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0711 (2.4)	-	291.0851 (4.0)	189, 161, 147
8	12.5	PCY-PCY dimer (B type)	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1350 (0.3)	407, 289, 245, 161	579.1497 (0)	409, 287, 271, 257, 247, 233, 191, 163
9	16.2	PCY-PCY dimer (B type)	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1348 (0.6)	289	579.1515 (3.1)	409, 287, 271, 257, 233, 163
		PCY-PCY-PCY trimer (B type)		C ₄₅ H ₃₉ O ₁₈	865.1980 (0.6)	577, 289	867.2102 (3.3)	-
10	16.7	NI	256, 275	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	253.1078 (1.4)	195	255.1213 (5.6)	-
11	17.4	PCY-PCY dimer (B type)	280	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1331 (2.0)	407, 339, 289, 245, 161	579.1497 (0)	409, 287, 271, 233, 163
12	17.8	Epicatechin ^{st-5}	278	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0711 (2.2)	245, 179	291.0863 (0.1)	189, 161
13	18.1	Hydrolysable tannin	276	C ₄₈ H ₃₂ O ₃₂	1119.0782 (2.0)	1057, 933, 913, 887, 425, 299, 273	1143.0767 (0.1) ^{Na}	951, 471, 453, 427, 337, 261
14	18.8	PCY-PDE O- gallate (B type)	276	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₇	745.1381 (3.9)	407, 305, 249	747.1565 (0.9)	425, 407, 287, 275, 247
15	19.1	NI	275, 350	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₃	465.0660 (3.1)	332, 287	467.0863 (3.0)	335, 189, 169
16	19.2	NI	278, 360	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0817 (2.9)	332, 287	481.0985 (1.8)	335
17	20.1	Hydrolysable tannin	276	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	951.0705 (4.2)	933, 301, 273	975.0703 (0.7) ^{Na}	-
18	20.2	PCY-PCY O- gallate (B type)	280	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.1435 (3.6)	407, 289, 169	731.1629 (3.1)	409, 283, 271, 259, 153
19	20.6	PCY-PCY-PCY (B type)	280	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1981 (0.5)	407, 287	867.2134 (0.4)	427, 409, 291, 289, 275, 247
		Myricetin O- pentoside	-, 360	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449.0720 (1.2)	316	451.0893 (4.8)	-
20	20.7	Ellagic acid O- hexoside	252, 360	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₃	463.0491 (5.8)	301	465.0692 (5.8)	303, 275, 257, 247, 229
21	21.1	PCY-PCY dimer (B type)	280	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1341 (1.8)	407, 289	579.1500 (0.3)	409, 287, 271, 257, 163
22	21.2	PCY-PCY O- gallate (B type)	280	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.1432 (3.9)	451, 407, 289, 271, 169	731.1597 (1.4)	409, 287, 275, 247, 163, 151
23	21.7	Myricetin O- pentoside	275, 350	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449.0703 (5.1)	316, 287, 271	451.0876 (1.1)	319, 273, 245
24	21.9	Myricetin O- hexoside	266, 360	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0833 (0.49)	316	481.0975 (0.2)	319
25	22.2	Myricetin O- hexoside	265, 355	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0808 (4.9)	316	481.0965 (2.4)	319
26	22.7	Myricetin O- pentoside	270, 355	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449.0711 (3.3)	316, 287, 271	451.0858 (3.0)	319, 273, 245
27	23.1	Ellagic acid O- pentoside	253, 360	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433.0425 (2.8)	301	435.0571 (3.0)	303, 275, 257
28	23.3	PCY O- gallate	280	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0807 (4.6)	169	433.0960 (2.9)	-
29	23.6	Myricetin O- pentoside	268, 355	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449.0711 (3.3)	316, 287, 271	451.0858 (3.0)	319, 273, 245
30	23.6	Ellagic acid ^{st-6}	252, 365	C ₁₄ H ₆ O ₈	301.0003 (4.5)	-	303.0128 (2.3)	275, 257, 247, 201
31	23.9	O- Methyl ellagic acid O- hexoside	250, 360	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477.0664 (2.1)	315	479.0798 (4.7)	317, 302, 285, 257
32	24.0	Myricetin O- deoxyhexoside	260, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0857 (5.4)	316, 287, 271	465.1035 (0.8)	319, 273, 245, 165, 153

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Peak	Retention time (min)	Compound	UV (nm)	Molecular formula	Negative mode (m/z)		Positive mode (m/z)	
					MS [M-H] ⁻ (*)	MS/MS	MS (*)	MS/MS
33	24.0	Ellagic acid O-deoxyhexoside	253, 360	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	447.0562 (1.7)	300	449.0723 (1.9)	303, 285, 257
34	24.3	Quercetin O-hexoside	-, 354	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0865 (3.6)	300	465.1031 (0.7)	303
35	24.8	Quercetin O-hexoside	268, 354	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0872 (2.1)	300	465.1017 (2.3)	303
36	25.5	Quercetin O-pentoside	260, 355	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0769 (1.6)	300, 271	435.0911 (2.5)	303
37	25.9	Quercetin O-pentoside	265, 352	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0757 (4.5)	300, 271	435.0925 (0.8)	303
38	26.2	Quercetin O-pentoside	258, 352	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0757 (4.6)	300, 271, 255, 243, 179	435.0922 (0.2)	303, 257, 229, 165, 153
39	26.3	O-Methyl ellagic acid sulfate	247, 360	C ₁₅ H ₈ O ₁₁ S	394.9712 (0.7)	315, 300	396.9844 (3.9)	317, 302, 285, 257
40	26.5	Myricetin O-(O-galloyl)-pentoside	268, 355	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₆	601.0796 (6.5)	449, 316, 299, 283	603.1002 (3.5)	319, 285, 153
41	26.9	Kaempferol O-hexoside	265, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0902 (6.9)	284	449.1071 (1.1)	287
42	27.0	Quercetin O-deoxyhexoside	268, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0911 (4.8)	300, 271	449.1082 (0.8)	303
43	27.8	O-Methyl ellagic acid O-deoxyhexoside	248, 365	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.0737 (2.6)	317, 302, 285, 257	463.0892 (4.6)	315, 300
44	28.5	O-Dimethyl ellagic acid sulfate	265, 360	C ₁₆ H ₁₀ O ₁₁ S	408.9868 (0.8)	329, 314, 299	411.0026 (2.4)	-
45	28.8	Quercetin O-(O-galloyl)-pentoside	268, 355	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	585.0886 (1.6)	433, 301, 300, 283, 169	587.1023 (1.4)	303, 285, 171, 153
46	43.4	NI	290, 335 ^{sh}	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	237.1130 (1.0)	193, 175, 167	239.1268 (4.3)	206, 191, 178, 163
47	43.7	5,7-dihydroxy-6-methylflavanone	292, 335 ^{sh}	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269.0820 (0.3)	227, 199, 183, 171, 165	271.0956 (3.3)	167
48	43.9	5,7-dihydroxy-8-methylflavanone	292, 337 ^{sh}	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269.0810 (3.3)	227, 165	271.0967 (0.8)	167
49	45.8	NI	335	C ₁₄ H ₂₀ O ₄	251.1288 (0.4)	233, 207, 193, 167	253.1434 (0.2)	205, 165, 152
50	46.1	NI	335	C ₁₄ H ₂₀ O ₄	251.1279 (4.0)	233, 207, 189, 167	253.1436 (0.5)	235, 205, 191, 177

*, error in ppm; ^{Na}, [M+Na]⁺; ^{sh}, shoulder; PCY, procyanidin; PDE, prodelphinidin NI, non-identified; st, confirmed by authentic standard (1-MS² neg (m/z): 125; 2-MS² neg (m/z): 219, 179, 165; 3-MS² neg (m/z): 287, 261, 179; 4-MS² pos (m/z): 207, 189, 161; 5-MS² pos (m/z): 189, 161, 6-MS² pos (m/z): 275, 257, 247).



Statistical Analyses

The data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed for statistically significant differences between groups. Student's *t*-test was employed for comparisons between two groups, and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test was employed for comparisons of more than two groups using Prism 5 GraphPad Software. The results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Identification of Constituents from the Extracts

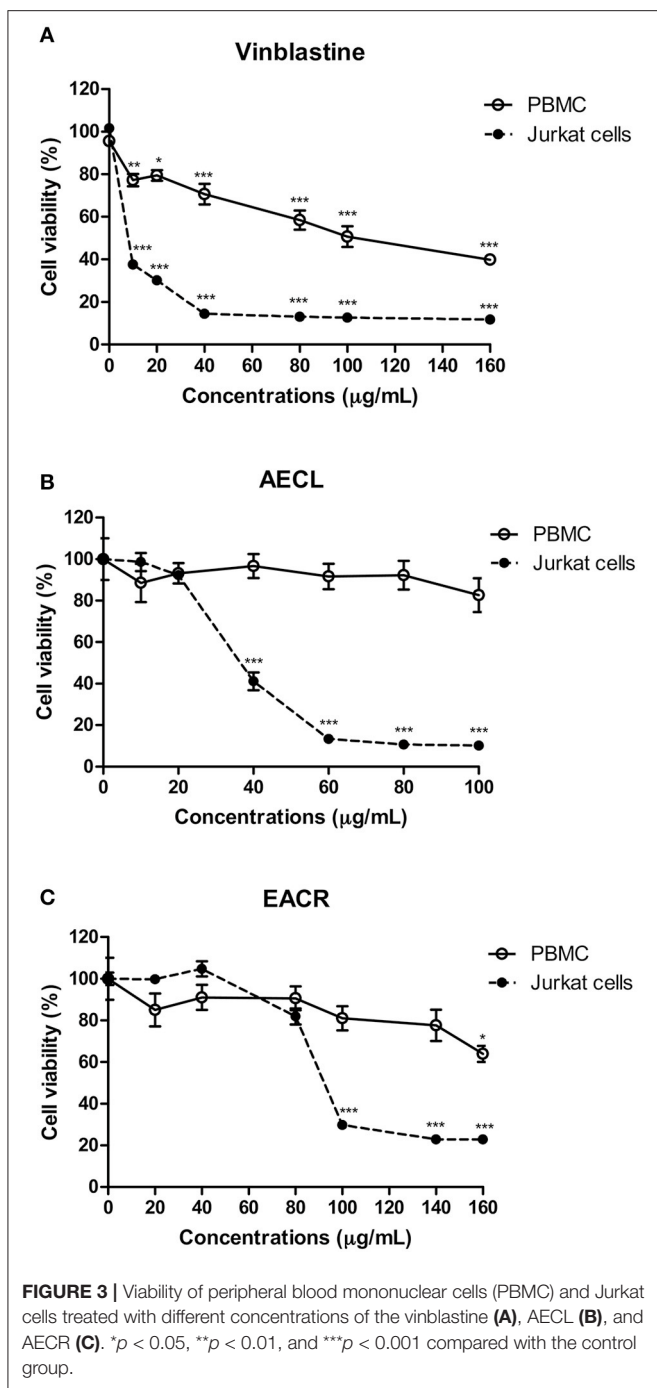
The constituents from AECL and AECL were identified based on the UV, high resolution MS and MS/MS data (Figure 1, Table 1) and the comparison to the published data (Fabre et al., 2001; March et al., 2006; Ferreres et al., 2013; Guaratini et al., 2014; Zhang et al., 2016). The main compounds identified from AECL were di-hexoside/quinic acid (1), ellagic acid *O*-pentoside (27), ellagic acid (30), *O*-methyl ellagic acid *O*-hexoside (31), ellagic acid *O*-deoxyhexoside (33), and *O*-methyl ellagic acid sulfate (39) (Table 1). In addition, other constituents were identified such as gallic acid (3), ellagic acid *O*-hexoside (20), *O*-methyl ellagic acid *O*-deoxyhexoside (43), and *O*-dimethyl ellagic acid sulfate (44) (Figure 2).

While from AECL, forty-two compounds have been identified. The main constituents identified were di-hexoside/quinic acid (1), myricetin *O*-pentoside (23, 26, 29), myricetin *O*-deoxyhexoside (32), quercetin *O*-pentoside (38), and myricetin *O*-(*O*-galloyl)-pentoside (40).

The peaks 5–9, 11–12, 14, 18–19, 21–22, and 28 (Table 1) presented a similar UV ($\lambda_{\max} \approx 280$ nm), which are compatible to flavan-3-ols (Markham, 1982). The typical fragmentation for condensed tannins was observed for these chromatographic peaks, including the heterocyclic ring fission, retro-Diels-Alder (RDA) and quinone methide reactions (Gu et al., 2003; Guaratini et al., 2014; Nocchi et al., 2017). The condensed tannins esterified with gallic acid were confirmed by fragment ion at m/z 169 [$M-H$ -flavan-3-ol units] $^-$, such as for 14, 18, 22, and 28. The monomers were confirmed by co-injection of authentic standard as gallocatechin (5), epigallocatechin (6), catechin (7), and epicatechin (12) (Figure 2).

The compounds 19, 23–26, 29, 32, 34–38, 40–42, and 45 exhibited UV spectra relative to flavonols (Markham, 1982). The losses of 162, 146, 132, and 152 u confirmed the presence of hexoside, deoxyhexoside, pentoside, and gallic acid, respectively. The identification of aglycones was based on product ions yielded from C-ring fissions, as widely described in the literature (Fabre et al., 2001; March et al., 2006), and they corroborated to the aglycones quercetin, kaempferol, and myricetin. In addition, the compounds 47 and 48 showed intense ions at m/z 269 [$M-H$] $^-$ and 271 [$M+H$] $^+$, compatible to molecular formula $C_{16}H_{14}O_4$ and UV spectra characteristic of flavanone. The determination of the methyl position in A-ring was established from elution time described for 5,7-dihydroxy-6-methylflavanone and 5,7-dihydroxy-8-methylflavanone, which were isolated from *C. adamantium* (Coutinho et al., 2010).

The compounds 20, 27, 30, 31, 33, 39, 43, and 44 showed UV spectra compatible to ellagic acid (Ferreres et al., 2013). From m/z 303.0128 [$M+H$] $^+$ ($C_{14}H_7O_8^+$, error 4.5 ppm) of compound 30 were yielded the product ions at m/z 275,



257, and 247, which are relative to subsequent eliminations of CO (28 u) and water molecules and they were compatible to ellagic acid (confirmed by co-injection of the standard) (Ferreres et al., 2013; Zhang et al., 2016). The losses of 15 and 80 u confirmed the presence of methoxyl (31, 39, 44) and sulfate substituents (39, 44) and they were identified as *O*-methyl ellagic acid sulfate and *O*-dimethyl ellagic acid sulfate, respectively. Similar sulfate ellagic acid derivatives have been described from *Lagerstroemia speciosa* (Lythraceae) and

Euphorbia sororia (Euphorbiaceae) (Bai et al., 2008; Zhang et al., 2008). The derivatives of ellagic acid were only detected from *C. adamantium* roots.

Cytotoxic Activity

Peripheral blood mononuclear cells and Jurkat cells were treated with vinblastine, AECL or AECR to assess cell viability. Vinblastine promoted cell death in Peripheral blood mononuclear cells ($IC_{50} = 25.9 \mu\text{g/mL}$) and Jurkat cells ($IC_{50} = 9.5 \mu\text{g/mL}$) (Figure 3A). The AECL did not change the viability of Peripheral blood mononuclear cells at the evaluated concentrations, however, promoted death in Jurkat cell ($IC_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$) (Figure 3B). AECR showed low cytotoxicity against Peripheral blood mononuclear cells only at the highest concentration evaluated (160 $\mu\text{g/mL}$), but demonstrated concentration-dependent cytotoxicity against Jurkat cells ($IC_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$) (Figure 3C).

Cell Death Profile

Both extracts resulted in double staining (annexin V⁺/PI⁺), indicating late apoptosis. This type of death was observed in $76.1 \pm 3.2\%$ of the cells treated with 80 $\mu\text{g/mL}$ AECL (Figure 4A) and in $65.1 \pm 1.4\%$ of the cells treated with 160 $\mu\text{g/mL}$ AECR (Figure 4B).

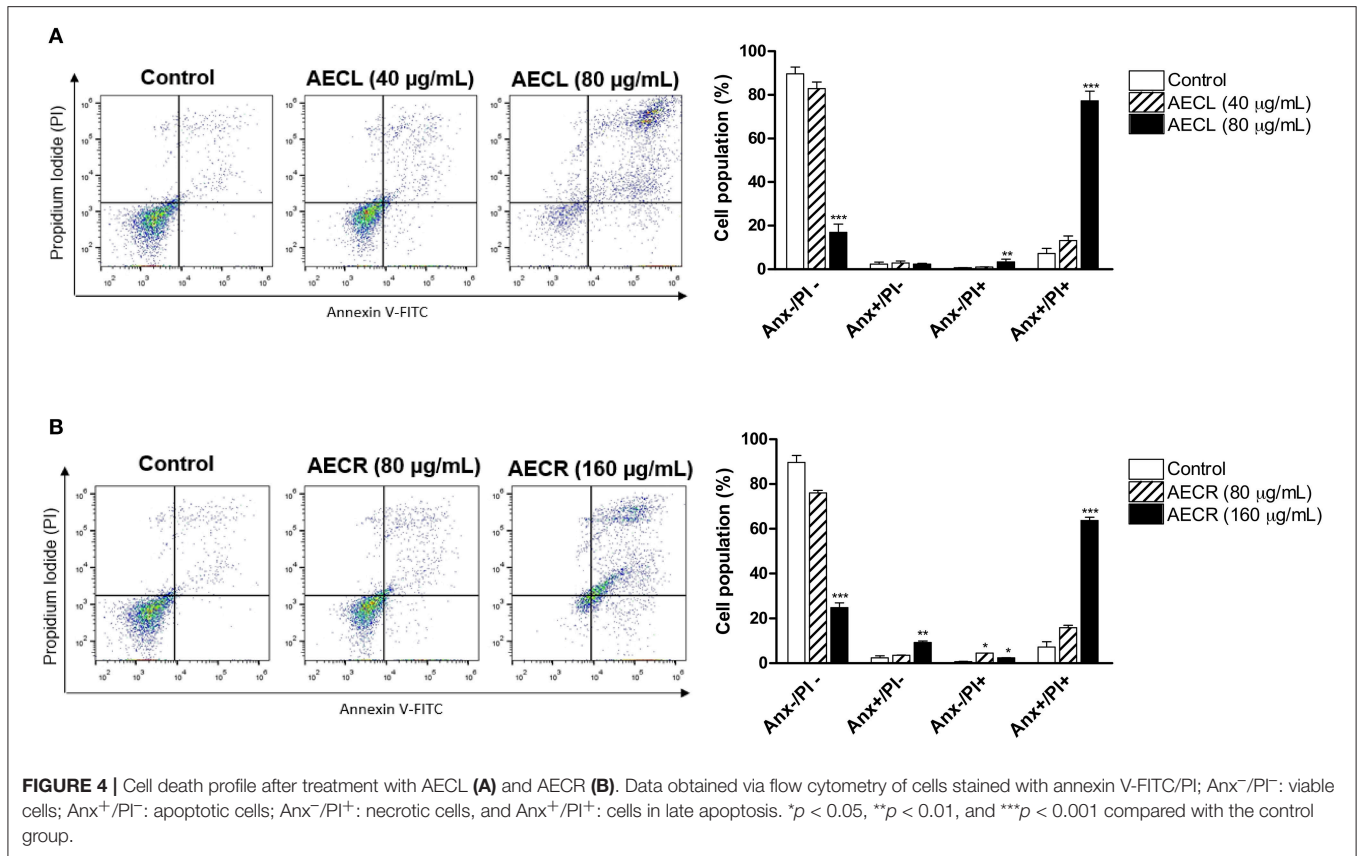
Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_{mit}$)

$\Delta\Psi_{mit}$ was decreased in cells treated with AECL and AECR compared with untreated cells, as demonstrated by decreased red fluorescence and increased green fluorescence after a 24-h incubation. The rates of mitochondrial depolarization in cells treated with AECL and AECR were 85.4 ± 8.2 and $84.5 \pm 2.0\%$, respectively (Figures 5A,B).

Expression of Caspases, Bcl-2, and Bax

In order to evaluate the role of the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in cell death, protein expression of cleaved-caspases-8 and -9, Bcl-2, and Bax were investigated by western blot. As demonstrated in Figure 6A, the extrinsic pathway did not influence the mechanism of action of these extracts as evidenced by the absence of the characteristic fragments of cleaved caspase-8 (Asp391). In contrast, there was an increase in the cleaved form of caspase-9 (Asp330) in cellular extracts treated with both AECL and AECR, suggesting a role for the intrinsic pathway in mediating apoptosis. Moreover, this was followed by a slight increase in the expression of Bax, whereas no alteration was seen in Bcl-2 expression (Figure 6B).

A monoclonal anti-cleaved caspase-3 antibody was used to evaluate caspase-3 activation in cells incubated with AECL and AECR, and the cells were analyzed via flow cytometry. Both extracts resulted in the cleavage of pro-caspase 3, as indicated by a shift in fluorescence to the right (Figures 7A,B). Caspase-3 activation was 5.0-fold higher in cells treated with AECL (Figure 7A) and 2.5-fold higher in cells treated with AECR compared with the untreated control (Figure 7B).



Pan-Caspase Inhibitor and Intracellular Calcium Levels

Jurkat cells were pre-incubated with Z-VAD-FMK, a general caspase inhibitor, to assess whether caspases were involved in the cytotoxicity induced by the tested extracts. We observed that AECL-induced cytotoxicity decreased after treatment with the inhibitor (Figure 8A), indicating that caspases are actively involved in the cytotoxicity of this extract. However, pre-incubation with Z-VAD-FMK resulted in no difference in the viability of cells treated with AECR (Figure 8B).

Additionally, Jurkat cells were pre-incubated with BAPTA-AM, an intracellular Ca²⁺ chelator, to investigate the role of Ca²⁺ in the cytotoxicity induced by the extracts. Our results showed that AECL- and AECR-induced cytotoxicity was decreased after treatment with BAPTA-AM (Figures 8A,B), demonstrating the importance of calcium in the cytotoxic activity of the extracts in this cell line.

To corroborate the involvement of cytoplasmatic Ca²⁺ in cell death AECL and AECR- induced we performed a temporal evaluation of Ca²⁺ concentration. Both compounds were able to promoted increase of Ca²⁺ concentration in Jurkat cells (Figures 9A,B).

Cell Cycle Distribution

The effect of the extracts on the cell cycle distribution is shown in Figure 10A. The numbers of Jurkat cells in G1 phase were

decreased by 16.6 ± 1.3 and $8.0 \pm 0.5\%$ after 24 h of treatment with AECL and AECR, respectively, compared with untreated cells. The number of cells in S phase after treatment with AECL and AECR increased to 23.86 and 25.23%, respectively, compared with untreated cells 17.66% (Figures 10A,B).

The arrest of cell cycle was confirmed by the quantification of Ki-67 protein, a protein only expressed during the cell division cycle, and by quantification of p-Rb, a protein that prevent the progression of cell cycle when is not phosphorylated. Ki-67 was not altered by AECL, whereas AECR promoted a reduction of $27.3 \pm 0.1\%$ (Figure 11A). Furthermore, the cell cycle arrest was also confirmed by the reduction of p-RB levels (AECL $27.9 \pm 3.7\%$; AECR $58.5 \pm 2.5\%$) (Figure 11B).

DISCUSSION

The fruits of *C. adamantium* are widely consumed freshly, and to produce liqueurs, juice and sweets (Pavan et al., 2009). Several chemical and biological studies have been performed from the fruits (Pavan et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Pascoal et al., 2014; Lescano et al., 2016; Souza et al., 2017). However, the studies from leaves and roots are still underexplored, representing a huge and important issue to comprehend their biological properties in this study and others.

The AECR and AECL showed huge differences from chemical constituents. AECR basically showed ellagic acid and its

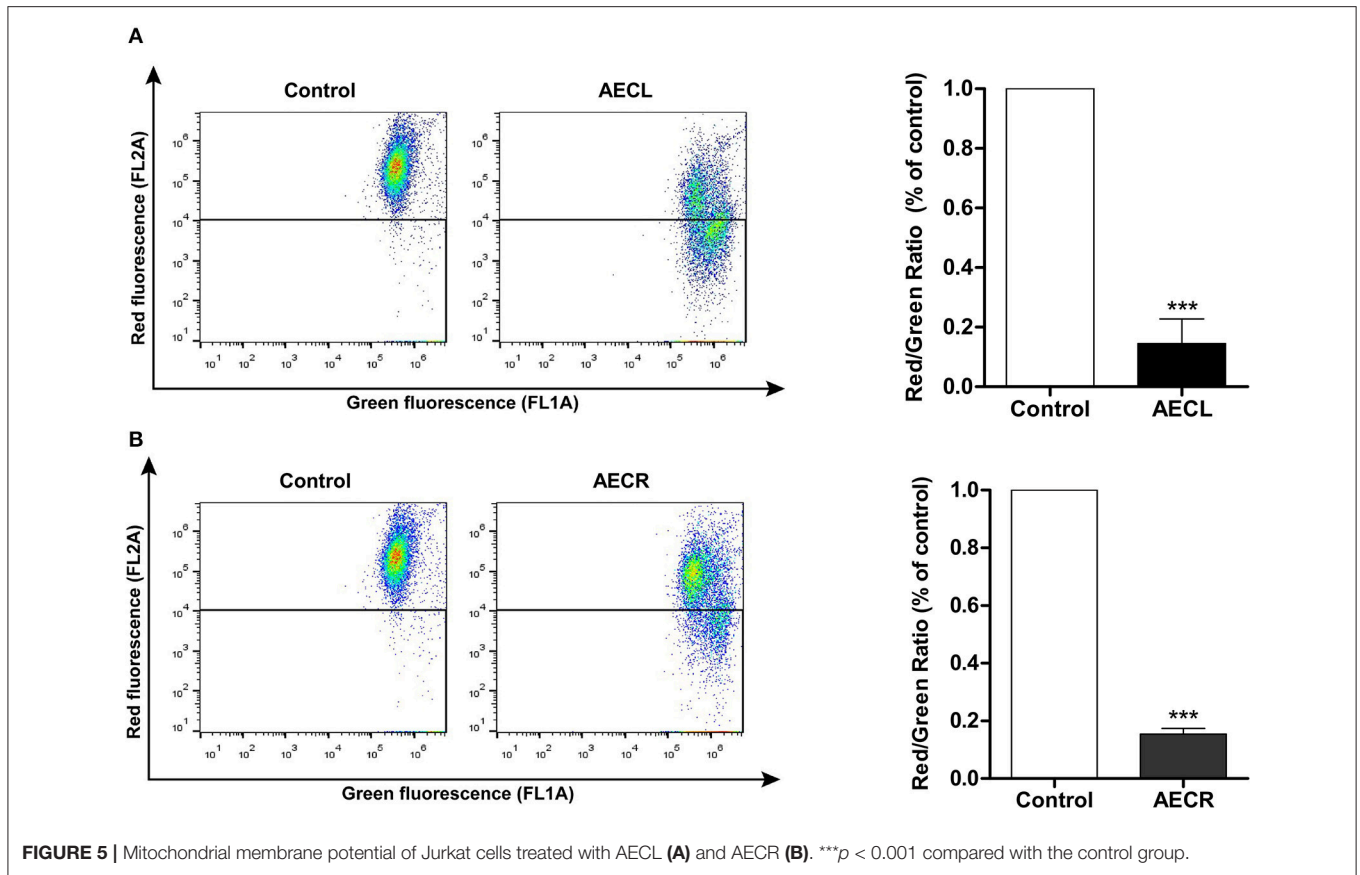


FIGURE 5 | Mitochondrial membrane potential of Jurkat cells treated with AECL (A) and AECL (B). *** $p < 0.001$ compared with the control group.

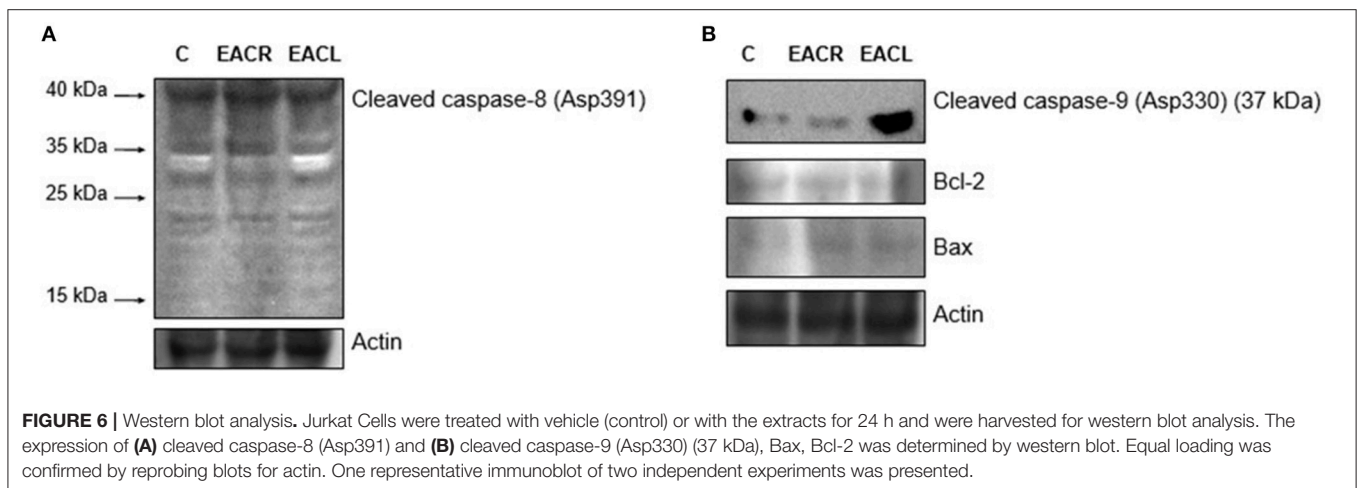
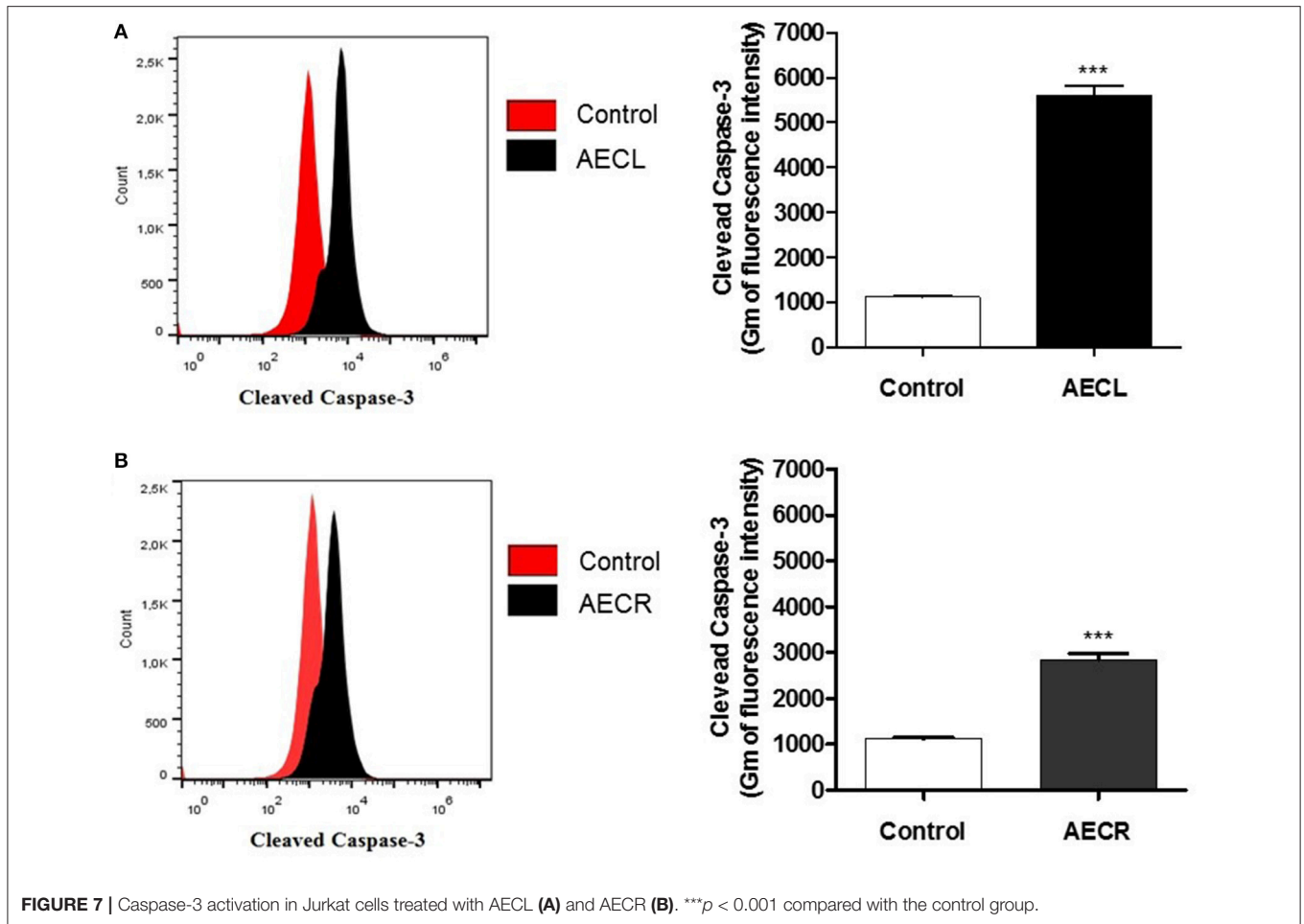


FIGURE 6 | Western blot analysis. Jurkat Cells were treated with vehicle (control) or with the extracts for 24 h and were harvested for western blot analysis. The expression of (A) cleaved caspase-8 (Asp391) and (B) cleaved caspase-9 (Asp330) (37 kDa), Bax, Bcl-2 was determined by western blot. Equal loading was confirmed by reprobing blots for actin. One representative immunoblot of two independent experiments was presented.

derivatives, (methoxylated, glycosylated, and sulfated), as well as organic acids in its composition. Differently, the AECL revealed mainly glycosylated flavonols, flavanones, flavan-3-ols, and condensed tannins. The main compounds identified from AECL were the flavonols myricetin *O*-pentoside (23, 26, 29), myricetin *O*-deoxyhexoside (32), quercetin *O*-pentoside (38), and myricetin *O*-(*O*-galloyl)-pentoside (40).

Brazilian biodiversity is rich in active compounds with high potential for development of new anticancer agents (Campos

et al., 2016). Among the 174 anticancer drugs that have been commercially available in recent decades, ~10% are of natural origin, and 25% are derived from natural products (Newman and Cragg, 2016). These percentages underscore the need to the search for new sources of bioactive compounds for cancer therapy. In this study, the analysis of the cytotoxic potential of extracts of *C. adamantium* leaves and roots in leukemic Jurkat cells revealed that both extracts induced cell death; however, the leaf extract was more effective than the root extract.

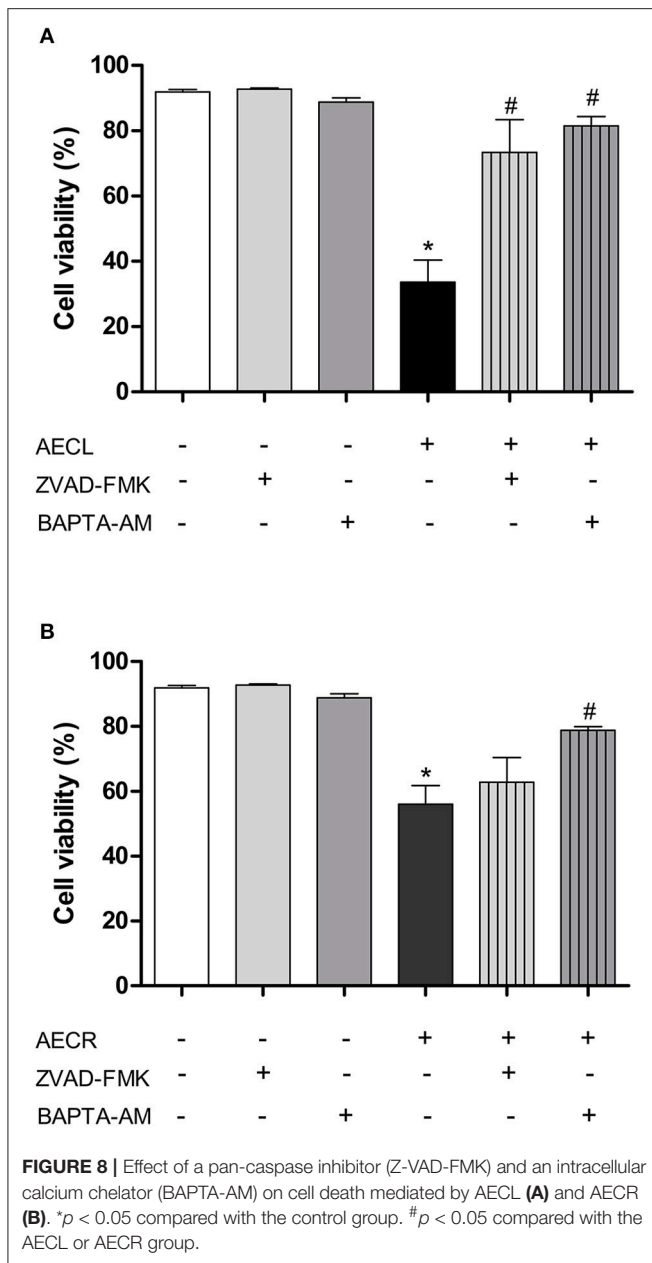


These results suggest that most of the biologically active compounds found in this plant species are likely concentrated in the leaves, which showed chemical composition extremely different of roots and explain the differences at biological properties. Pascoal et al. (2014) showed that the compound cardamonin was predominantly found in extracts of the leaves and fruits of *C. adamantium*, and the higher antiproliferative activity associated with the leaves was correlated with the higher concentration of this phenolic compound.

In the present study, analysis of the cell death profile induced by the *C. adamantium* extracts demonstrated a predominance of late apoptotic death against Jurkat cells. This type of cell death, also known as post-apoptotic or secondary necrotic death (Patel et al., 2006), does not involve phagocytosis and is characterized by the activation of mechanisms similar to those of necrosis (Krysko et al., 2008). Late apoptotic death involves molecular and biochemical events typical of both apoptosis and necrosis. It is initiated by nuclear fragmentation, intensive chromatin condensation, and the release of activated caspase-3, which are typical events in apoptosis, leading to other activities that are characteristic of necrotic cell death, including cytoplasmic swelling, permeabilization of the cell membrane, and loss of membrane integrity (Silva, 2010).

Our results regarding the mechanism of action associated with the cytotoxicity of Jurkat cells indicated that both extracts promoted depolarization of the mitochondrial membrane. Dorn (2013) observed that apoptosis-mediated cell death is ATP dependent and requires energy to maintain mitochondrial respiration; thus, the opening of pores in the outer mitochondrial membrane is controlled by pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, which bind to Bax and/or Bak molecules, in turn, contributing to the induction of apoptosis. In cells undergoing necrosis-induced death, the loss of $\Delta\Psi_{mit}$ is ATP independent, and the opening of pores in the mitochondrial membrane is not controlled by other proteins, leading to osmotic swelling of the mitochondrial matrix and, consequently, expansion and rupture of the outer mitochondrial membrane (Proskuryakov et al., 2003; Dorn, 2013).

The cell death observed in the present study was likely mediated by the intrinsic apoptotic pathway, which involves the loss of $\Delta\Psi_{mit}$. The opening of pores in the mitochondrial membrane releases pro-apoptotic molecules, such as cytochrome C, from the intermembrane space of mitochondria to the cytosol, resulting in the formation of a complex known as the apoptosome, together with apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1), procaspase 9, and ATP (Kim et al., 2003; Aguiar



et al., 2012). In this process, procaspase 9 is cleaved and becomes caspase-9, which, in turn, cleaves procaspase-3 into caspase-3 (Proskuryakov et al., 2003; Li and Yuan, 2008). The last enzyme is partially or fully responsible for the proteolytic cleavage of critical proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase (a DNA repair enzyme; Cohen, 1997) and the final stages of apoptosis (Sakulnarmrat et al., 2013).

To evaluate whether the extracts of the leaves and roots of *C. adamantium* promote the activation of caspases, protein expression of cleaved-caspases-8 and -9 were investigated by western blot and the monoclonal antibody anti-cleaved caspase-3 and a pan-caspase inhibitor were used. The activation of caspase-9 and -3 confirmed the involvement of the intrinsic pathway of

apoptosis in the cell death induced by both extracts. However, only the death of cells treated with AECL was reversed after incubation with the general caspase inhibitor.

Caspases are a family of aspartate-specific cysteine proteases present in the cell cytoplasm in an inactive form (known as procaspases) and are activated either by autoproteolysis induced by interaction with adapter proteins (death effector domains or caspase recruitment domains) or via cleavage by other proteases (Krysko et al., 2008). In addition to these mechanisms of action, calcium ions are involved in the death of Jurkat cells. Calcium is essential for the regulation of cell death in apoptosis by interacting with Bcl-2 family proteins such as Bax and Bid, which induce apoptosis via the mitochondrial pathway (Orrenius et al., 2015) and necrosis via intracellular Ca^{2+} overload, leading to loss of mitochondrial permeability (Lemasters et al., 1999; Festjens et al., 2006).

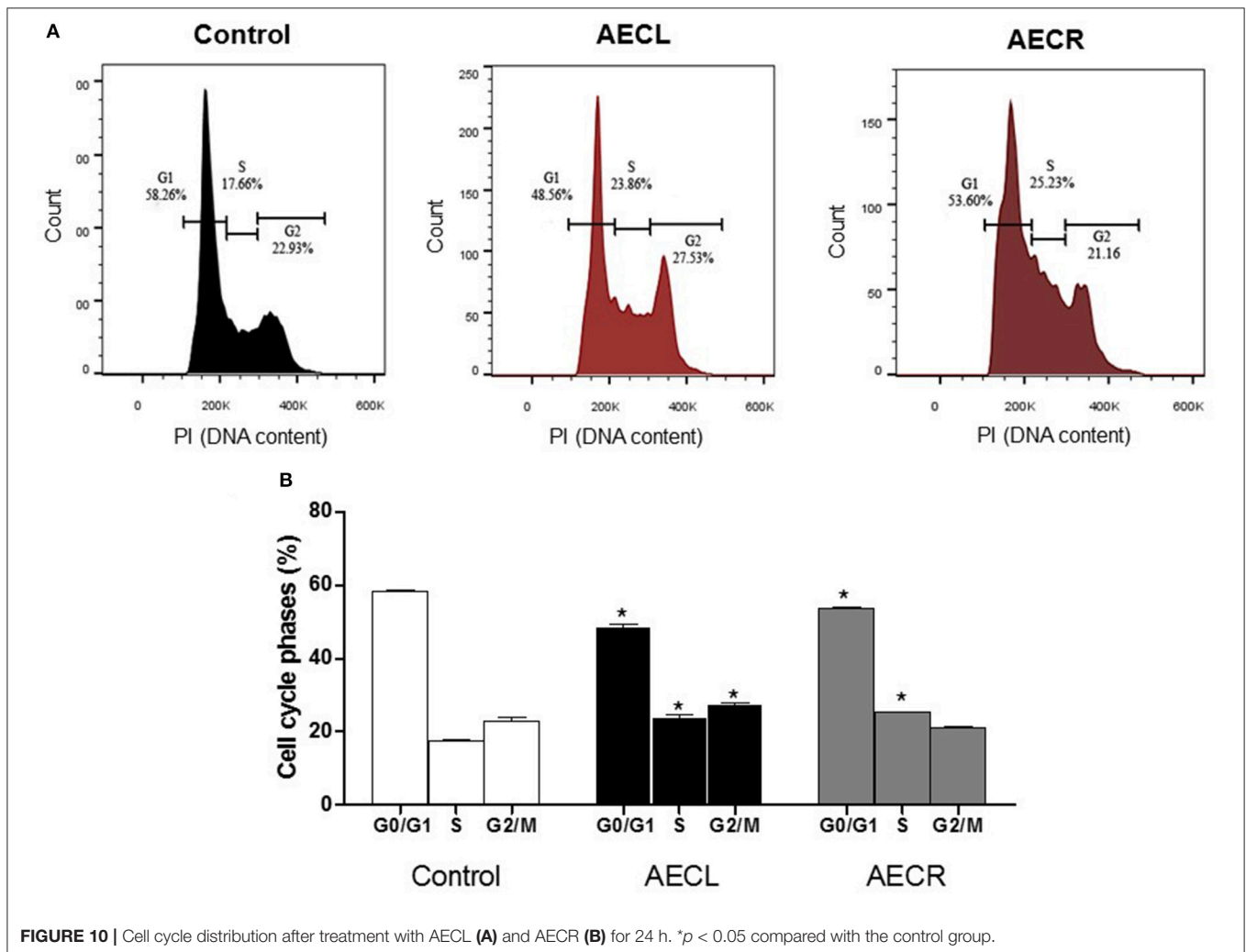
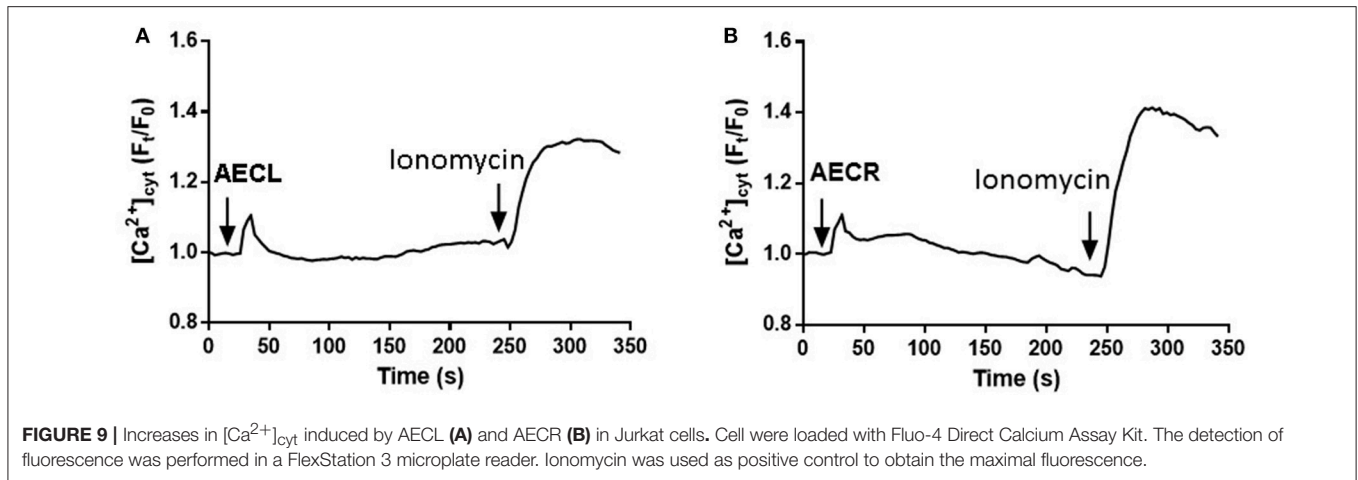
Calcium may activate Bax, which induces permeabilization of the mitochondrial membrane and release of mitochondrial pro-apoptotic factors, culminating in the activation of cell death effector caspases such as caspase-3 (Nutt et al., 2002), which is also activated by AECL and AECR.

The cytotoxic activity of *C. adamantium* extracts is associated with their chemical composition. Anticancer activities have been described for gallic and ellagic acid, both identified in AECL and AECR. The gallic acid triggers death in various cell lines via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways (Faried et al., 2007; Wang et al., 2014). Ellagic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells and is involved in the activation of caspase-3 (Hagiwara et al., 2010). In addition, this compound also induces changes on nuclear deoxyribonucleoside triphosphate (Saiko et al., 2015), and inhibits the proliferation of tumor cells by activating the TGF- β /Smad3 signaling pathway as well as proteins involved in cell proliferation and differentiation and by inducing cell cycle arrest (Zhang et al., 2014).

Cell cycle arrest is considered an effective strategy for eliminating cancer cells (Cho et al., 2011). The cell cycle is a complex process that involves interplay between several regulatory molecules, including cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) (Zhu et al., 2015). The irregular metabolism of tumor cells is associated with failure of this process, resulting in uncontrolled cell proliferation (Zhang et al., 2015). The extracts evaluated in this study decreased the number of cells in G0/G1 phase and increased the number in S phase of the cell cycle.

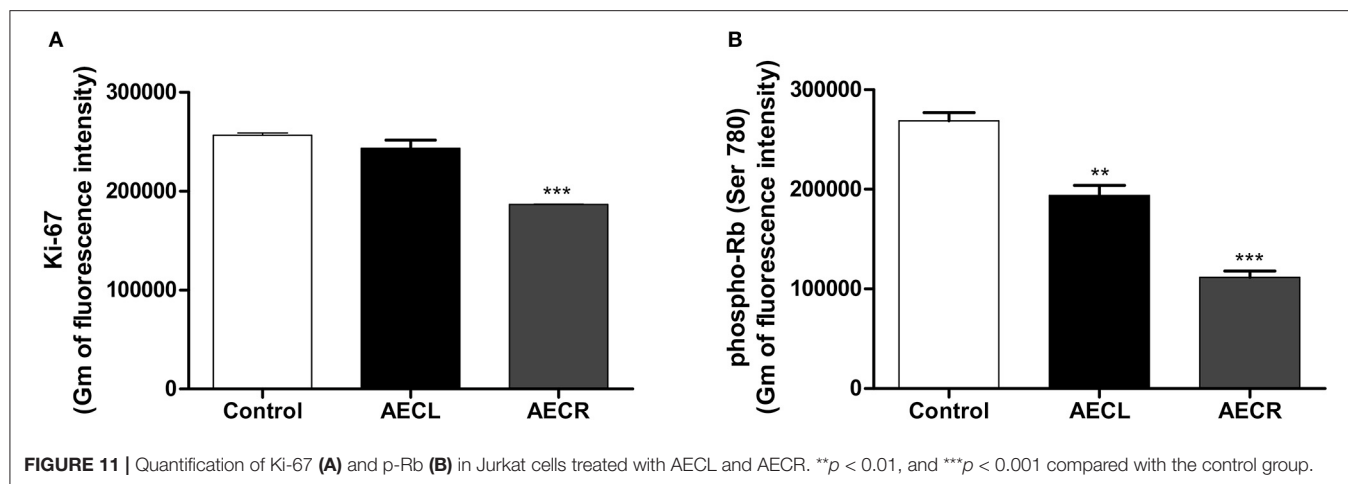
Additionally, AECR reduces Ki-67 and p-Rb protein levels, involved in the mechanisms of cell cycle proliferation and arrest, respectively, while AECL decreases only p-Rb levels. Ki-67 is a nuclear protein detected during the cell cycle and it is a marker of cell proliferation (Torquato et al., 2017). The retinoblastoma (Rb) protein, when phosphorylated by the cyclin-CDK complexes, induces the expression of transcriptional factors such as E2F, promoting the advancement of the cycle (Hamilton and Infante, 2016). Therefore, compounds that reduces proliferation and/or leads to death of cancer cells through different mechanisms are of paramount importance, particularly when they are effective in leukemic cell lines that are resistant to certain types of cell death.

From AECL, several glycosylated flavonols of quercetin and myricetin aglycones were detected, which could also be



related to the activity, since the inhibition on the growth of human promyelocytic leukemia cells were reported for quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (Kim et al., 2000). For the non-glycosylated flavonols quercetin, kaempferol and myricetin, the

proteasome-inhibition, and apoptosis-inducing activities have been reported in human tumor cells (Chen et al., 2005), as well as the structure-activity relationships of flavonoids for cytotoxicity on human leukemia cells (Plochmann et al., 2007). From this



study, the structural features for higher activity was determined, such as the carbon-carbon double bond on C ring, the carbonyl on C-4, the hydroxylation on B ring and other. Some of these features can be found in the flavonoids from *C. adamantium* extracts, but there are not wide studies from its glycosylated derivatives and also for the ellagic acid derivatives, mainly for leukemic cells.

Other studies also demonstrate the antileukemic potential of plant extracts, including mechanisms similar to those presented by extracts of *C. adamantium*, such as the reduction of mitochondrial membrane potential (Casagrande et al., 2014; Santos et al., 2016), increase Bax protein expression, activation of caspases-9 and -3, and cell cycle arrest (Asmaa et al., 2014; Fan et al., 2016). Furthermore, the AECL showed similar cytotoxicity to the crude extract of *Pereskia sacharosa* leaves (Asmaa et al., 2014), and higher than those obtained by extracts from leaves of *P. sacharosa* (Asmaa et al., 2014), *Jacaranda decurrens* (Casagrande et al., 2014), and *Hancornia speciosa* (Santos et al., 2016).

In conclusion, this study revealed for the first time that aqueous extracts of the leaves and roots of *C. adamantium* exert antileukemic activity via late apoptosis by decreasing the mitochondrial membrane potential, increasing the activation of caspase-9 and 3, and intracellular calcium levels. Hence, these extracts show therapeutic potential for use in the prevention and

treatment of diseases associated the proliferation of tumor cell. Besides, the extensive chemical identification of the constituents from AECL and AECR were determined, demonstrating huge chemical differences between the extracts that can explain the biological properties.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JC, PE, HT, WV, GJ, DS, CC, KdP, EdS, and Ed contributed to the literature database search, data collection, data extraction, data analysis, and writing of the manuscript. JC, DS, CC, Kd, EP, and Ed performed data analysis and rationalization of the results. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants of the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal - INPP, and Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa – Fadesp.

REFERENCES

- Aguiar, J. S., Araújo, O. R., Rodrigues, M. D., Sena, K. X. F. R., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., et al. (2012). Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4124–4140. doi: 10.3390/ijms13044124
- Asmaa, M. J. S., Al-jamal, H. A. N., Ang, C. Y., Asan, J. M., Seeni, A., and Johan, M. F. (2014). Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 475–481. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.1.475
- Bai, N., He, K., Roller, M., Zheng, B., Chen, X., Shao, Z., et al. (2008). Active compounds from *Lagerstroemia speciosa*, insulin-like glucose uptake-stimulatory/inhibitory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11668–11674. doi: 10.1021/jf802152z
- Bechara, A., Barbosa, C. M. V., Paredes-Gamero, E. J., Garcia, D. M., Silva, L. S., Matsuo, A. L., et al. (2014). Palladacycle (BPC) antitumor activity against resistant and metastatic cell lines: the relationship with cytosolic calcium mobilisation and cathepsin B activity. *Eur. J. Med. Chem.* 79, 24–33. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.03.073
- Campos, J. F., Castro, D. T. H., Damião, M. J., Torquato, H. F. V., Paredes-Gamero, E. J., Carollo, C. A., et al. (2016). The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 1–12. doi: 10.1155/2016/8405957

- Cardoso, C. A. L., Salmazzo, G. R., Honda, N. K., Prates, C. B., Vieira, M. C., and Coelho, R. G. (2010). Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). *J. Med. Food* 13, 1273–1276. doi: 10.1089/jmf.2009.0047
- Casagrande, J. C., Macorini, L. F., Antunes, K. A., Santos, U. P., Campos, J. F., Dias-Júnior, N. M., et al. (2014). Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. *PLoS ONE* 9:e112748. doi: 10.1371/journal.pone.0112748
- Chen, D., Daniel, K. G., Chen, M. S., Kuhn, D. J., Landis-Piwowar, K. R., and Dou, K. P. (2005). Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1421–1432. doi:10.1016/j.bcp.2005.02.022
- Cho, J., Lee, J., Yang, Y., Kim, J., Ahn, J., Baek, N., et al. (2011). Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1737–1744. doi: 10.1016/j.fct.2011.04.019
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1–16.
- Coutinho, I. D., Cardoso, C. A. L., Ré-Poppi, N., Melo, A. M., Vieira, M. C., Honda, N. K., et al. (2009). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Braz. J. Pharm. Sci.* 45, 767–776. doi: 10.1590/S1984-825020090004000022
- Coutinho, I. D., Coelho, R. G., Kataoka, V. M. F., Honda, N. K., Silva, J. R. M., Vilegas, W., et al. (2008). Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Eclat. Quím.* 33, 53–60. doi: 10.1590/S0100-46702008000400007
- Coutinho, I. D., Kataoka, V. M. F., Honda, N. K., Coelho, R. G., Vieira, M. C., and Cardoso, C. A. L. (2010). The Influence of seasonal variation in levels of flavonoids and antioxidant activity of the leaves of *Campomanesia adamantium*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 322–327. doi: 10.1590/S0102-695X2010000300006.
- Dorn, G. W. (2013). Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicol. Pathol.* 41, 227–234. doi: 10.1177/0192623312466961
- Espindola, P. T., Rocha, P. S., Carollo, C. A., Schimitz, W. O., Pereira, Z. V., Vieira, M. C., et al. (2016). Antioxidant and anti-hyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 1–8. doi: 10.1155/2016/7910340
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E., and Quetin-leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion tap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 707–715. doi: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4
- Fan, Y., Lu, H., An, L., Wang, C., Zhou, Z., Feng, F., et al. (2016). Effect of active fraction of *Eriocaulon sieboldianum* on human leukemia K562 cells via proliferation inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 43, 13–20. doi: 10.1016/j.etap.2015.11.001
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., et al. (2007). Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 30, 605–613. doi: 10.3892/ijo.30.3.605
- Ferreira, L. C., Grabe-Guimarães, A., Paula, C. A., Michel, M. C. P., Guimarães, R. G., Rezende, S. A., et al. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J. Ethnopharmacol.* 145, 100–108. doi: 10.1016/j.jep.2012.10.037
- Ferreres, F., Grosso, C., Gil-Ízquierdo, A., Valentão, P., and Andrade, P. B. (2013). Ellagic acid and derivatives from *Cochlospermum angolensis* Welw. extracts: HPLC-DAD-ESI/MSn profiling, quantification and *in vitro* anti-depressant, anti-cholinesterase and anti-oxidant activities. *Phytochem. Anal.* 24, 534–540. doi: 10.1002/pca.2429
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenamee, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1371–1387. doi:10.1016/j.bbabi.2006.06.014
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Zhang, Z., Beecher, G., Holden, J., et al. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J. Mass Spectrom.* 38, 1272–1280. doi:10.1002/jms.541
- Guarati, T., Armelini, A. I. P. V., Ferrari, C. R., Schefer, R. R., Placeres Neto, A., Navas, R., et al. (2014). Application of matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight LIFT for identification of cocoa condensed tannins. *J. Mass Spectrom.* 49, 251–255. doi: 10.1002/jms.3333
- Hagiwara, Y., Kasukabe, T., Kaneko, Y., Niitsu, N., and Okabe-Kado, J. (2010). Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Int. J. Hematol.* 92, 136–143. doi: 10.1007/s12185-010-0627-4
- Hamilton, E., and Infante, J. R. (2016). Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treat. Rev.* 45, 129–138. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.03.002
- Kim, J., He, L., and Lemasters, J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 463–470. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00618-1
- Kim, S. Y., Gao, J. J., and Kang, H. K. (2000). Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 451–455. doi: 10.1248/bpb.23.451
- Kinghorn, A. D. (2015). Review of anticancer agents from natural products. *J. Nat. Prod.* 78, 2315–2315. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00617
- Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., and Vandenamee, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44, 205–221. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001
- Lemasters, J. J., Qian, T., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Cascio, W. E., Trost, L. C., et al. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 305–319.
- Leon, C. M., Barbosa, C. M., Justo, G. Z., Borelli, P., Resende, J. D. Jr., de Oliveira, J. S., et al. (2011). Requirement for PLC γ 2 in IL-3 and GM-CSF-stimulated MEK/ERK phosphorylation in murine and human hematopoietic stem/progenitor cells. *J. Cell Physiol.* 226, 1780–1792. doi: 10.1002/jcp.22507
- Lescano, C. H., Oliveira, I. P., Zaminelli, T., Baldivia, D. S., Silva, L. R., Napolitano, M., et al. (2016). *Campomanesia adamantium* peel extract in anti-diarrheal activity: the ability of inhibition of heat-stable enterotoxin by polyphenols. *PLoS ONE* 11:e0165208. doi: 10.1371/journal.pone.0165208
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194–6206. doi: 10.1038/onc.2008.297
- March, R. E., Lewars, E. G., Stacey, C. L., Miao, X., Zhao, X., and Metcalfe, C. D. (2006). A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 248, 61–85. doi: 10.1016/j.ijms.2005.09.011
- Markham, K. R. (1982). *Techniques of Flavonoids Identification*. New York, NY: Academic Press Inc. (London) LTD.
- Moraes, V. W. R., Caires, A. C. F., Paredes-Gamero, E. J., and Rodrigues, T. (2013). Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death Dis.* 4, 1–8. doi: 10.1038/cddis.2013.190
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
- Nocchi, S. R., Companhoni, M. V. P., Mello, J. C. P., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Carollo, C. A., et al. (2017). Antiviral activity of crude hydroethanolic extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. *Planta Med.* 83, 509–518. doi: 10.1055/s-0042-117774
- Nutt, L. K., Chandra, J., Pataer, A., Fang, B., Roth, J. A., Swisher, S. G., et al. (2002). Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome C release during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 20301–20308. doi: 10.1074/jbc.M201604200
- Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 72–81. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.137
- Paredes-Gamero, E. J., Martins, M. N. C., Cappabianco, F. A. M., Ide, J. S., and Miranda, A. (2012). Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1062–1072. doi:10.1016/j.bbagen.2012.02.015
- Pascoal, A. C. R. F., Ehrenfried, C. A., Eberlin, M. N., Stefanello, M. E. A., and Salvador, M. J. (2011). Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. *Nat. Prod. Commun.* 6, 969–972.
- Pascoal, A. C. R. F., Ehrenfried, C. A., Lopez, B. G., Araujo, T. M., Pascoal, V. D. B., Gilioli, R., et al. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules* 19, 1843–1855. doi: 10.3390/molecules19021843

- Patel, V. A., Longacre, A., Hsiao, K., Fan, H., Meng, F., Mitchell, J. E., et al. (2006). Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: implications for the delayed clearance model of autoimmunity. *J. Biol. Chem.* 281, 4663–4670. doi: 10.1074/jbc.M508342200
- Pavan, F. R., Leite, C. Q. F., Coelho, R. G., Coutinho, I. D., Honda, N. K., Cardoso, C. A. L., et al. (2009). Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quím. Nova.* 32, 1222–1226. doi: 10.1590/S0100-40422009000500026
- Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., et al. (2007). Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 460, 1–9. doi: 10.1016/j.abb.2007.02.003
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., and Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283, 1–16. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00027-7
- Saiko, P., Steinmann, M. T., Schuster, H., Graser, G., Bressler, S., Giessrig, B., et al. (2015). Epigallocatechin gallate, ellagic acid, and rosmarinic acid perturb dNTP pools and inhibit *de novo* DNA synthesis and proliferation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells: synergism with arabinofuranosylcytosine. *Phytomedicine* 22, 213–222. doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.017
- Sakulnarmrat, K., Fenech, M., Thomas, P., and Konczak, I. (2013). Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. *Food Chem.* 136, 9–17. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.089
- Santos, U. P., Campos, J. F., Torquato, H. F., Paredes-Gamero, E. J., Carollo, C. A., Estevinho, L. M., et al. (2016). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS ONE* 11:e0167531. doi: 10.1371/journal.pone.0167531
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett.* 584, 4491–4499. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.046
- Souza, J. C., Piccinelli, A. C., Aquino, D. F. S., Souza, V. V., Schmitz, W. O., Traesel, G. K., et al. (2017). Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. *Nutr. Neurosci.* 20, 23–31. doi: 10.1179/1476830514Y.0000000145
- Torquato, H. F. V., Ribeiro-Filho, A. C., Buri, M. V., Júnior, R. T. A., Pimenta, R., Oliveira, J. S. R., et al. (2017). Canthin-6-one induces cell death, cell cycle arrest and differentiation in human myeloid leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 958–967. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.01.033
- Vieira, M. C., Perez, V. B., Heredia, Z. N. A., Santos, M. C., Peloso, I. A. O., and Pessoa, S. M. (2011). Effect of nitrogen and phosphorus supply on initial development of guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivated in pots. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13, 542–549. doi: 10.1590/S1516-05722011000500007
- Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Zhu, L., and Zhou, F. (2014). Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 28, 387–393. doi: 10.1002/jbt.21575
- Yan, H., Hu, W., Zhang, J., Wang, Y., Xia, K., Peng, M., et al. (2014). Resveratrol induces human K562 cell apoptosis, erythroid differentiation, and autophagy. *Tumor Biol.* 35, 5381–5388. doi: 10.1007/s13277-014-1701-y
- Zhang, C., Zhang, J., Li, X., Sun, N., Yu, R., Zhao, B., et al. (2015). Huaier aqueous extract induces hepatocellular carcinoma cells arrest in S phase via JNK signaling pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 1–11. doi: 10.1155/2015/171356
- Zhang, L., Tu, Z. C., Xie, X., Lu, Y., Wang, Z. X., Wang, H., et al. (2016). Antihyperglycemic, antioxidant activities of two *Acer palmatum* cultivars, and identification of phenolics profile by UPLC-QTOF-MS/MS: new natural sources of functional constituents. *Ind. Crops Prod.* 89, 522–532. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.06.005
- Zhang, T., Chen, H., Wang, L., Bai, M., Wang, Y., Jiang, X., et al. (2014). Ellagic acid exerts anti-proliferation effects via modulation of TGF- β /Smad3 signaling in MCF-7 breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 273–276. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.1.273
- Zhang, Y. K., Xu, J. K., Zhang, X. Q., Yao, X. S., and Ye, W. C. (2008). Chemical constituents with antibacterial activity from *Euphorbia sororia*. *Nat. Prod. Res.* 22, 353–359. doi: 10.1080/14786410701838114
- Zhu, D., Xue, W., Tao, W., and Li, J. (2015). Biological effects of ray cartilage extract on human breast cancer cell line MCF-7 and its mechanism. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 7425–7429.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Campos, Espindola, Torquato, Vital, Justo, Silva, Carollo, de Picoli Souza, Paredes-Gamero and dos Santos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6 CONCLUSÃO

As espécies nativas do Cerrado, *Senna velutina* e *Campomanesia adamantium*, apresentam dentre seus constituintes químicos os compostos fenólicos, tais como flavonoides e ácidos fenólicos, os quais são descritos na literatura por suas propriedades terapêuticas. Neste estudo comprovamos a ação antioxidante do extrato de folhas de *S. velutina*, que atua pela captura direta de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos. Adicionalmente, os extratos de folhas de *S. velutina* e folhas e raízes de *C. adamantium* apresentam atividade citotóxica contra linhagens de células leucêmicas. Como mecanismos de ação citotóxica, a predominância de morte celular foi por apoptose tardia via redução do potencial da membrana celular, ativação de caspase-3 e cálcio intracelular, além de promoverem parada do ciclo celular. Neste contexto, este estudo demonstra que ambas as espécies vegetais apresentam potencial terapêutico para uso na prevenção e tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo e/ou à proliferação de células leucêmicas.