



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**FERNANDA VIDAL CARVALHO**

**PERFIL METABOLÔMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Lepidium  
meyenii***

**SALVADOR  
2020**

**FERNANDA VIDAL CARVALHO**

**PERFIL METABOLÔMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Lepidium  
meyenii***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

**SALVADOR  
2020**

FERNANDA VIDAL CARVALHO

PERFIL METABOLÔMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E  
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Lepidium meyenii*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico  
de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia  
Molecular da Universidade Federal da Bahia como  
requisito para a obtenção do título de Mestre.

Salvador, 04 de Junho de 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus (Orientador)  
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana  
Universidade Estadual de Campinas



Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Costa Lima  
Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

Para o êxito desse trabalho foi necessário contar com ajuda de muitas pessoas as quais não poderia deixar de agradecer nesse momento.

Aos meus pais e irmã pelo suporte, apoio e amor incondicional e todos os queridos amigos que tornaram essa trajetória mais leve.

Ao Prof. Paulo Ribeiro pela condução desse trabalho de forma impecável, pela dedicação e presença em todos os momentos e por todo incentivo ao longo dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Victor Diógenes e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Costa pela parceria junto ao Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) que abrilhantou o nosso trabalho. E em especial ao Prof. Victor pelas orientações, paciência e cuidado.

À toda equipe do LabNq pelo suporte, troca de conhecimentos e experiências.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo e colaboradores pela parceria junto ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) que possibilitou a realização das técnicas de cromatografia, que foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho.

CARVALHO, Fernanda Vidal. Perfil metabolômico e atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de extratos de *Lepidium meyenii*. 84 f. il. Dissertação (Mestrado em bioquímica e biologia molecular) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** *Lepidium meyenii* é uma planta que apresenta diversas propriedades medicinais, no entanto, há poucos estudos que correlacionem os metabólitos e as atividades biológicas testadas na planta sob uma perspectiva metabolômica. **OBJETIVO:** Caracterizar o perfil metabolômico, bem como avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de extratos obtidos da planta desidratada e de seus produtos comerciais. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os extratos foram obtidos a partir da raiz da planta e de seus produtos comerciais por maceração em diferentes solventes orgânicos. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e os fenóis totais foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a bactérias e leveduras através do método de microdiluição em caldo. A citotoxicidade foi avaliada contra a linhagem de células C6 e astrócitos. O perfil metabolômico foi avaliado por cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) variou de  $64,97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato em acetato de etila da raiz da planta desidratada até  $935,61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato em hexano do produto comercial da planta. Os valores de fenóis totais variaram de  $6,83 \text{ mg}\cdot\text{EAG}\cdot\text{g}^{-1}$  para o extrato etanólico a  $49,83 \text{ mg}\cdot\text{EAG}\cdot\text{g}^{-1}$  para o extrato acetato de etila, ambos os extratos são dos produtos comerciais. Os extratos etanólicos e em acetato de etila foram os mais ativos e apresentaram maior potencial antioxidante, além disso também apresentaram atividade antimicrobiana contra *M. luteus* e *B. cereus* e atividade antitumoral contra células C6, não apresentando citotoxicidade aos astrócitos. Foram identificados setenta e seis metabólitos nos extratos e dentre esses, os terpenos foram os principais metabólitos candidatos responsáveis pelas atividades antioxidante e citotóxica e os ácidos graxos pela atividade antibacteriana. **CONCLUSÃO:** A abordagem metabolômica e a análise estatística multivariada permitiram correlacionar os resultados das atividades biológicas testadas com o perfil químico dos extratos, sendo possível identificar os principais compostos bioativos da *L. meyenii* relacionados às atividades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral da planta.

**Palavras-chave:** Maca peruana. Metabolômica. Produtos naturais.

CARVALHO, Fernanda Vidal. Metabolite profiling, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of *Lepidium meyenii*. 84 f. il Dissertation (Master in Biochemistry and Molecular Biology) - Federal University of Bahia, Salvador, 2020.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Lepidium meyenii* is a plant that has several medicinal properties, however, the correlation between the metabolites and the biological activities tested in the plant is limited. **OBJECTIVE:** To characterize the metabolomic profile as well as to evaluate the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of extracts obtained from the dehydrated plant and its commercial products and to correlate the metabolomic profile with biological activities. **MATERIALS AND METHODS:** The extracts were obtained from the root of the plant and its commercial products by maceration in different organic solvents. The metabolomic profile was evaluated by mass performance coupled high chromatography (HPLC-MS) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant activity was determined by the free radical sequestration method 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and total phenols will be quantified by the Folin-Ciocalteu method. Antimicrobial activity was evaluated against bacteria and yeast by broth microdilution method, cytotoxicity was evaluated against C6 cell line and astrocytes. **RESULTS AND DISCUSSION:** The antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) ranged from  $64.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for the ethyl acetate extract from the root of the dehydrated plant to  $935.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for the hexane extract of the plant commercial product. The total phenol values ranged from  $6.83 \text{ mg}\cdot\text{GAE}\cdot\text{g}^{-1}$  for the ethanol extract at  $49.83 \text{ mg}\cdot\text{GAE}\cdot\text{g}^{-1}$  for the ethyl acetate extract, both extracts are form the commercial products. The ethanol extracts and ethyl acetate were the most active and had the highest antioxidant potential, in addition they also showed antimicrobial activity against *M. luteus* and *B. cereus* and antitumor activity against C6 cells, with no cytotoxicity to astrocytes. Seventy-six metabolites were identified in the extracts and among these, terpenes were the main metabolites responsible for antioxidant and cytotoxic activities and fatty acids for antibacterial activity. **CONCLUSION:** The metabolomic approach through the several analytical techniques allowed to correlate the obtained results being possible to identify the main bioactive compounds of *L. meyenii* related to the antioxidant, antimicrobial and antitumor activities of the plant.

**Keywords:** Peruvian Maca. Metabolomics. Natural Products.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Três variações de cores da raiz da <i>L. meyenii</i> (adaptado de Esparza et al., 2015)....	17
<b>Figura 2.</b> Obtenção dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais.....	31
<b>Figura 3.</b> Atividade antioxidante dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais (IC <sub>50</sub> ).....	41
<b>Figura 4.</b> Quantificação de fenóis totais dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais.....	42
<b>Figura 5.</b> Viabilidade de células C6 mensurada pelo teste do MTT após 24h de exposição a extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais (100 µg·mL <sup>-1</sup> ).....	43
<b>Figura 6.</b> Viabilidade de células C6 mensurada pelo teste do MTT após 24h de exposição a extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais (1,10 e 100 µg·mL <sup>-1</sup> ).....	44
<b>Figura 7.</b> Viabilidade de astrócitos mensurada pelo teste do MTT após 24h de exposição a extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais (1,10 e 100 µg·mL <sup>-1</sup> ).....	45
<b>Figura 8.</b> Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 tratadas com os extratos PC1AE e PC1E2 da <i>L. meyenii</i> (100 µg·mL <sup>-1</sup> ) e células C6 não tratadas (DMSO 100 µg·mL <sup>-1</sup> ) após um período de 24 horas.....	46
<b>Figura 9.</b> Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de astrócitos tratados com os extratos PC1AE e PC1H da <i>L. meyenii</i> (100 µg·mL <sup>-1</sup> ) e astrócitos não tratados (DMSO 100 µg·mL <sup>-1</sup> ) após um período de 24 horas.....	47
<b>Figura 10.</b> Análise de componentes principais (PCA) a partir dos metabólitos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais, identificados da através da CLAE-EM e GC-EM.....	54
<b>Figura 11.</b> Agrupamento hierárquico representado em heatmap demonstrando os metabólitos da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais, em maior concentração em cada extrato e os agrupamentos formados entre os extratos .....	56
<b>Figura 12.</b> Correlação entre a atividade antioxidante e os metabólitos dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais.....	57
<b>Figura 13.</b> Correlação entre a atividade citotóxica contra células C6 e os metabólitos dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais .....	58
<b>Figura 14.</b> Correlação entre a atividade antimicrobiana frente ao <i>B. cereus</i> e ao <i>M. luteus</i> e os metabólitos dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais .....	59
<b>Figura 15.</b> Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 tratadas com os extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e de seus produtos comerciais (100µg·mL <sup>-1</sup> ) e células C6 não tratadas (DMSO 100 µg·mL <sup>-1</sup> ) após um período de 24 horas.....	81

**Figura 16.** Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de astrócitos tratados com os extratos da raiz da *L. meyenii* e de seus produtos comerciais ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e astrócitos não tratados (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) após um período de 24 horas ..... 82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição nutricional da raiz da <i>L. meyenii</i> desidratada.....	19
<b>Tabela 2.</b> Extratos obtidos por cada amostra e suas respectivas siglas .....	32
<b>Tabela 3.</b> Diluição seriada para o preparo das soluções nas concentrações de uso.....	35
<b>Tabela 4.</b> Atividade antibacteriana dos extratos da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais.....	48
<b>Tabela 5.</b> Metabólitos identificados por CLAE-EM da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais.....	49
<b>Tabela 6.</b> Metabólitos identificados por CG-EM da raiz da <i>L. meyenii</i> e seus produtos comerciais.....	52

## LISTA DE SIGLAS

ABTS	(2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CK	Creatina quinase
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CMI	Concentração inibitória mínima
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH- Px	Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção da serotonina
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
OH	Radical hidroxila
SDS	Duodecil sulfato de sódio

SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TLRs	Receptores toll-like
TNF - $\alpha$ -	Fator de necrose tumoral
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
LabNq	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 PLANTAS MEDICINAIS</b> .....	16
<b>2.2 MACA PERUANA (<i>Lepidium Meyenii</i>)</b> .....	17
<b>2.2.1 Descrição botânica, cultivo e morfologia</b> .....	17
<b>2.2.2 Uso tradicional</b> .....	18
<b>2.2.3 Aspectos econômicos</b> .....	18
<b>2.2.4 Composição nutricional da <i>L. meyenii</i></b> .....	18
<b>2.2.5 Perfil fitoquímico</b> .....	19
<b>2.2.6 Atividades biológicas</b> .....	19
<b>Atividade antioxidante</b> .....	19
<b>Atividade citoprotetora</b> .....	20
<b>Atividade imunomodulatória</b> .....	21
<b>Atividade anti-fadiga</b> .....	22
<b>Proteção contra radiação ultravioleta</b> .....	24
<b>2.3 PERFIL METABOLÔMICO DE PLANTAS</b> .....	24
<b>2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	26
<b>2.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA</b> .....	27
<b>2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>Objetivo Geral</b> .....	30
<b>Objetivos Específicos</b> .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS</b> .....	31
<b>4.2 ENSAIO ANTIOXIDANTE DPPH</b> .....	32
<b>4.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS</b> .....	32
<b>4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA</b> .....	33
<b>4.4.1 Cultura de células de glioma murino (C6)</b> .....	33
<b>4.4.2 Cultura primária de astrócitos</b> .....	34

4.4.3 Tratamento das células com os extratos .....	35
4.4.4 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT .....	35
4.4.5 Microscopia de contraste de fase .....	36
4.4.6 Análises estatísticas .....	36
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	36
4.6 PERFIL METABOLÔMICO .....	37
4.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) .....	37
Processamento de dados da CLAE-EM .....	37
Identificação dos compostos a partir da CLAE-EM .....	38
4.6.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) .....	38
Processamento de dados e identificação dos compostos a partir da CG-EM .....	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA .....	39
5 RESULTADOS .....	40
5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS .....	40
5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA .....	42
5.2.1 Avaliação da morfologia celular e celularidade após tratamento com os extratos .....	45
5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	47
5.4 PERFIL METABOLÔMICO .....	48
6 DISCUSSÃO .....	60
7 CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS .....	69
APÊNDICE A- Artigo publicado .....	80
APÊNDICE B- Figuras suplementares .....	81
ANEXO A- Certificado da CEUA .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

Plantas são utilizadas pela medicina tradicional para tratar e prevenir doenças e em algumas comunidades as plantas representam o principal meio de tratamento de enfermidades (RUMMUN et al., 2018; DALAR et al., 2018; SILAMBARASAN et al., 2017). As plantas sintetizam compostos bioativos que são responsáveis por diversas atividades farmacológicas, tais como as atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana (KASOTE et al., 2015; MONTESANO et al., 2018; DEBNATH et al., 2018).

A maca peruana (*Lepidium meyenii*), planta tradicionalmente encontrada na região andina do Peru, tem sido amplamente comercializada em cápsulas e em pó devido ao seu potencial medicinal, uma vez que possui diversas atividades farmacológicas. Destacam-se a capacidade de melhorar a espermatogênese (INOUE, 2016; GONZALES, 2006; GONZALES et al., 2004), a fertilidade feminina (D'ARRIGO, 2004; RUIZ-LUNA, 2005), a performance sexual (DORDING, 2008; CICERO, 2001; ZENICO, 2008), o risco de osteoporose (GONZALES, 2010; ZHANG, 2006), o processo de aprendizado e memória (RUBIO, 2006; RUBIO, 2011), a proteção contra radiação UV (GONZALES-CASTAÑEDA, 2008; GONZALES-CASTAÑEDA, 2011), o efeito anti-fadiga (YANG, 2015; LI, 2016; TANG, 2017), o efeito hepatoprotetor (ZHANG et al., 2017b) e atividades antioxidante (YANG et al., 2015) e imunomodulatória (LI et al., 2017).

São poucas as informações sobre os possíveis metabólitos responsáveis por essas atividades, uma vez que a maioria dos estudos avaliam as atividades farmacológicas a partir de extratos da planta sem lançar mão de técnicas para quantificar ou isolar os metabólitos presentes nos extratos. Os principais fitoquímicos encontrados na maca peruana são glucosinolatos e isotiocianatos, macaene e macamidas, alcaloides, (tio) hidantoínas, flavonóis, fitoesteróis, polissacarídeos e ácidos graxos (CARVALHO; RIBEIRO, 2019b; HUANG; PENG; QIU, 2018; LI; AMMERMANN; QUIRÓS, 2001).

Foram identificados mais de cem metabólitos da raiz e das folhas da maca peruana, no entanto apenas 10% desses metabólitos foram correlacionados a atividades farmacológicas (CARVALHO; RIBEIRO, 2019a). Portanto o objetivo desse trabalho é avaliar atividades farmacológicas de extratos da maca peruana e identificar o perfil metabolômico associado a cada atividade testada através de técnicas de análise multivariadas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional é baseada no conhecimento e nas crenças sobre ervas medicinais, terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios para manter o bem-estar e tratar ou prevenir doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). As plantas são, historicamente, usadas por populações que têm dificuldade em acessar tratamentos de medicina moderna. Estas são geralmente populações economicamente vulneráveis e isoladas de grandes cidades ou centros urbanos, localizadas em aldeias, províncias, quilombos, ilhas e tribos (DALAR et al., 2018; RUMMUN et al., 2018). O uso de plantas na medicina tradicional para essas populações é fundamental para a manutenção da vida dos indivíduos e para garantir cuidados básicos de saúde (SILAMBARASAN et al., 2017).

As plantas apresentam benefícios terapêuticos, pois sintetizam compostos bioativos, responsáveis por diversas atividades farmacológicas. Alguns dos principais compostos bioativos produzidos pelas plantas são alcalóides, compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas, estilbenos e taninos), esteroides, glicosídeos, taninos, terpenóides e fitoalexinas (ALTEMIMI et al., 2017; DEBNATH et al., 2018; XIAO; BAI, 2019). Algumas atividades farmacológicas desses compostos bioativos são as atividades antioxidantes de compostos fenólicos (KASOTE et al., 2015), anti-inflamatórios e antimicrobianas de alcalóides (DEBNATH et al., 2018), citotóxicas (MONTESANO et al., 2018) e imunomoduladores (SARIKAHYA et al., 2018) de terpenóides.

Devido ao potencial farmacológico das plantas, a produção de produtos fitoterápicos pela indústria tem crescido significativamente. Além disso, a resistência a agentes químicos por bactérias patogênicas, parasitas, vírus e fungos dificulta o tratamento de algumas doenças e é responsável pelo aumento da demanda por novos produtos fitoterápicos no campo farmacêutico (FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014). Drogas produzidas a partir de produtos sintéticos podem ter efeitos colaterais, até fatais, como é o caso do tratamento de doenças do fígado. Por essa razão, uma parte considerável dos compostos usados no tratamento de doenças hepáticas é originada atualmente de produtos naturais (LATIEF; AHMAD, 2018; ZHANG; SUN; WANG, 2013). Portanto, os produtos medicinais são fontes potenciais de novas drogas, além disso, vários fitoterápicos já foram patenteados, como comprimidos de folhas de *Ginkgo biloba*, que têm efeito antioxidante, e Liuwei Dihuang, uma fórmula medicinal composta por seis plantas chinesas que auxilia o processo de memória e aprendizagem (SANGHA et al., 2012; ZHAO et al., 2018). Nesse contexto, o campo de produtos naturais tem crescido e novas atividades farmacológicas

de diversas plantas vêm sendo estudadas, aumentando assim a possibilidade de produção de fármacos (WANG et al., 2017).

## 2.2 MACA PERUANA (*Lepidium Meyenii*)

### 2.2.1 Descrição botânica, cultivo e morfologia

*Lepidium L.* é um gênero pertencente à família Brassicaceae que inclui 250 espécies, sendo uma delas a *Lepidium meyenii*, popularmente conhecida como maca peruana (GONZALES; ALARCÓN-YAQUETTO, 2018). A maca peruana é normalmente encontrada nos Andes peruanos, uma região que apresenta condições climáticas e ambientais específicas, como altas altitudes, baixas temperaturas e umidade, ventos intensos, chuva, luz solar, baixa pressão e alta radiação UV (GONZALES; GONZALES; GONZALES-CASTAÑEDA, 2009). Além disso, a maca é tradicionalmente cultivada sem produtos sintéticos para o controle de pragas e os meses de cultivo são geralmente novembro e dezembro e a colheita ocorre em junho e julho, e depois disso, as raízes da maca são secas naturalmente (GONZALES; ALARCÓN-YAQUETTO, 2018).

A maca peruana é uma planta bienal e é basicamente dividida em duas partes, aérea e subterrânea. A região aérea é composta por uma coroa de 12 a 20 folhas (GONZALES; GONZALES; GONZALES-CASTAÑEDA, 2009; MARÍN-BRAVO, 2003; VALENTOVÁ; J., 2003). Na área subterrânea encontra-se a parte comestível, a raiz (tubérculo/ hipocótilo), que se assemelha a um tubérculo e armazena grande quantidade de água (GONZALES; GONZALES; GONZALES-CASTAÑEDA, 2009; MARÍN-BRAVO, 2003). Existem diferentes fenótipos de maca, classificados pela cor da raiz/hipocótilo. Treze cores distintas já foram descritas. Os tipos mais comumente encontrados e utilizados são a maca amarela, vermelha e preta (Figura 1) (GONZALES; GONZALES; GONZALES-CASTAÑEDA, 2009; MEISSNER et al., 2016).

**Figura 1.** Três variações de cores da raiz da *L. meyenii* (adaptado de Esparza et al., 2015)



### 2.2.2 Uso tradicional

A raiz da maca é tradicionalmente usada em preparações líquidas como sucos, mas antes do consumo as raízes são cozidas para torná-las mais macias (GONZALES, 2010, 2012) e segundo a crença popular, a maca possui propriedades afrodisíacas e seu uso está relacionado à melhora desempenho sexual e fertilidade feminina. Durante o império Inca, havia uma lenda de que guerreiros eram alimentados com maca para aumentar sua energia e vitalidade, e no final das guerras os soldados eram proibidos de consumir a planta para proteger as mulheres de seus impulsos sexuais (HERMANN; HELLER, 1997). A maca também foi amplamente utilizada em animais para auxiliar na reprodução de porcos, galinhas e cavalos (GONZALES et al., 2014; HERMANN; HELLER, 1997). Seu uso também já foi relacionado à melhora do quadro de reumatismo, doenças respiratórias e ao efeito laxante (HERMANN; HELLER, 1997).

Além disso, a maca também era tradicionalmente usada em bebidas alucinógenas em danças e cerimônias religiosas, e os nativos costumavam usar maca para enriquecer nutricionalmente os alimentos consumidos, pois a planta possui na sua composição diversos nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídios, minerais e fibras, sendo a composição nutricional semelhante a do arroz, trigo e milho (HERMANN, 1997, FAO, 1994).

### 2.2.3 Aspectos econômicos

Por um período a maca peruana estava em risco de extinção, mas a venda de produtos à base de plantas que prometiam melhorar o desempenho sexual mudou esse cenário, por proporcionar aumento do cultivo da maca, fortalecendo o comércio da planta até mesmo para outros países. O cultivo e o comércio da maca representam uma importante fonte de renda para os produtores locais e suas famílias (VÁSQUEZ-APESTEGUI, 2010).

### 2.2.4 Composição nutricional da *L. meyenii*

A composição nutricional da raiz da maca desidratada apresenta variações dependendo do estudo, e este fato é justificado pela diferença de fenótipo utilizado, local de cultivo, condições do solo e do ambiente e época de colheita (Tabela 1). A maca peruana apresenta grande quantidade de carboidratos (59%) e fibras (18,25%), além de conter minerais como cálcio (até 13700,0 mg·kg<sup>-1</sup>) e potássio (até 11700,0 mg·kg<sup>-1</sup>) (CHEN; LI; FAN, 2017; DINI et al., 1994; LI et al., 2017a).

**Tabela 1.** Composição nutricional da raiz da *L. meyenii* desidratada

Nutriente	(%)	(mg·kg <sup>-1</sup> )
Água	7,01 <sup>a</sup> – 10,4 <sup>b</sup>	
Proteínas	9,56 <sup>c</sup> - 13,42 <sup>a</sup>	
Lipídios	0,88 <sup>c</sup> – 1,42 <sup>a</sup>	
Carboidratos	59,0 <sup>b</sup>	
Fibras totais	18,25 ± 0,43 <sup>c</sup>	
Fibras solúveis	3,37 ± 0,18 <sup>c</sup>	
Fibras insolúveis	14,88 ± 0,15	
Minerais		
Cobre (Cu)		4,3 <sup>c</sup> – 5,9 <sup>a</sup>
Manganês (Mn)		11,2 <sup>a, c</sup>
Zinco (Zn)		26,5 <sup>c</sup> – 30,7 <sup>a</sup>
Ferro (Fe)		70.4 <sup>c</sup> - 82.4 <sup>a</sup>
Sódio (Na)		150,2
Magnésio (Mg)		737,7 <sup>c</sup> – 847,5 <sup>a</sup>
Cálcio (Ca)		4128,8 <sup>c</sup> – 13700,0 <sup>a</sup>
Potássio (K)		8063,3 <sup>c</sup> – 11700,0 <sup>a</sup>

a: Raiz de maca amarela desidratada da Província Xinjiang (LI et al., 2017).

b: Raiz de maca desidratada cultivada no Peru e fenótipo não caracterizado (DINI et al., 1994).

c: Raiz de maca amarela desidratada cultivada no Peru (CHEN; LI; FAN, 2017).

\* Os valores em percentual são referentes a uma unidade de raiz seca ao ar.

### 2.2.5 Perfil fitoquímico

Na maca peruana, as principais classes de fitoquímicos encontrados são glucosinolatos, isotiocianatos, macaene e macamidas, alcaloides, (tio) hidantoínas, flavonóis, fitoesteróis, polissacarídeos e ácidos graxos. A revisão da literatura completa de cada classe de compostos citada é apresentada em um artigo publicado na revista “Food Research International” e encontra-se no apêndice A deste trabalho.

### 2.2.6 Atividades biológicas

#### Atividade antioxidante

Ensaio com o extrato aquoso da raiz da maca (50 mg·mL<sup>-1</sup>) (SANDOVAL et al., 2002) demonstraram que a maca atua na degradação de radicais livres, como DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), redução de morte celular induzida por peroxinitrito e protege células contra o peróxido de hidrogênio, mantendo a produção de ATP, porque sob condições de estresse oxidativo a produção celular de ATP é reduzida. Assim, o extrato aquoso de maca tem um efeito protetor sobre o dano celular oxidativo. Uma das justificativas para esse resultado é a presença de flavonóis e isotiocianatos,

uma vez que esses compostos apresentam um potencial antioxidante (SANDOVAL et al., 2002; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; YUAN et al., 2010).

A atividade de sequestro de radical livre pelo ensaio ABTS, usando extrato de folha de maca demonstrou que o extrato metanólico (concentração não definida) tem maior atividade antioxidante (2262,37  $\mu\text{mol}$  de trolox EQ/100g) do que o extrato aquoso (1305,36  $\mu\text{mol}$  de trolox EQ/100g) e do que o extrato de diclorometano (246,42  $\mu\text{mol}$  de trolox EQ/100g) (RODRÍGUEZ-HUAMÁN et al., 2017). O ensaio com DPPH, utilizando extrato da raiz da maca (0,01  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) também apresentou melhor atividade com o extrato metanólico e os resultados foram melhores com maca amarela (21,7%) do que com maca preta (18,2%) (INOUE; FARFAN; GONZALES, 2016) e o extrato hidroalcolico (0,03 a 0,40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  da raiz da maca preta apresentou atividade antioxidante que variou de 3,59% a 42,19% (GONZALES; VASQUEZ; GASCO, 2013). Esses resultados fornecem um bom parâmetro avaliativo da atividade antioxidante dos extratos da maca peruana. No entanto, a representação dos resultados em  $\text{IC}_{50}$  seria uma vantagem por facilitar a comparação, já que resultados em percentuais variam de acordo com a concentração do extrato e o  $\text{IC}_{50}$  informa a concentração exata necessária para reduzir em 50% o radical DPPH.

Polissacarídeos isolados das folhas da maca (MPL-1 e MPL-2) mostraram atividade antioxidante. O MPL-1 apresentou atividade sequestradora de radical hidroxila de 82,71% e MPL-2 de 79,07%. Esses valores são próximos aos encontrados na vitamina C (99,68%), utilizada como controle positivo. Todos os compostos tiveram a concentração de 1,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (CAICAI et al., 2017).

Outro polissacarídeo, o MP1, extraído da raiz da maca também apresentou atividade antioxidante, analisada pela atividade do sequestro do radical DPPH. As concentrações de MP1 variaram de 100 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As taxas de sequestro do radical DPPH pelo MP1 variaram entre 9,12 a 31,23%, sugerindo que MP1 exerceu moderada atividade de eliminação de radicais DPPH (WANG et al., 2018a).

### **Atividade citoprotetora**

As células são expostas a fatores que podem causar danos celulares. Alguns desses fatores são espécies reativas de oxigênio (EROs), que são produtos do metabolismo aeróbico. Existem vários tipos de EROs, tais como, ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). A produção de EROs em baixos

níveis é importante para manter funções fisiológicas normais nos organismos, mas em algumas condições, essa produção é excessiva e a capacidade antioxidante de eliminar as EROs é excedida, e então o estresse oxidativo é causado, podendo gerar danos às células e tecidos (NITA; GRZYBOWSKI, 2016; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Tratamento de células RAW264.7, que são um tipo de macrófagos, com o polissacarídeo MP1 isolado de raízes de maca demonstraram efeito citoprotetor destes compostos. Inicialmente as células foram tratadas com MP1 (0 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e cultivadas por 24 h, em seguida, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado e as células foram cultivadas por mais uma hora. Os níveis de EROs nas células foram observados através da intensidade da fluorescência. Quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de EROs. O grupo tratado apenas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentou maior intensidade da fluorescência do que o grupo tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MP1. Marcadores de estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA) e marcadores de peroxidação lipídica e lactato desidrogenase (LDL) também foram analisados. Observou-se que o aumento no MDA e da LDL foi menor no grupo tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MP1 em comparação com o grupo tratado apenas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (WANG et al., 2018a).

### **Atividade imunomodulatória**

O sistema imunológico é o conjunto de células, tecidos, substâncias e mecanismos envolvidos na proteção do organismo contra a ação de patógenos, como vírus, bactérias, substâncias tóxicas e alérgenos. Portanto, o sistema imunológico reconhece o patógeno, alérgeno ou substância tóxica e tenta eliminá-lo. Para isso, há a imunidade inata, que representa os primeiros mecanismos de combate e tem ação rápida, e a imunidade adaptativa, que é um sistema menor de defesa e para substâncias ou microrganismos específicos. Os principais componentes do sistema imune inato são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK) e receptores Toll-like (TLRs) (CRUVINEL et al., 2010; CHAPLIN, 2010).

Extratos de plantas e seus compostos isolados demonstraram efeito imunomodulador e os testes avaliam principalmente a atividade dos macrófagos, pois são as principais células do sistema de defesa (MARTEL et al., 2017). A ação de defesa dos macrófagos contra inflamação e infecção é baseada na fagocitose do patógeno ou alérgeno e na síntese de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-12), fator de necrose tumoral (TNF  $-\alpha$ ) e quimiocinas, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e intermediários reativos de nitrogênio, como óxido nítrico (NO) (CRUVINEL et al., 2010).

O polissacarídeo MP21 foi extraído e purificado da raiz de *L. meyenii* seca e as células RAW264.7, que são macrófagos murinos, foram incubadas com MP21 (62,5 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 48 horas. Depois do tratamento conclui-se que o MP21 poderia aumentar a capacidade fagocitária e induzir maior síntese de secreção de NO, EROs, TNF- $\alpha$  e IL-1 nas células RAW264.7. Todos os resultados foram de maneira dose-dependente. Portanto, o MP21 demonstrou estimular o sistema imunológico inato pela ação de macrófagos (WANG et al., 2016). As células RAW264.7 também foram incubadas por 24 horas com o polissacarídeo LMLP, extraídos da folhas da *L. meyenii*, com concentração variando de 10 a 160  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o LMLP estimulou a proliferação e a fagocitose das células, assim como a secreção de NO (LI et al., 2017c). As células RAW264.7 também foram incubadas por 48 horas com o polissacarídeo LMP-1, isolado de raízes da *L. meyenii*, com concentração variando de 1,56 a 6,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o nível de RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 aumentaram nas células RAW264.7 tratadas com LMP-1 de forma dose-dependente em comparação com o controle. Portanto, o LMP-1 pode estimular a expressão de fatores inflamatórios em macrófagos (ZHA et al., 2018).

### **Atividade anti-fadiga**

A fadiga causa cansaço geral e pode ser classificada como física ou mental. A fadiga mental geralmente é causada por trabalho mental em excesso ou privação de sono, e a fadiga física geralmente é causada por excesso de exercícios e recuperação inadequada (HUANG et al., 2011, 2015). Extratos da *L. meyenii* e seus compostos isolados mostram um efeito benéfico para a redução da fadiga física. Após 3 semanas de suplementação com 30 a 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de extrato lipossolúvel do pó de maca amarela (obtido com dióxido de carbono supercrítico como solvente), o tempo de natação até a exaustão dos camundongos aumentou de 25% a 41% em relação ao grupo controle (CHOI et al., 2012). A suplementação por 3 semanas de 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  do extrato maca lipossolúvel também demonstrou uma redução no estresse oxidativo causado pelo exercício intenso, medido pela redução dos níveis de peroxidação lipídica muscular, aumento da glutatona total e aumento da atividade da catalase hepática (CHOI et al., 2012).

O uso do extrato aquoso da raiz de maca desidratada (4, 10, 20 e 40  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) foi testado para avaliar o desempenho de ratos durante a natação. A duração da atividade aumentou progressivamente ao longo dos 21 dias de suplementação em comparação com o grupo controle. O tempo de natação (minutos) do grupo suplementado com 40  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  do extrato foi de 19,33 no 14º dia e de 21,37 no 21º dia de tratamento. O grupo controle obteve um tempo de 11,34 no 14º dia e 10,88 no 21º dia (ZHENG et al., 2002).

A suplementação com polissacarídeos MPS-1, MPS-2 (LI et al., 2016) e MP (TANG et al., 2018a) ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}$ ) isolados da raiz da maca foi testada em ratos por 30 dias e mostrou contribuição para o efeito anti-fadiga, melhorando a atividade antioxidante, ajudando a reduzir os produtos metabólicos que estão relacionados à fadiga, como ácido lático e nitrogênio ureico. Além disso, a suplementação melhorou a atividade da glutathione peroxidase (GSH-PX) e da lactato desidrogenase (LDH), fortalecendo a capacidade antioxidante, e potencializou a ação da creatina quinase (CK), que contribui para a formação mais rápida de ATP, gerando mais energia, esses fatores ajudam a reduzir a sensação de fadiga. A suplementação também aumentou a duração e a velocidade da natação proporcionalmente ao aumento das concentrações de polissacarídeos nas amostras (LI et al., 2016; TANG et al., 2017).

A suplementação com polissacarídeo M-PL extraído da raiz de maca fresca também mostrou efeito anti-fadiga. Quarenta camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, cada grupo com dez, e os grupos foram, alta dose ( $0,05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}$ ), dose média ( $0,03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}$ ) dose baixa ( $0,01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}$ ) e o grupo controle (solução salina normal). O ensaio durou 45 dias e observou-se que o tempo de natação até a exaustão dos camundongos tratados foi maior do que o grupo controle. Os camundongos do grupo controle nadaram por 14,44 minutos e grupo alta dose 44,2 minutos. Outro fator observado foi o glicogênio muscular, sendo encontrada maior reserva de glicogênio muscular no grupo alta dose ( $19,08 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em relação ao grupo controle ( $6,74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Isso mostra que a suplementação com o M-PL reduziu o gasto de reservas de energia durante o exercício, que neste caso foram reservas de glicogênio muscular. Quanto mais rápido essas reservas forem gastas, mais rápido a sensação de fadiga ocorrerá (TANG et al., 2018b).

A suplementação com extrato de éter de petróleo de raízes de maca ( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) em camundongos por 21 dias mostrou melhora no tempo de natação até a exaustão, menores níveis de lactato e amônia sérica, aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e GSH-PX no cérebro, fígado e músculo, evidenciando que o uso de maca pode melhorar a atividade de enzimas antioxidantes e reduzir a peroxidação nesses tecidos. O grupo controle em comparação com o grupo tratado apresentou um aumento no glicogênio hepático e nos ácidos graxos não esterificados, sugerindo que a suplementação reduziu o gasto de glicogênio e aumentou o metabolismo lipídico como fonte de energia durante o exercício (YANG et al., 2015).

## **Proteção contra radiação ultravioleta**

A radiação ultravioleta (UV) é um fator tóxico ambiental e pode aumentar a síntese de mediadores inflamatórios e EROs, causar lesões celulares e danos no DNA, podendo gerar mutações nas células da pele, predispondo ao aparecimento de câncer (RAMASAMY et al., 2017). A exposição dos seres humanos à luz solar sem proteção direta, como os filtros solares, é a principal forma de se expor a essa radiação (AMARO-ORTIZ; YAN; D'ORAZIO, 2014). E os extratos da maca peruana têm sido relacionados à proteção UV.

Trinta e seis camundongos foram submetidos ao uso tópico (200 µL por tratamento, na concentração de 1 mg de pirogalol·mL<sup>-1</sup>) dos extratos hidroalcoólicos da maca e, em seguida, os animais foram colocados a 15 cm da fonte de radiação. A exposição à radiação UVB foi de 60 minutos diários, durante cinco dias consecutivos. Camundongos que não foram tratados com maca ou filtro solar apresentaram maior hiperplasia epidérmica, necrose da epiderme, eritema e queimaduras. O uso da maca amarela, vermelha e preta gerou menos hiperplasia epidérmica, redução de morte celular causada pelo sol e infiltração leucocitária, comparado ao camundongos que sofreram a radiado e não foram tratados (GONZALES-CASTAÑEDA et al., 2011). Esses resultados sugerem um efeito positivo do tratamento com extratos da maca em alterações da pele causadas pela radiação UV.

Embora compostos isolados não tenham sido testados, a maca possui em sua composição compostos fenólicos, que são um dos responsáveis pela atividade antioxidante da planta, o que pode justificar esse efeito (GONZALES-CASTAÑEDA; GONZALES, 2008). Outro composto encontrado nos extratos da maca que pode justificar essa ação é o glicosinolato, que é uma das substâncias de defesa dessa planta e está aumentado na presença de fatores ambientais como a radiação UV. Portanto, a utilização da maca peruana pela indústria farmacêutica e cosmética pode ser promissora, desde que os princípios ativos responsáveis por essa atividade de proteção UV sejam identificados (GONZALES-CASTAÑEDA; GONZALES, 2008).

## **2.3 PERFIL METABOLÔMICO DE PLANTAS**

As plantas sintetizam diversos metabólitos e historicamente são utilizadas no tratamento e prevenção de doenças. Para ampliar o potencial terapêutico das plantas é necessário identificar seus compostos farmacologicamente ativos, e a metabolômica contribui para essa elucidação. A metabolômica identifica e quantifica metabólitos produzidos por um sistema biológico. Portanto,

a metabolômica pode contribuir para o desenvolvimento do campo da ciência das plantas e da fitoterapia (BINGOL, 2018; BIJTTEBIER et al., 2016; MARTUCCI et al., 2018; TAO et al., 2018).

Pela grande diversidade de metabólitos e diferentes propriedades físico-química, para determinar todos os metabólitos de uma amostra diversas técnicas analíticas são necessárias, tais como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (DEMETROWITSCH; SCHWARZ, 2014).

Na CG, a amostra é injetada no equipamento e uma temperatura é aplicada para que ocorra a volatilização dos compostos. Os compostos volatilizados entram na coluna e são arrastados por um gás (fase móvel) até sair da coluna em um tempo específico, já que cada composto tem propriedades físicas e químicas diferentes e vão interagir de forma diferente com a fase estacionária que compõe a coluna. Quanto maior a interação entre o composto e a fase estacionária maior tempo levará para sair da coluna. Quando os compostos saem da coluna, chegam no detector e dessa forma, cada metabólito pode ser detectado e quantificado (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Na CG é necessário que a amostra seja volátil, para ser transformada em vapor e passar pela coluna, e ser estável termicamente para não se decompor no momento da separação. Tendo em vista essa limitação da CG, a CL pode ser utilizada em associação para ampliar a capacidade de detecção dos metabólitos, uma vez que é adequada para a análise de compostos grandes, polares, iônicos, termicamente instáveis e não voláteis (SAIBABA; SATHISH KUMAR; SHANMUGA PANDIYAN, 2016).

Na CL, a amostra é injetada em uma coluna e é arrastada através de um solvente com o auxílio de uma bomba de alta pressão, ao chegar no final da coluna a amostra segue para o detector. O detector mais utilizado, tanto para CL quanto para CG, é o espectrômetro de massas, enquanto a cromatografia tem a função de separar os metabólitos a espectrometria permite a identificação desses compostos, de modo que converte os metabólitos da amostra em íons e posteriormente os íons são detectados com base na sua carga, possibilitando assim sua identificação (SAIBABA; SATHISH KUMAR; SHANMUGA PANDIYAN, 2016).

O acoplamento das técnicas de cromatografia e espectrometria permitiu maior eficiência na identificação de novos compostos e possibilita avanços na área da metabolômica, da ciência das plantas e da fitoterapia (J. LINDON; NICHOLSON; HOLMES, 2007; LANÇAS et al., 2009).

#### **2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Radicais livres são compostos instáveis e altamente reativos capazes de roubar elétrons de outras moléculas para se estabilizarem, desse modo, podem causar diversas alterações celulares. Por outro lado, antioxidantes são substâncias responsáveis por várias propriedades biológicas de um organismo, uma vez que auxiliam no retardo dos processos oxidativos, reduzindo efeitos prejudiciais dos radicais livres (OZER et al., 2018; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Quando há um desbalanço entre a concentração de radicais livres e de antioxidantes, causado pelo aumento de radicais e redução de antioxidantes, é configurado o quadro de estresse oxidativo, que pode levar a efeitos prejudiciais ao organismo, por causar lesões de componentes celulares importantes como o DNA, as proteínas e os lipídios (BIRBEN et al., 2012). Dessa forma, o estresse oxidativo induz mutações e modificações de expressão gênica, além de danos nas membranas lipídicas (WU; KOSTEN; ZHANG, 2013). Todas essas lesões, podem levar a doenças cardiovasculares, hepáticas e pulmonar, câncer, catarata, aterosclerose, artrite reumatoide, diabetes e doenças de pele como urticária e dermatite atópica (ICHIISHI; LI; IORIO, 2016; ADLY, 2010; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

As substâncias antioxidantes reduzem os efeitos deletérios causados pelos radicais livres, de modo que podem apresentar mecanismos de ação diferentes a depender do tipo de antioxidante. Alguns desses mecanismos são a capacidade de sequestrar radicais livre no meio onde estiverem, quelar metais iônicos, ativar enzimas antioxidantes ou prevenir danos ao DNA (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos, os enzimáticos são sintetizados *in vivo* pelos organismos e as principais enzimas que constituem essa classe são a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH- Px). A SOD catalisa a dismutação do radical livre superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio apesar de não ser um radical, apresenta toxicidade para as estruturas celulares e então a catalase e a GSH- Px o reduz à água (BIRBEN et al., 2012; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Alguns dos principais antioxidantes não enzimáticos são produzidos por plantas e são o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos. Todas essas substâncias agem doando um elétron ou um átomo de hidrogênio de seu grupo hidroxila, de modo a estabilizar o radical livre (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

Os compostos fenólicos são classificados em cinco grandes grupos, e são eles os ácidos fenólicos e os flavonóides, que juntos compõem as maiores classes desses compostos nas plantas, as lignanas, os estilbenos e os taninos. Esses compostos possuem anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila. Maiores números de hidroxilas livres estão associadas ao aumento do potencial antioxidante dos compostos fenólicos (KASOTE et al., 2015).

Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos exercem efeitos antitumoral (ZHAO et al., 2013), anti-inflamatório (ALBISHI et al., 2013) e hepatoprotetor (CHENG et al., 2013) e podem retardar doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (LI et al., 2017).

Tendo em vista esse potencial de melhorar quadros de diversas patologias, as plantas e seus extratos têm sido cada vez mais consumidos e utilizados na elaboração de novos fármacos capazes de prevenir e tratar várias doenças (DRÓZDŹ; IENÉ; PYRZYNSKA, 2017; MAHDI-POUR et al., 2012; XU et al., 2017). Plantas medicinais com potencial antioxidante também têm sido utilizadas na indústria de cosméticos por auxiliar nos processos de anti- envelhecimento e clareamento da pele (LIYANAARACHCHI et al., 2018). Portanto, a atividade antioxidante de plantas permite a ampla aplicabilidade das mesmas.

Um dos métodos mais aplicados para avaliar a atividade antioxidante é o método do radical livre 2,2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH). A determinação da atividade antioxidante é vista pela avaliação da atividade sequestradora do DPPH pelas substâncias antioxidantes, que doam um átomo de hidrogênio para estabilizar a molécula de DPPH. O DPPH, que apresenta cor púrpura, em contato com antioxidantes se reduz em difenil-picril-hidrazina (DPPHH), de coloração amarela, e conseqüentemente a absorbância é reduzida. A partir dos valores de absorbância é possível determinar a atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

## **2.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA**

As plantas têm sido muito utilizadas na elaboração de novas drogas. No entanto, alguns extratos e compostos de plantas podem apresentar citotoxicidade, sendo que uma substância é

considerada citotóxica quando é capaz de causar alterações na morfologia, no crescimento celular e até mesmo causar a morte de células (MCGAW; ELGORASHI; ELOFF, 2014). Portanto, a depender do produto a ser elaborado, a atividade citotóxica não é desejada, devendo ser a menor possível. Desse modo, é necessária a determinação da capacidade citotóxica da planta, para analisar as possíveis consequências da sua administração e estabelecer condições de utilização segura (BOUKANDOU; MEWONO; ABOUGHE, 2015)(MCGAW; ELGORASHI; ELOFF, 2014).

Por outro lado, a atividade citotóxica das plantas pode ser benéfica no tratamento de certas doenças como o câncer, uma vez que um dos problemas do tratamento dessa patologia é a resistência aos medicamentos convencionalmente utilizados. Linhagens de células cancerígenas foram testadas frente a extratos de plantas e constatou-se efeito positivo, demonstrando que plantas com essa atividade podem auxiliar a elaboração de novas drogas para o tratamento do câncer (ZHAO et al., 2018; OCHWANG'I et al., 2018; WANG et al., 2018).

Ensaio de citotoxicidade com culturas celulares têm sido muito utilizados para testar novos fármacos, já que permite a análise de um grande número de amostras, apresentam baixo custo, são rápidos e não requerem de uso de animais (ASLANTÜRK, 2018). Uma estratégia para ensaios de atividade antitumoral é o uso de linhagens celulares, pois podem ser mantidas em cultura por períodos maiores do que células de cultura primária e mantém a maior parte das características do tecido original. A linhagem C6 é uma linhagem de glioma e tem sido muito utilizada em ensaios antitumorais por ter fenótipo parecido com o glioblastoma humano (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002). O glioblastoma é um tumor agressivo do sistema nervoso central e ensaios com essa linhagem celular possibilita testar novas drogas para o tratamento dessa patologia (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002).

## **2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

O uso excessivo de drogas com efeito antimicrobiano tem causado um aumento da resistência de bactérias patogênicas, parasitas, vírus e fungos/ leveduras a esses medicamentos, dificultando o tratamento de doenças. Extratos e compostos isolados de plantas podem apresentar atividade antimicrobiana frente a diversos patógenos e a descoberta de uma diversidade maior de plantas com potencial antimicrobiano é importante para o desenvolvimento de novos fármacos fitoterápicos na tentativa de combater o aumento da resistência à agentes antimicrobianos por grande parte da população (FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014; SAFARPOOR et al., 2017).

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais é a microdiluição em caldo. Esse método possibilita a determinação da CMI (Concentração Mínima Inibitória) de um agente antimicrobiano, que pode ser bactericida ou fungicida, capaz de inibir o crescimento de bactérias ou fungos. A turbidez gerada pelo crescimento e reprodução do microrganismo é utilizado como parâmetro avaliativo. As vantagens desse método é o custo acessível, a fácil reprodutibilidade e por ser altamente sensível. Uma das limitações, é a incapacidade de definir o modo de ação do agente antimicrobiano, no entanto, a técnica da microdiluição tem contribuído para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (HAŁASA et al., 2014; ELLOF, 1998; WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

A microdiluição em caldo é uma técnica empregada em estudos para encontrar a atividade antibacteriana e antifúngica em plantas medicinais. A atividade antifúngica foi constatada no óleo essencial obtido por hidrodestilação de folhas da árvore *Corymbia citriodora*, frente a espécies como *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* e *Penicillium funiculosum*. A concentração inibitória mínima (CMI) para cada espécie, respectivamente, foi, 0,21, 0,25 e 0,52 mg·mL<sup>-1</sup> (SALEM et al., 2018). A atividade antibacteriana foi encontrada em extratos metanólico e etanólico de folhas das plantas *T. alata* e *T. arjuna* frente as bactérias *Enterobacter aerogenes* (CMI 1,56 mg·mL<sup>-1</sup>), *Escherichia coli* (CMI 3,125 mg·mL<sup>-1</sup>) e *Klebsiella pneumoniae* (CMI 1,56 mg·mL<sup>-1</sup>) (RATH; PADHY, 2015). Também foi visto atividade antimicrobiana entre extratos de diferentes espécies de plantas medicinais da região da África (*F. exasperata* e *N. latifolia*). A CMI do extrato metanólico das cascas e do caule da *F. exasperata* frente a *E. coli* foi de 256 µL·mL<sup>-1</sup> e a CMI do extrato metanólico das folhas da *N. latifolia* frente ao *B. cereus* foi de 64 µL·mL<sup>-1</sup> (TEKWU; PIEME; BENG, 2012). Todas essas atividades foram avaliadas a partir da microdiluição em caldo.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Correlacionar o perfil metabolômico dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais com as atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana dos extratos.

#### Objetivos Específicos

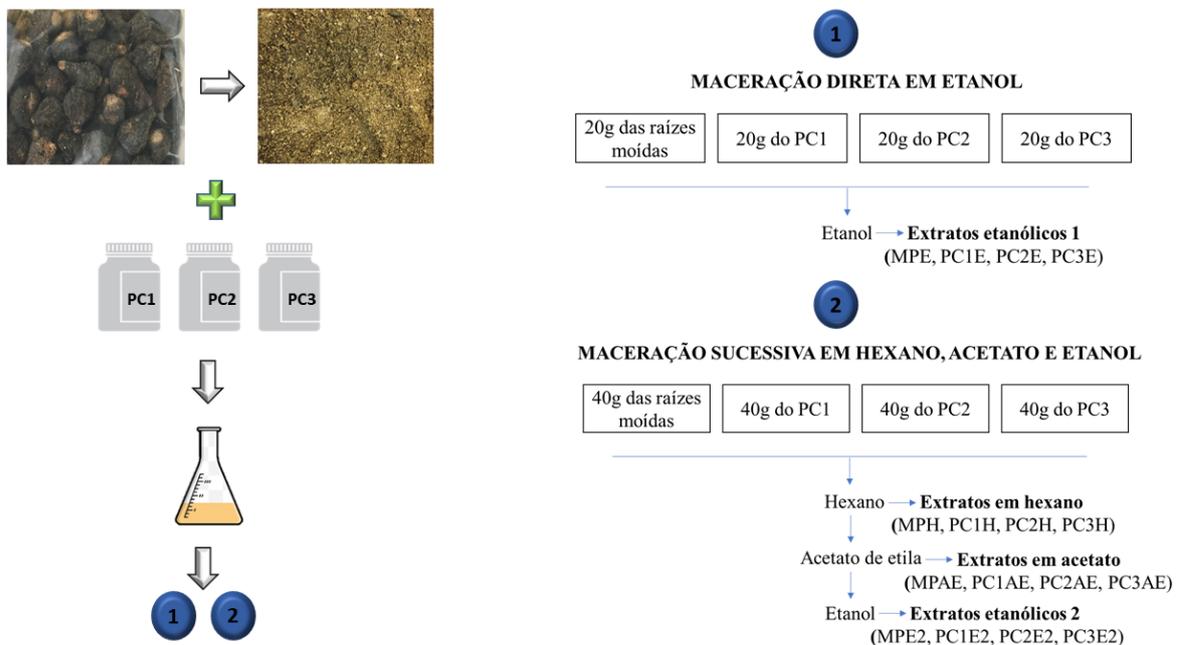
- Obter os extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais;
- Determinar a atividade antioxidante e teor de fenóis totais dos extratos;
- Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como leveduras;
- Avaliar os efeitos do tratamento com os extratos na viabilidade de células da linhagem tumoral de glioma de rato (C6) e comparar com os efeitos em células normais cerebrais (astrócitos);
- Definir o perfil metabolômico dos extratos obtidos por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas e da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Correlacionar o perfil metabolômico dos extratos com as atividades biológicas testadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Nesse estudo foram utilizadas quatro amostras diferentes: as raízes desidratadas da *L. meyenii* preta e três marcas diferentes de farinha de maca peruana (produtos comerciais da planta) obtidos em lojas de produtos naturais. As raízes foram moídas até a consistência de um pó fino utilizando moinho de facas tipo Willye Te-650/ Tecnal. Inicialmente, 20g das raízes moídas e das farinhas (produtos comerciais 1, 2 e 3) foram maceradas diretamente em etanol (extrato etanólico 1), enquanto que 40g passaram por macerações sucessivas em hexano, acetato de etila e etanol (extrato etanólico 2) (Figura 2).

**Figura 2.** Obtenção dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais



PC1= Produto comercial 1. PC2= Produto comercial 2. PC3= Produto comercial 3.

Os solventes foram removidos sob pressão reduzida a 40 °C utilizando um evaporador rotativo (4000 Laborota echo, Alemanha). As amostras permaneceram no exaustor à temperatura ambiente (25 °C) até a completa evaporação de todo o solvente residual e os extratos estarem completamente secos. Foram obtidos quatro extratos de cada amostra, totalizando dezesseis extratos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Extratos obtidos por cada amostra e suas respectivas siglas

Amostra	Solvente	Sigla
Raiz desidratada	etanol (extrato etanólico 1)	MPE
	hexano	MPH
	acetato de etila	MPAE
	etanol (extrato etanólico 2)	MPE2
Produto commercial 1	etanol (extrato etanólico 1)	PC1E
	hexano	PCH
	acetato de etila	PC1AE
Produto commercial 2	etanol (extrato etanólico 2)	PC1E2
	etanol (extrato etanólico 1)	PC2E
	hexano	PC2H
Produto commercial 3	acetato de etila	PC2AE
	etanol (extrato etanólico 2)	PC2E2
	etanol (extrato etanólico 1)	PC3E
Produto commercial 3	hexano	PC3H
	acetato de etila	PC3AE
	etanol (extrato etanólico 2)	PC3E2

## 4.2 ENSAIO ANTIOXIDANTE DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada pelo teste 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), como descrito por SANTOS e colaboradores (2018). Inicialmente, 1 mL de DPPH (120 mmol·L<sup>-1</sup>; metanol) foi adicionado a 1 mL de cada extrato para fornecer 2 mL da mistura de reação com uma concentração final dos extratos variando de 10 a 1000 µg·mL<sup>-1</sup>. A absorbância foi medida a 515 nm após 30 min de reação. Utilizou-se metanol como branco e solução de DPPH (1,0 mL; 120 mmol·L<sup>-1</sup>) e metanol (1,0 mL) como controle negativo. Ácido gálico foi utilizado como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como IC<sub>50</sub> (metade da concentração inibitória máxima) e os extratos que apresentaram valores de IC<sub>50</sub> > 1000 µg·mL<sup>-1</sup> foram considerados inativos.

## 4.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do conteúdo de fenóis totais foi realizada conforme descrito por SANTOS e colaboradores (2018) com pequenas modificações. Inicialmente, 100 µL do extrato (2 mg·mL<sup>-1</sup>) foram misturados com 50 µL de reagente fenol de Folin-Ciocalteu e 750 µL de água. Após um minuto, 100 µL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 15% p/v) foram adicionados à mistura, atingindo um volume final de 1 mL. A mistura reacional foi mantida no escuro durante 120 min. Após este tempo, a absorbância foi lida a 725 nm (VersaMax™

Microplate Reader, EUA). A curva padrão de ácido gálico foi utilizada para calcular o conteúdo fenólico total nos extratos e os resultados foram expressos em  $\text{mg}\cdot\text{EAG}\cdot\text{g}^{-1}$  de extrato seco.

As análises estatísticas dos resultados da atividade antioxidante e da quantificação de fenóis totais foram realizadas utilizando o software SISVAR. A análise de variância foi utilizada para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ( $P < 0,05$ ), seguidas pelos testes de comparação múltipla de Tukey. Os resultados são apresentados como a média das repetições  $\pm$  desvios padrão.

#### **4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA**

##### **4.4.1 Cultura de células de glioma murino (C6)**

As linhagens de glioma de rato (C6) foram obtidas do Banco de Células do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) do Instituto de Ciência e Saúde, Universidade Federal da Bahia e encontravam-se mantidas em uma solução de 90 % de soro fetal bovino (SFB) e 10% de DMSO à razão de  $1,5\text{-}2,0 \times 10^6$  células $\cdot\text{mL}^{-1}$  e estocadas em tubos de criopreservação a  $-196$  °C (nitrogênio líquido).

Para a realização do ensaio, os tubos de criopreservação foram descongelados e o conteúdo dos mesmos transferidos para tubo tipo Falcon, no qual foi adicionado posteriormente o meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, penicilina a  $100$  UI $\cdot\text{mL}^{-1}$  e estreptomicina a  $100$  g $\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os tubos foram então centrifugados por 5 min a 2000 RPM. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em meio DMEM para serem cultivadas em condições estéreis, a  $37$  °C em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  em placas de cultura de poliestireno com 100 mm de diâmetro até atingirem 80% de confluência.

Após 48 horas de plaqueamento e com confluência de 80%, as células foram descoladas da placa através de uma solução de 0,05% de tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation, Canadá – USA) com 0,02% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em incubadora por 2 min a  $37$  °C. A digestão enzimática foi neutralizada adicionando-se o dobro do volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB, em seguida as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado, as células foram então ressuspendidas em meio DMEM. Posteriormente as células foram semeadas em placas de 96 poços e lançadas com densidade de aproximadamente 10.000 células/ $\text{cm}^2$ . Para determinar a alíquota necessária para

atingir 10.000 células por poço, 10 $\mu$ L do pellet de células ressuspendidas foram inseridos na câmara de Neubauer para a realização da contagem celular.

#### 4.4.2 Cultura primária de astrócitos

Para a obtenção dos astrócitos foram utilizados ratos *Wistar* neonatos (0–1 dia) obtidos do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA). Para o procedimento, os animais foram decapitados e seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente, as meninges e os vasos sanguíneos foram retirados do córtex cirurgicamente e em seguida, o córtex foi dissociado mecanicamente. As células dissociadas foram suspensas e semeadas em garrafas de cultura de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup>, previamente sensibilizadas com poli-D-lisina e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias, sem troca de meio durante o período. Após os 7 dias, as garrafas foram submetidas a agitação por 3 horas utilizando uma câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), com o intuito de garantir a prevalência astrocitária na cultura. O sobrenadante (contendo microglia descolada), foi desprezado e as garrafas receberam meio DMEM novo, permanecendo posteriormente na incubadora sem troca de meio por mais 5 dias, até confluência da garrafa e utilização para os experimentos.

Após atingirem a confluência, as células foram descoladas das garrafas através de uma solução de 0,05% de tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation) com 0,02% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em incubadora por 3 min a 37 °C. A digestão enzimática foi neutralizada adicionando-se igual volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e as células foram então semeadas em placas de 96 poços e lançadas com densidade de aproximadamente 40.000 células/cm<sup>2</sup> (contagem celular realizada na câmara de Neubauer).

Estes experimentos foram realizados em parceria com o Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA), mediante a aprovação do uso de animais pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) do ICS- UFBA (Protocolo de aprovação nº 6731220818) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela CEUA. O certificado de aprovação está no Anexo A deste trabalho.

#### 4.4.3 Tratamento das células com os extratos

Após 24h (C6) e 48h (astrócitos) do plaqueamento das células nas placas de 96 poços, foi realizado o tratamento das células com os extratos. Foram preparadas soluções dos extratos nas concentrações de uso (1, 10 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Diluição seriada para o preparo das soluções nas concentrações de uso

Concentração final da solução	Diluição seriada
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 $\mu\text{L}$ solução estoque* + 999 $\mu\text{L}$ meio DMEM
10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{L}$ solução [100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] + 900 $\mu\text{L}$ meio DMEM
1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{L}$ solução [10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] + 900 $\mu\text{L}$ meio DMEM

\*Solução estoque (100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) = 10 mg do extrato + 100  $\mu\text{L}$  de DMSO

Para o tratamento, o meio DMEM foi removido de todos os poços e posteriormente foi adicionado as soluções de cada extrato em concentração de 1, 10 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após esse processo as placas foram mantidas em incubadora por 24 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O grupo controle de cada placa consistia no tratamento das células com uma solução de volume equivalente de DMSO e meio DMEM. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes com 8 replicatas por ensaio.

#### 4.4.4 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT

A atividade de desidrogenases mitocondriais foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) estabelecido por Mosmann (1983). O MTT é um sal tetrazólio que pode ser clivado por desidrogenases mitocondriais e então forma-se o MTT formazan. Esse processo de redução do MTT (coloração amarela) para MTT formazan (coloração púrpura) só é possível em mitocôndrias ativas, portanto, só ocorre em células vivas. Desse modo, o teste do MTT é colorimétrico e baseia-se na capacidade das células viáveis em metabolizar o MTT através das desidrogenases mitocondriais. Após o período de 24 horas de tratamento das células (C6 e astrócitos) com os extratos, o meio DMEM com os extratos foi removido de todos os poços. Posteriormente, foi adicionada em todos os poços 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e meio DMEM. Essa solução foi preparada a partir de uma solução estoque de MTT (5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) solubilizada previamente em PBS (tampão fosfato). As placas foram então mantidas na incubadora por 2 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de incubação, as células foram lisadas pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). Após 12 horas em temperatura ambiente, as placas foram submetidas a espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 570 nm, usando um espectrofotômetro

(MicroNal, B382). Para cada placa, um poço foi mantido com meio de cultura e MTT porém sem célula, caracterizando assim o branco do ensaio e o valor de absorbância deste foi descontado de todos os outros.

Os dados obtidos a partir do espectrofotômetro foram submetidos às análises estatísticas adequadas e expressos relativamente como percentual em relação ao grupo controle, cuja média correspondeu a 100% de viabilidade.

#### **4.4.5 Microscopia de contraste de fase**

As culturas foram acompanhadas com microscopia de contraste de fase, que também foi usada para avaliação da celularidade e morfologia celular. As imagens foram adquiridas através de câmera digital de alta resolução (Labomed iVu5000) acoplada ao microscópio invertido. Uma régua micrométrica foi fotografada em mesmo aumento para confecção da barra de escala das fotomicrografias.

#### **4.4.6 Análises estatísticas**

Todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e desvio padrão da média. A distribuição foi considerada normal se passasse nos testes de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov, teste de D'Agostino & Pearson e teste de Shapiro-Wilk). Os dados foram expressos em média (portanto, com distribuição normal) e testes estatísticos paramétricos (t de Student e One-Way ANOVA) foram usados nas comparações entre grupos tratados e controles. Para múltipla comparação foi utilizado o teste não paramétrico de Tukey. Os valores de p adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles inferiores a 0,05. O software GraphPad Prism, versão 8.0.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) foi utilizado nas análises.

### **4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada como concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o ensaio microdiluição seriada em placas de 96 poços, conforme descrito por SANTOS e colaboradores (2018). A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada frente a *Micrococcus luteos* (ATCC 10240), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (CCT 0096), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 0090), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida glabrata* (CCT 0728). O caldo Nutriente (Acumedia, EUA) e o extrato de malte (Acumedia, EUA) foram

utilizados como meio de cultura para o crescimento de bactérias e leveduras, respectivamente. Cloranfenicol ( $0,19\text{--}25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e garamicina ( $0,039\text{--}5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram usados como controle positivo. Os extratos foram dissolvidos em 20% de DMSO (v/v) ou em Tween a 20% (v/v). Por essa razão, tanto o Tween quanto o DMSO foram usados como controles negativos.

Após a diluição seriada, a concentração dos extratos variou de  $3,90$  a  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As placas de 96 poços foram incubadas a  $36^\circ\text{C}$  (24 h) e  $26^\circ\text{C}$  (72 h) para crescimento bacteriano e das leveduras, respectivamente. A CIM foi determinada através do surgimento de turbidez nos poços. Todas as análises foram realizadas em triplicas. A CIM foi determinada pela ausência de turbidez nos poços e os extratos foram considerados ativos quando inibiram o crescimento microbiano em concentrações inferiores ou iguais a  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Dos poços que mostraram a ausência de turbidez,  $10 \mu\text{L}$  do conteúdo foram inoculados em caldo nutriente sólido ou extrato de malte para avaliar se a atividade observada era microbiostática ou microbicida.

## 4.6 PERFIL METABOLÔMICO

### 4.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

As análises de CLAE-EM foram realizadas usando um sistema de cromatografia líquida (Prominence, Shimadzu Co., Japão) acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo (microTOF II, Bruker Daltonics, Alemanha). A separação foi realizada em coluna C18 ( $3,0\text{mm} \times 150 \text{mm}$ ,  $2,6 \mu\text{m}$ , Kinetex, Phenomenex), mantida a  $40^\circ\text{C}$ . Foram utilizados como fase móvel, acetonitrila HPLC e água, ambos acidulados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi: 25%B durante 2 min, 25 a 80%B em 20 min e 80 a 90%B em 2 min. A coluna foi recondicionada com 25%B durante 3 min. A taxa de fluxo foi de  $0,2 \text{mL min}^{-1}$ . O MS foi operado em modo positivo com  $3,2 \text{kV}$  na interface ESI e gás seco a  $350^\circ\text{C}$ . Os espectros de varredura completos foram adquiridos de 50 a 1000 m/z. Inicialmente, um miligrama de extratos secos foi dissolvido em acetonitrila HPLC (1,0 mL) para preparar a solução estoque ( $1 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Em seguida,  $500 \mu\text{L}$  da solução estoque foram posteriormente diluídos em  $500 \mu\text{L}$  de acetonitrila e injetados diretamente no equipamento.

### Processamento de dados da CLAE-EM

Os dados foram processados no pacote XCMS rodando na plataforma R (3.2/.3, R Foundation for Statistical Computing) (Smith et al., 2006). Para os dados CLAE-EM, o método centWave foi usado para pico de amostragem e os parâmetros XCMS foram: faixa de largura

do pico cromatográfico (largura de pico = 330), corte sinal-ruído (snthresh = 5,0) e largura de banda (bw = 10 e 5 primeiro e segundo grupo, respectivamente).

### **Identificação dos compostos a partir da CLAE-EM**

A tabela com características moleculares foi obtida, contendo os tempos de retenção alinhados, razão  $m/z$  e intensidades. A identificação putativa do metabólito foi realizada pesquisando-se o  $m/z$  no banco de dados Metlin (<http://metlin.scripps.edu>) usando  $[M + H]$ ,  $[M + 2H]$ ,  $[M + ACN+H]$  e  $[M + Na]$  como possíveis adutos e 5 ppm como erro máximo. O banco de dados Metlin não apresenta alguns metabólitos secundários com estruturas mais complexas e específicos da *L. meyenii*, dificultando a identificação de metabólitos altamente especializados. Por isso, para a identificação dos metabólitos também foi utilizada uma compilação de informações disponíveis sobre as massas esperadas e experimentais de alta resolução dos compostos já identificados da *L. meyenii*, incluindo as faixas  $m/z$  esperadas para os adutos mais comuns na análise HPLC-MS:  $[M + H]^+$  e  $[M + Na]^+$ , como descrito em CARVALHO; RIBEIRO (2019), presente no apêndice A desse trabalho.

#### **4.6.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)**

As análises CG-EM foram realizadas em um sistema de cromatografia gasosa (modelo 7890 A, Agilent Technologies, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo (modelo 5975 C inertes XL, Agilent Technologies). Uma coluna HP-5MS (30 m de comprimento, 0,25 mm i.d., com filme de 0,25  $\mu\text{m}$  composto por 95% de dimetil e 5% de difenil polissiloxano da Agilent Technologies) e hélio a 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de fluxo foram usados. O injetor da CG foi mantido a 250  $^{\circ}\text{C}$  e as amostras foram injetadas com separação 1:10, utilizando He a 10  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura inicial do forno era de 60  $^{\circ}\text{C}$ , e 1 min após a injeção, a temperatura aumentava à taxa de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para atingir uma temperatura final de 300  $^{\circ}\text{C}$ . A temperatura da linha de transferência do detector foi estabelecida em 290  $^{\circ}\text{C}$ , a fonte de filamento a 230  $^{\circ}\text{C}$  e o quadrupolo a 150  $^{\circ}\text{C}$ . Os íons foram gerados por um 70 eV. O espectrômetro de massa foi operado em modo de varredura completa (50-600  $m/z$ ). Inicialmente, um miligrama de extratos secos foi dissolvido em acetonitrila de grau HPLC (1,0  $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para preparar uma solução estoque (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Para análises CG-EM, 150  $\mu\text{L}$  da solução estoque foi evaporada usando um concentrador a vácuo (Thermo Scientific SPD1010, EUA) e derivatizados usando um protocolo previamente otimizado (CANUTO et al., 2017). Resumidamente, a oximação foi realizada com 10  $\mu\text{L}$  de o-metoxiamine (15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em piridina, os tubos de reação foram mantidos à

temperatura ambiente por 90 min; seguido por sililação com 10 mL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) mais 1% (v/v) trimetilclorosilane (TMCS). Em seguida, as amostras foram mantidas por 30 min a 40 °C em banho termostático (ECO SILVER RE 1225, Lauda, Brasil). As amostras derivatizadas foram diluídas em 100 µL de heptano com éster metílico em C13 como padrão interno e analisadas por CG-EM.

### **Processamento de dados e identificação dos compostos a partir da CG-EM**

Os dados brutos foram processados pelo software ChromaTOF 2.0 (Leco Instruments), seguido pelo alinhamento dos cromatogramas usando o software MetAlign. O MSClust foi utilizado para remover a redundância do sinal do metabólito em tabelas alinhadas de pico de massa e recuperar informações espectrais de massa dos metabólitos usando o agrupamento de pico de massa. Os espectros de massa das massas representativas foram utilizados para identificação por tentativa de combinação com bibliotecas espectrais (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia [NIST08] e banco de dados do metaboloma Golm [<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>]) e por comparação com o índice de retenção calculado usando uma série de alcanos.

## **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA**

Os dados normalizados, obtidos a partir da CLAE- EM, da CG-EM, bem como de todos os resultados das atividades biológicas testadas, foram carregados no MetaboAnalyst 2.0, um software analítico disponível on-line para estudos de metabolômica de alto rendimento (<http://www.metaboanalyst.ca>). Antes da análise dos dados, uma verificação de integridade dos dados foi realizada para garantir que todas as informações necessárias estivessem presentes. A normalização em linha foi realizada para permitir o ajuste geral das diferenças entre as amostras. A transformação de log e o dimensionamento automático foram realizados para permitir a comparação de recursos. A análise uni e multivariada foi realizada usando dados transformados em log e auto- dimensionados. A análise estatística multivariada permitiu a comparação da variação da composição de metabólitos em cada extrato bem como a correlação entre os metabólitos identificados e cada atividade biológica testada.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Nesse estudo, a atividade antioxidante foi expressa em  $IC_{50}$ , que representa a concentração do extrato que reduz a absorvância inicial da solução de DPPH em 50%. Portanto, quanto maior a capacidade de captação do DPPH pelos componentes antioxidantes do extrato, menores serão os valores de  $IC_{50}$  (SANTOS et al., 2018).

A atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) dos extratos obtidos a partir da maca peruana desidratada variou de 64,97 para o extrato MPAE até 851,36  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato MPE. Os extratos MPH e o MPE2 não apresentaram atividade ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

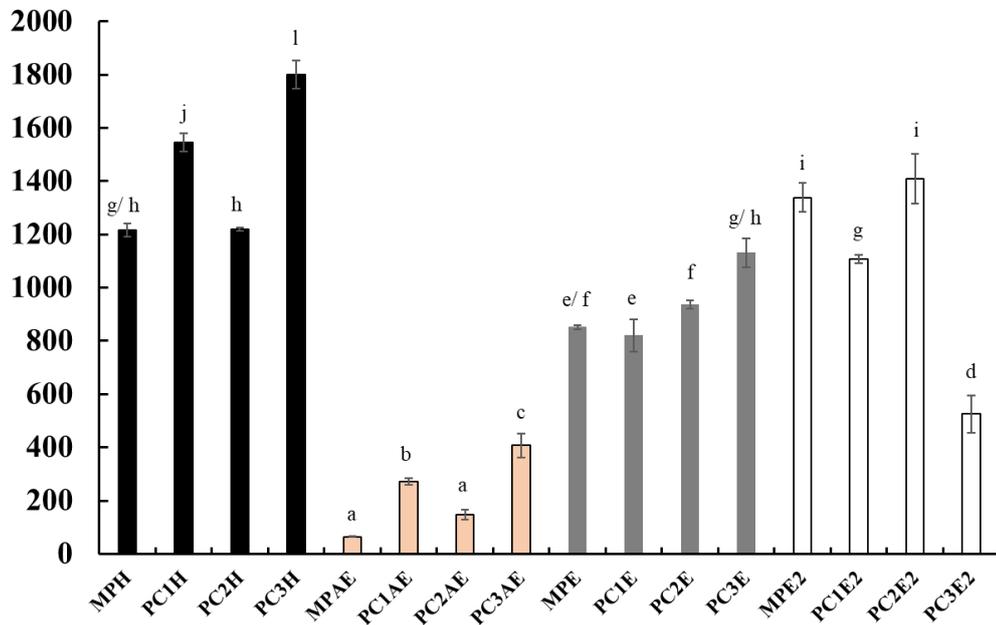
A atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) dos extratos obtidos a partir do produto comercial 1 variou de 272,30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato PC1AE até 820,54  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato PC1E, os extratos PC1H e PC1E2 não apresentaram atividade ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) dos extratos obtidos a partir do produto comercial 2 variou de 147,35  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato PC2AE até 935,616  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato PC2E. Os extratos PC2H e PC2E2 não apresentaram atividade ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) dos extratos obtidos a partir do produto comercial 3 variou de 406,91  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato PC3AE e 525,471  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato PC3E2. Os extratos PC3H e o PC3E2 não apresentaram atividade ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 3).

Desse modo, o acetato de etila foi o solvente que melhor extraiu metabólitos com um potencial antioxidante, uma vez que os extratos em acetato de etila dos três produtos comerciais e da *L. meyenii* desidratada foram os que tiveram maior atividade antioxidante.

**Figura 3.** Atividade antioxidante dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais (IC<sub>50</sub>)



Barras em preto = extratos em hexano. Barras em amarelo = extratos em acetato de etila. Barras em cinza = extratos etanólicos 1. Barras em branco = extratos etanólicos 2. MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. IC<sub>50</sub> do ácido gálico (controle positivo) = 1,69± 0,02 µg·mL<sup>-1</sup>. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Nos extratos da maca peruana desidratada a quantidade de fenóis totais no extrato MPH foi de 13,46 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato MPAE foi de 34,69 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato MPE foi de 37,75 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato e no extrato MPE2 foi de 14,93 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato (Figura 4).

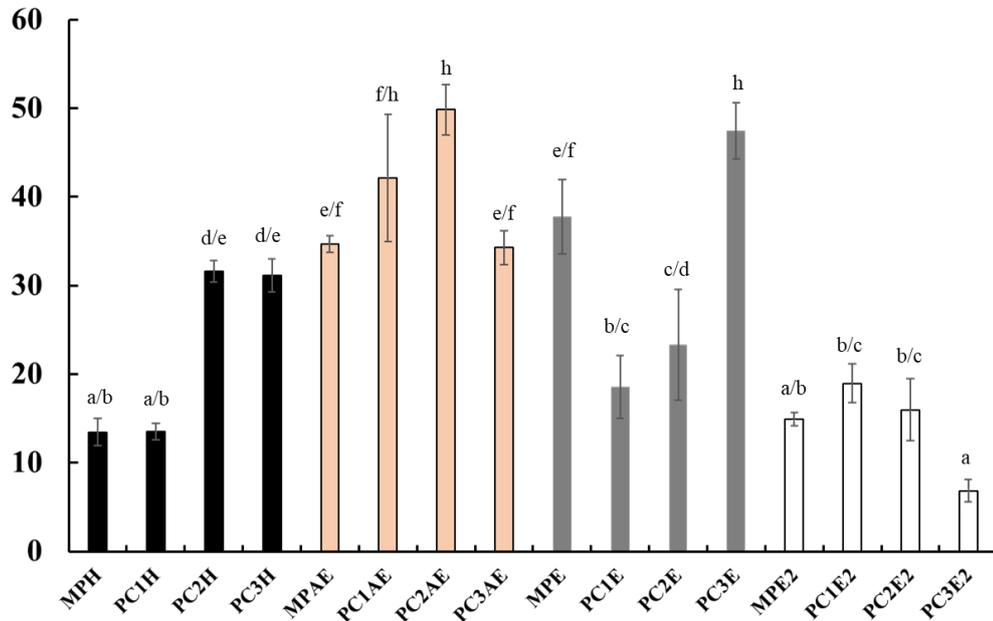
Nos extratos do produto comercial 1 a quantidade de fenóis totais no extrato PC1H foi de 13,46 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato PC1AE foi de 42,16 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato PC1E de 18,53 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato e no extrato PC1E2 foi de 18,97 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato.

Nos extratos do produto comercial 2 a quantidade de fenóis totais no extrato PC2H foi de 31,64 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato PC2AE foi de 49,84 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato PC2E foi de 23,32 mg EAG/g de extrato e no extrato PC2E2 foi de 15,98 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato.

Nos extratos do produto comercial 3 a quantidade de fenóis totais no extrato PC3H foi de 31,13 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no extrato PC3AE foi de 34,26 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato, no

extrato PC3E foi de 47,45 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato e no extrato PC3E2 foi de 6,83 mg·EAG·g<sup>-1</sup> de extrato.

**Figura 4.** Quantificação de fenóis totais dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais



Barras em preto = extratos em hexano. Barras em amarelo = extratos em acetato de etila. Barras em cinza = extratos etanólicos 1. Barras em branco = extratos etanólicos 2. MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

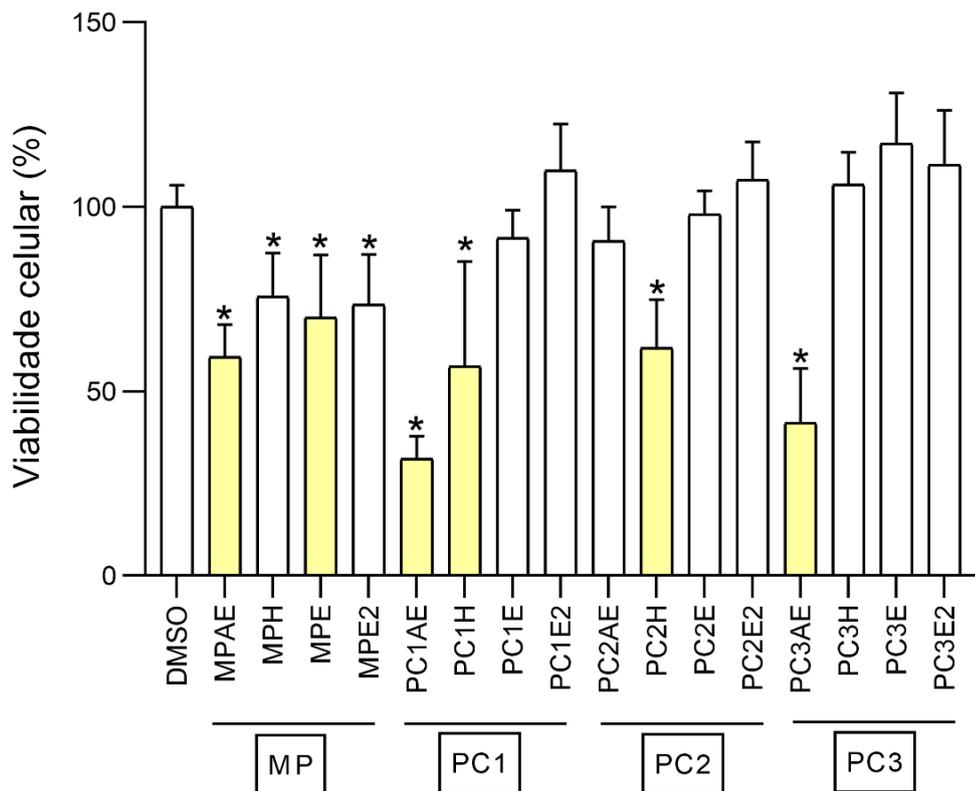
Os extratos que tiveram maior atividade antioxidante foram MPAE e PC2AE, ambos não tiveram diferença estatisticamente significativa, seguido do extrato PC1AE e PC3AE. Porém em relação a quantificação dos fenóis totais de uma forma geral, esses quatro extratos apresentaram os maiores teores de fenóis totais, porém não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si nem quando comparados a outros extratos como o PC3E, MPE, PC3H e PC2H. Portanto, apesar dos compostos fenólicos influenciarem o potencial antioxidante dos extratos, outros metabólitos também estão contribuindo para a atividade antioxidante dos extratos da *L. meyenii*.

## 5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Inicialmente todos os extratos foram testados na concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  frente as células C6. No grupo MP todos os extratos apresentaram redução do percentual de células viáveis estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, sendo que MPAE e MPE foram os mais ativos, a viabilidade das células tratadas com o extrato MPAE foi de 59,29% e

com o extrato MPE foi de 70,03%. No grupo PC1, PC1AE e PC1H foram os extratos mais ativos, os demais extratos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle, a viabilidade das células tratadas com o extrato PC1AE foi de 31,74% e com o extrato PC1H foi de 56,70%. No grupo PC2, PC2H apresentou atividade os demais extratos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle a viabilidade das células tratadas com o extrato PC2H foi de 61,68%. No grupo PC3, PC3AE apresentou atividade os demais extratos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle a viabilidade das células tratadas com o extrato PC3AE foi de 41,46% (Figura 5). Portanto os extratos de *L. meyenii* apresentaram efeito tóxico para as células e induziram a redução na viabilidade das células C6. A partir dos resultados obtidos os extratos mais ativos foram escolhidos para a realização dos ensaios subsequentes.

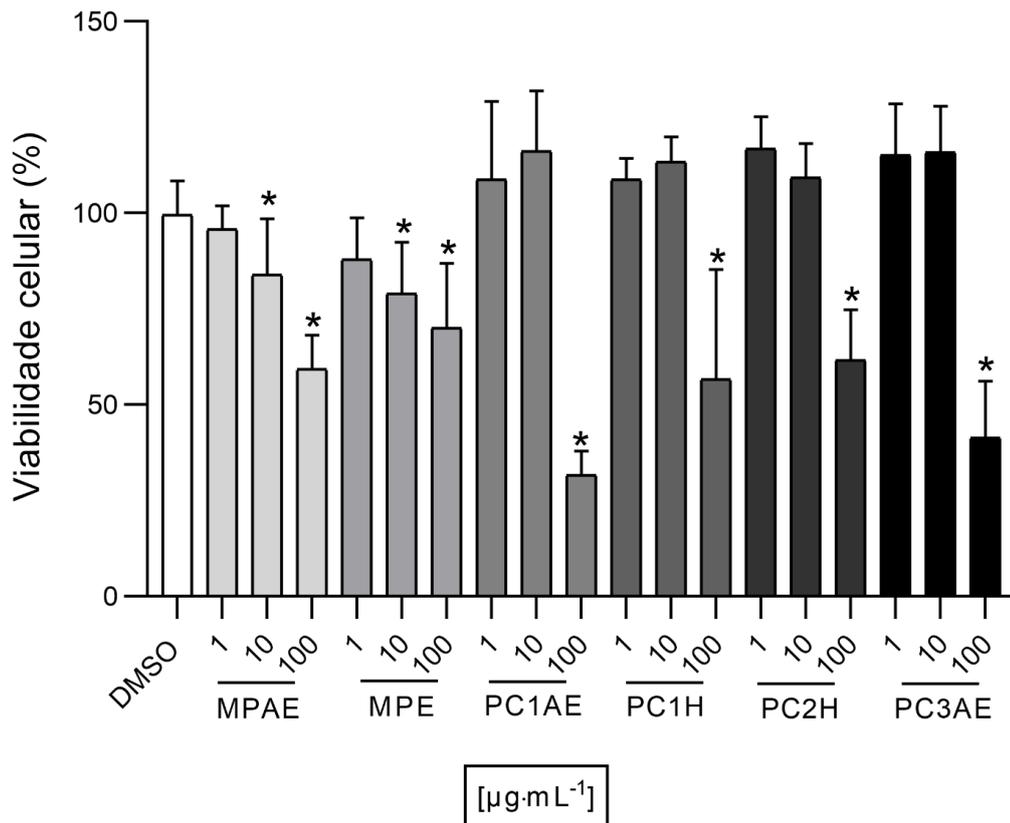
**Figura 5.** Viabilidade de células C6 mensurada pelo teste do MTT após 24h de exposição a extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )



MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. Os resultados foram expressos como a média dos percentuais derivados de três ensaios com oito replicatas em cada,  $n=24$ . Não houve diferença estatística entre os extratos MPAE e MPE após comparação pelo teste de Tukey. O teste de Tukey foi utilizado para comparação entre os grupos tratados e o grupo controle ( $\text{DMSO } 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (\* $p < 0.05$ ).

Oito extratos foram considerados tóxicos para as células C6 (MPAE, MPH, MPE, MPE2; PC1AE, PC1H, PC2H e PC3AE) porém, foram selecionado seis extratos mais ativos (MPAE, MPE, PC1AE, PC1H, PC2H e PC3AE) e a partir desse resultado esses extratos mais ativos foram testados em concentrações mais baixas (1 e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Nenhum extrato na concentração de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, portanto nessa concentração os extratos não apresentaram citotoxicidade em células C6. Os extratos MPAE e MPE na concentração de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  induziram redução da viabilidade das células C6. A viabilidade das células tratadas com o extrato MPAE (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi de 84,00% e do extrato MPE (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi de 79,07%. Os demais extratos na concentração de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 6).

**Figura 6.** Viabilidade de células C6 mensurada pelo teste do MTT após 24h de exposição a extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais (1,10 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

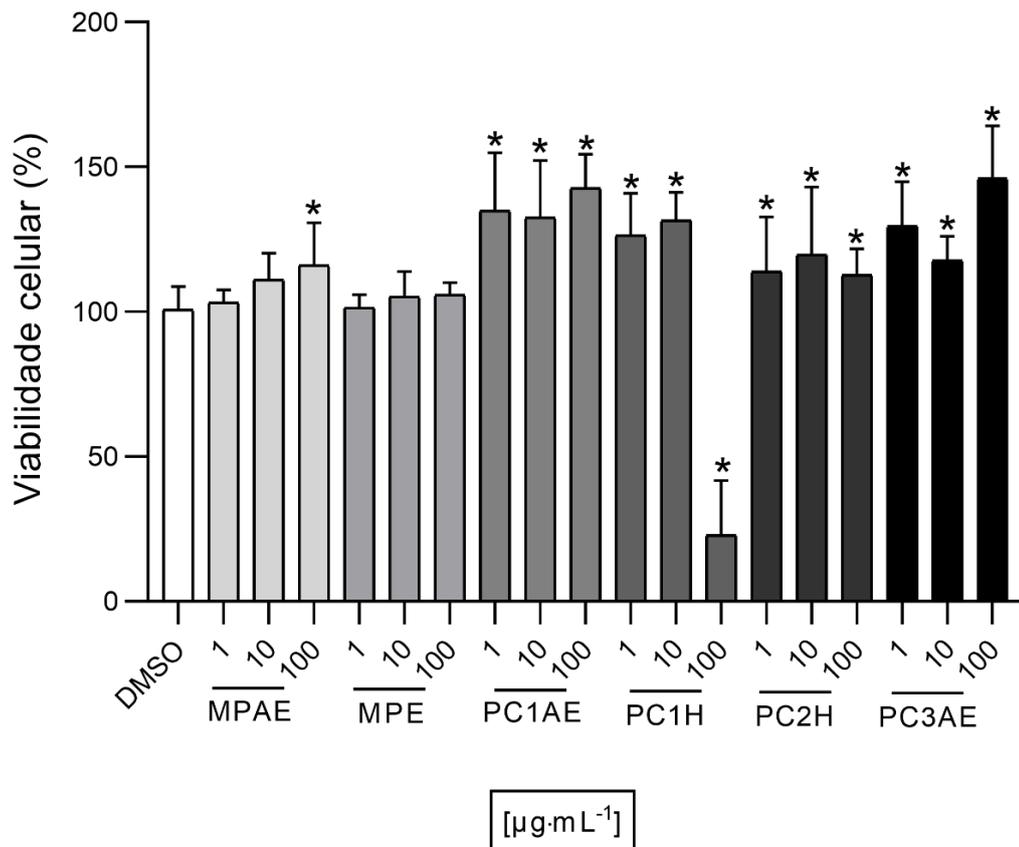


MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. Os resultados foram expressos como a média dos percentuais derivados de três ensaios com oito replicatas em cada, n=24. O teste de Tukey foi utilizado para comparação entre os grupos tratados e o grupo controle (DMSO 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (\*p < 0.05).

Os seis extratos mais ativos (MPAE, MPE, PC1AE, PC1H, PC2H e PC3AE) foram testados em três concentrações diferentes (1,10 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para avaliar a citotoxicidade em

astrócitos. Nenhum extrato reduziu a viabilidade dos astrócitos em comparação ao grupo controle, exceto pelo extrato PC1H ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) que apresentou efeito tóxico para os astrócitos e a viabilidade das células foi de 22,83%. Portanto exceto o extrato PC1H, os demais extratos testados apresentaram toxicidade em células C6 mas não foram tóxicos para astrócitos (Figura 7).

**Figura 7.** Viabilidade de astrócitos mensurada pelo teste do MTT após 24h de exposição a extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais (1,10 e  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

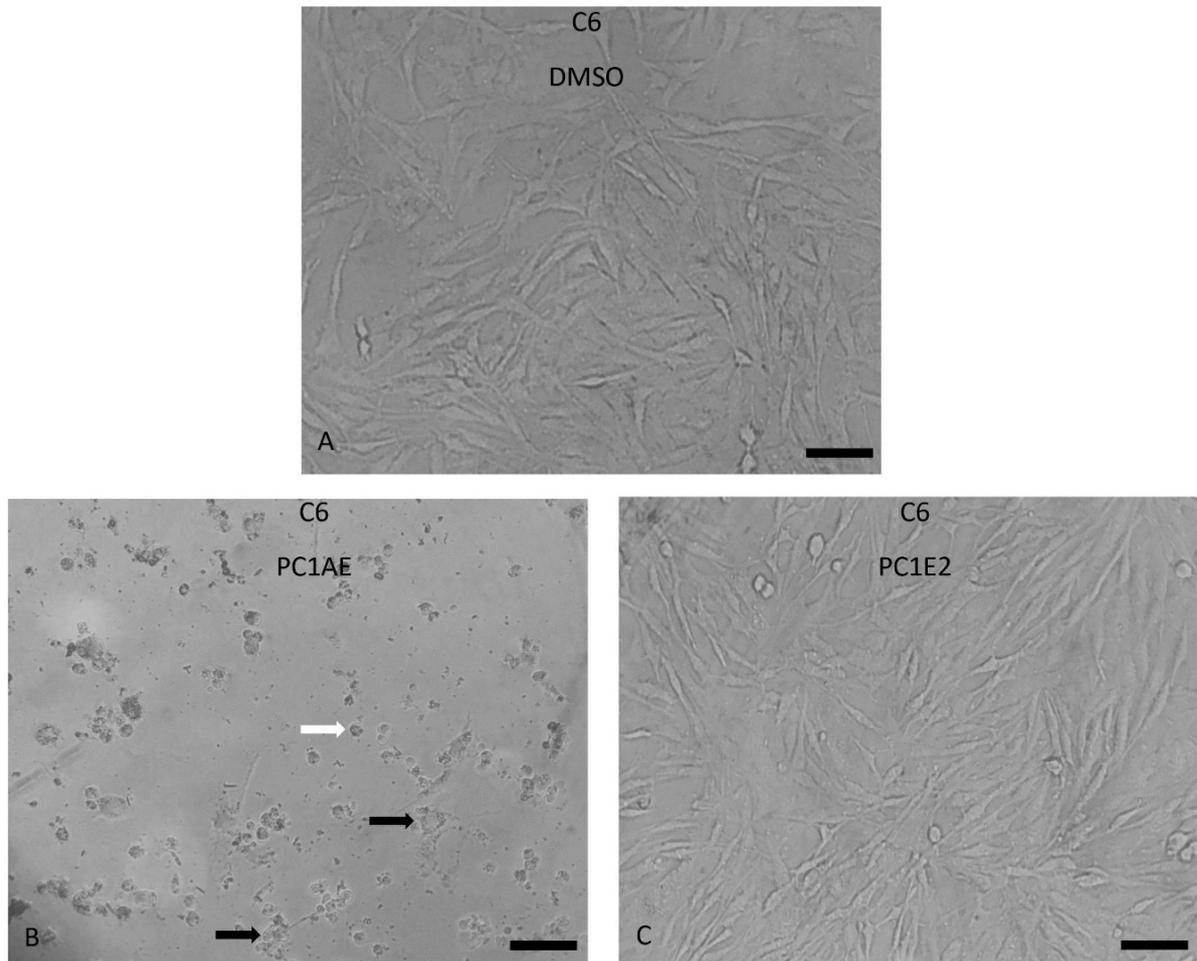


MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. Os resultados foram expressos como a média dos percentuais derivados de três ensaios com oito replicatas em cada,  $n=24$ . O teste de Tukey foi utilizado para comparação entre os grupos tratados e o grupo controle ( $\text{DMSO } 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (\* $p < 0.05$ ).

### 5.2.1 Avaliação da morfologia celular e celularidade após tratamento com os extratos

A citotoxicidade nas células C6 causada pelo tratamento pôde ser analisada pela microscopia de contraste de fase e em todos os extratos considerados tóxicos para C6 foi observado redução da celularidade, perda do tapete celular e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas e a presença de *debris* celulares (Figura 8B). Já com os extratos que não foram tóxicos não foi visto redução da celularidade, sendo possível observar uma monocamada celular homogênea e confluyente semelhante ao grupo não tratado (Figura 8C).

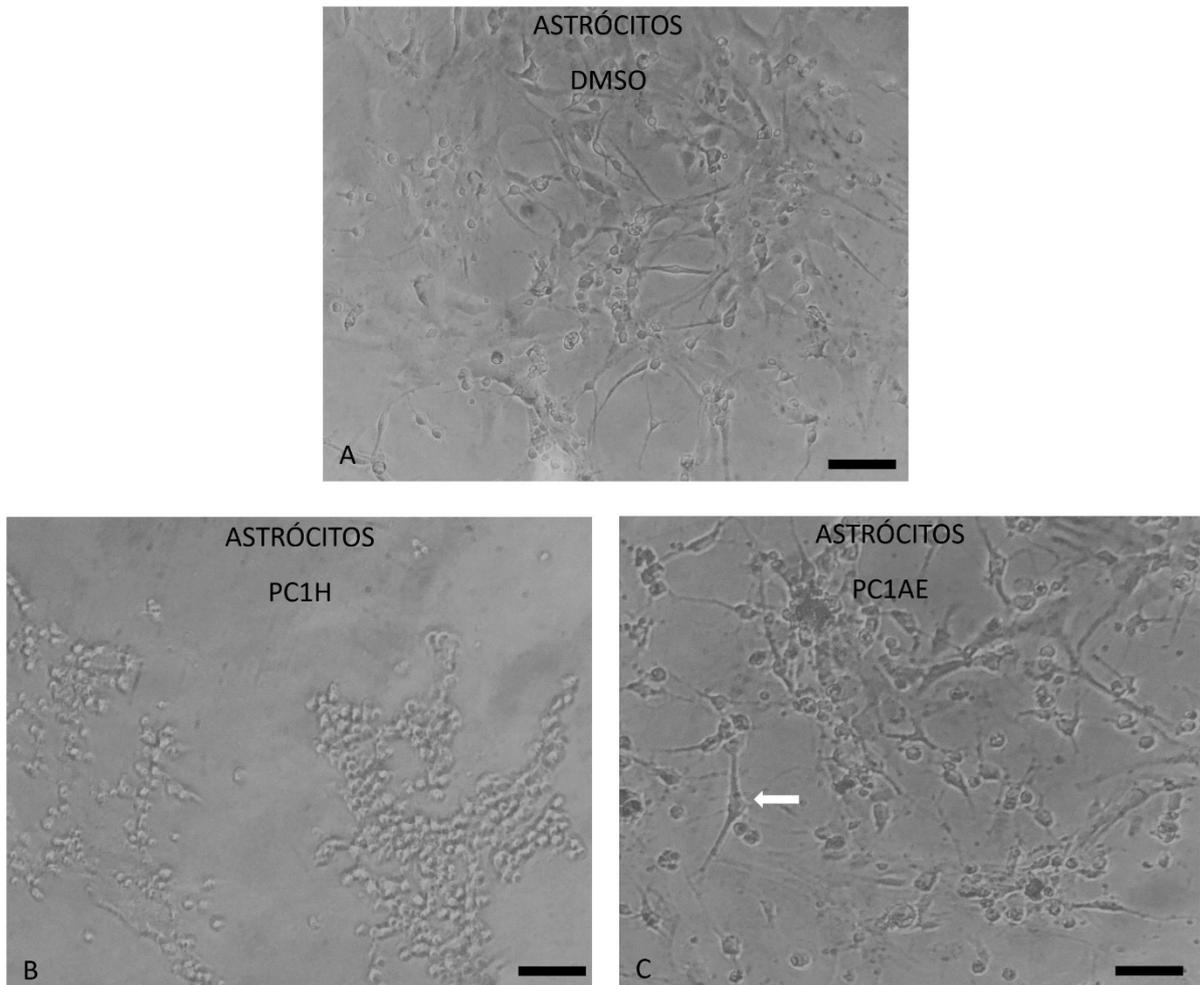
**Figura 8.** Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 tratadas com os extratos PC1AE e PC1E2 da *L. meyenii* ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e células C6 não tratadas (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) após um período de 24 horas



PC1= Produto comercial 1; AE= acetato de etila; E2 = Extrato etanólico 2. (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A= Células não tratadas. B= Células tratadas com o extrato mais tóxico (PC1AE). É possível observar que após o tratamento houve redução da celularidade, perda do tapete celular e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas, indicada pela seta branca e presença de debris celulares indicados setas pretas. C= Células tratadas com extrato não tóxico (PC1E2). Após o tratamento é possível observar uma monocamada celular homogênea e confluyente semelhante ao grupo não tratado. Barra =  $50 \mu\text{m}$ . \*As imagens de todos os tratamentos encontram-se no apêndice B.

Dentre os extratos testados com os astrócitos apenas um extrato (PC1H) apresentou citotoxicidade na concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e os efeitos na morfologia celular foram analisados pela microscopia de contraste de fase e foi observado redução da celularidade, perda do tapete celular e mudança na morfologia celular de poligonais para arredondadas (Figura 9B). Já os demais extratos testados não foram tóxicos e não foi visto redução da celularidade, sendo possível observar uma monocamada celular homogênea e confluyente de células poligonais planas e achatadas semelhante ao grupo não tratado e a presença de astrócitos retraídos e emitindo prolongamentos (Figura 9C).

**Figura 9.** Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de astrócitos tratados com os extratos PC1AE e PC1H da *L. meyenii* ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e astrócitos não tratados (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) após um período de 24 horas



PC1= Produto comercial 1; AE= acetato de etila; H= hexano. (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A= Células não tratadas. B= Células tratadas com extrato tóxico (PC1H). O extrato PC1H foi o único extrato tóxico para astrócitos e após o tratamento observou-se redução da celularidade, perda do tapete celular e mudança na morfologia celular de poligonais para arredondadas. C= Células tratadas com extrato não tóxico (PC1AE). Observar-se que após o tratamento não houve redução da celularidade e é possível observar uma monocamada celular homogênea e confluyente de células poligonais planas e achatadas semelhante ao grupo não tratado. A seta branca indica astrócito retraído e emitindo prolongamento. Barra =  $50 \mu\text{m}$ . \*As imagens de todos os tratamentos encontram-se no apêndice B.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Em relação aos extratos do produto comercial 1, os extratos PC1AE, PC1E e PC1E2 apresentaram atividade frente ao *M. luteus* ( $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e o extrato PC1E2 apresentou atividade frente ao *B. cereus* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Em relação aos extratos do produto comercial 2, os extratos PC2AE ( $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e os extratos PC2E e PC2E2 ( $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) apresentaram atividade frente ao *M. luteus*. Em relação

aos extratos do produto comercial 3, o extrato PC3E apresentou atividade frente ao *B. cereus* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Em relação aos extratos da maca peruana desidratada, o extrato MPAE apresentou atividade frente *M. luteus* ( $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) apresentados correspondem à atividade bacteriostática, uma vez que nenhum dos extratos apresentou atividade bactericida após subcultura em nutriente ágar. Nenhum extrato apresentou atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram negativas *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, e as leveduras *C. albicans* e *C. glabrata* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Atividade antibacteriana dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais

Amostra	Extrato	Gram-positiva	
		<i>M. luteus</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<i>B. cereus</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
PC1	PC1H	n.a	n.a
	PC1AE	<b>125</b>	n.a
	PC1E	<b>125</b>	n.a
	PC1E2	<b>125</b>	<b>500</b>
PC2	PC2H	n.a	n.a
	PC2AE	<b>62,5</b>	n.a
	PC2E	<b>125</b>	n.a
	PC2E2	<b>125</b>	n.a
PC3	PC3H	n.a	n.a
	PC3AE	n.a	n.a
	PC3E	n.a	<b>500</b>
	PC3E2	n.a	n.a
MP	MPH	n.a	n.a
	MPAE	<b>62,5</b>	n.a
	MPE	n.a	n.a
	MPE2	n.a	n.a
	Cloranfenicol	12,5	6,25

PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; MP= Maca peruana desidratada; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico. n.a= não ativo. Os resultados estão representados em concentração inibitória mínima (CIM).

## 5.4 PERFIL METABOLÔMICO

Sessenta e um metabólitos foram identificados por CLAE-EM (Tabela 5), enquanto que quinze metabólitos foram identificados por CG-EM (Tabela 6). Foram identificados quinze ácidos graxos, onze macamidas, dez alcaloides, dois flavonoides, dois fosfolipídios, cinco glicosídeos e cinco terpenos, dentre outros.

**Tabela 5.** Metabólitos identificados por CLAE-EM da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais

CLASSE	NOME	RT (min)	FÓRMULA	MASSA	ADUTO
Ácidos graxos	ácido 9-oxo-10E,12E-octadecadienoico	17.50	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	295.2260	[M+H] <sup>+</sup>
	ácido 5-oxo-6E,8E-octadecadienoico <sup>a</sup>	17.96	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	317.2095	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido 2-oxonadecanoico	19.45	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	335.2558	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido eicosanoico	19.45	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	335.2928	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido esteárico	22.05	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	307.2600	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido palmítico	24.07	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	257.2470	[M+H] <sup>+</sup>
	ácido palmitoleico	12.80	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	277.2130	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido docasanoico	14.20	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	363.3265	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido linoleico	18.46	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	303.2292	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido oleico	22.23	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	305.2466	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido elaídico	22.23	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	305.2466	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico	23.43	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	381.3302	[M+H] <sup>+</sup>
Ácido orgânico	ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico	0.086	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	235.1280	[M+H] <sup>+</sup>
Alcaloides	lepidilina a	1.69	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub>	313.1459	[M+H] <sup>+</sup>
	lepidilina b	9.44	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub>	291.1858	[M-Cl] <sup>+</sup>
	lepidilina c	9.33	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O	307.1821	[M-Cl] <sup>+</sup>
	lepidilina d	10.10	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O	321.1975	[M-Cl] <sup>+</sup>
	benzosimulina	1.48	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	306.1482	[M+H] <sup>+</sup>
	licoperosídeo D	19.10	C <sub>39</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>12</sub>	370.7337	[M+2H] <sup>2+</sup>
	o-metilsomniferina	1.69	C <sub>37</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	312.1407	[M+2H] <sup>2+</sup>
	sinapoispermina	18.77	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	450.3054	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
	xantoplanina	18.92	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub>	357.1954	[M+H] <sup>+</sup>
Alcaloide diterpênico	septentriodina	15.28	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub>	701.3682	[M+H] <sup>+</sup>
Amida	estearamida	21.30	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	306.2753	[M+Na] <sup>+</sup>
Fitoesterol	avenasterol	22.92	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	435.3624	[M+Na] <sup>+</sup>

Flavanoídes	icaritin 3-ramnosida	0.086	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	533.2035	[M+H] <sup>+</sup>
	3-geranil-4,2',4',6'-tetrahidroxi-5-prenildiidrochalcona	19.48	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	479.2774	[M+H] <sup>+</sup>
Fosfolípídios	fitosfingosina	22.24	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub>	340.2813	[M+Na] <sup>+</sup>
	d-manosil-1-raminosil-d-galactose-1-difosfolípídio	19.11	C <sub>73</sub> H <sub>122</sub> O <sub>21</sub> P <sub>2</sub>	699.4050	[M+2H] <sup>2+</sup>
Glicerolípídio	1-hexilglicerol	8.96	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	195.1329	[M+Na] <sup>+</sup>
Glicolípídio	gingerglicolípídio B	15.28	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub> O <sub>14</sub>	701.3682	[M+Na] <sup>+</sup>
Glicosídeos	1,2,10- óxido de trihidroxiidro-trans-linalil 7-O-β-D-glicopiranosídeo	2.83	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	192.0992	[M+2H] <sup>2+</sup>
	1-O-(8R-hidroxi-8-metil-3Z,9-decadienoil)-β-D-glicopiranosídeo	2.03	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	181.0963	[M+2H] <sup>2+</sup>
	cis-3-hexenil b-primeverosídeo	1.67	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	395.1900	[M+H] <sup>+</sup>
	rutinosídeo de fenetil	0.086	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	453.1735	[M+Na] <sup>+</sup>
	rebaudiosídeo F	0.086	C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> O <sub>22</sub>	978.4551	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
Hidantoina	meyenihidantoina A	9.01	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	261.1244	[M+H] <sup>+</sup>
Lignana	argenteana	0.086	C <sub>40</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	696.3530	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
Macamidas	n-benzil octanamida	14.79	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO	234.1840	[M+H] <sup>+</sup>
	n-benzilpentadecanamida	24.22	C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> NO	332.2956	[M+H] <sup>+</sup>
	macamida B	20.41	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> NO	346.3107	[M+H] <sup>+</sup>
	n-benzil-heptadecanamida	22.92	C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> NO	360.3264	[M+H] <sup>+</sup>
	n-benzil-(9Z,12Z)-octadecadienamida	24.19	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> NO	370.3106	[M+H] <sup>+</sup>
	n-benzil-9Z-octadecanamida <sup>b</sup>	21.83	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO	372.3267	[M+H] <sup>+</sup>
	n-(3-metoxibenzil)-hexadecanamida <sup>c</sup>	19.27	C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	376.3205	[M+H] <sup>+</sup>
	n-benzil-5-oxo-6E,8E-octadecadienamida <sup>d</sup>	20.36	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	384.2901	[M+H] <sup>+</sup>
	n-benzil-9-oxo-12Z-octadecanamida	21.92	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	386.3047	[M+H] <sup>+</sup>
	mamamide B	13.78	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>3</sub>	398.2685	[M+H] <sup>+</sup>
Naftoquinona	n-(3-metoxibenzil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida	22.82	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	398.3078	[M+H] <sup>+</sup>
	filoquinona (vitamina K1)	18.78	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	451.3572	[M+H] <sup>+</sup>
Policetídeo	uvaricina	18.47	C <sub>39</sub> H <sub>68</sub> O <sub>7</sub>	671.4893	[M+Na] <sup>+</sup>
Terpenos	3-β-acetoxi-19 α-hidroxi-12-urseno	21.27	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	526.4275	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
	cassaidina	20.54	C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>4</sub>	449.3350	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
	hiperforina	17.63	C <sub>35</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	559.3770	[M+Na] <sup>+</sup>

	monoanidrohidroxiloxantina	23.79	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O	549.4113	[M+H] <sup>+</sup>
	pirohiperforina	17.70	C <sub>35</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	576.4062	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
Tiohidantoina	macahidantoina A	1.23	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> OS	261.1048	[M+H] <sup>+</sup>
Outros	acetoxi-6-gingerol	18.78	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	378.2254	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
	pentahomometionina	20.37	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> S	261.1638	[M+ACN+H] <sup>+</sup>
	piperidina	23.00	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N	108.0788	[M+Na] <sup>+</sup>
	ácido n-estearoil glutâmico	18.83	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	436.3032	[M+Na] <sup>+</sup>

As letras em sobescrito identificam os metabólitos que possuem isômeros. a= ácido 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoico; b= n-benziloleamida; c= anandamida; d= n-benzil-9-oxo-(12Z,15Z)-octadecadienamida, n-benzil-13-oxo-(9E,11E)-octadecadienamida, n-benzil-9-oxo-10E,12E-octadecadienamida, n-benzil-9-oxo-10E,12Z-octadecadienamida.

**Tabela 6.** Metabólitos identificados por CG-EM da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais

CLASSE	NOME	RT (min)	FÓRMULA	MASSA
Ácido carboxílico	ácido pirúvico	7.58	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	88.0160
Ácidos fenólico	ácido vanílico	15.56	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168.0422
Ácidos graxos	ácido mirístico	18.45	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228.2089
	9-octadecenoato de etila	19.67	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	310.2872
	ácido hexadecanóico, ester etílico	17.97	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284.2715
Ácido orgânico	ácido glicérico	10.20	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	106.0266
Aminoácido	l-valina	8.60	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117.0790
Hidroxiácidos	ácido láctico	6.31	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	90.0317
	ácido málico, éster tris (trimetilsilil)	12.29	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>3</sub>	350.1401
Outros	linoleato de metila	20.04	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292.2402
	ácido linoleico, éster etílico	18.94	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	308.2715
	glicerol	9.43	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92.0473
	l-prolina, 1-(trimetilsilil), trimetilsilil éster	9.79	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	259.1424
	ácido p-hidroxibenzóico	13.30	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.0317
	1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina, 1-benzil-6,7-dimetoxi	21.83	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	283.1572

A partir dos dados obtidos foi realizada a análise multivariada, que compila técnicas estatísticas permitindo a análise de mais de duas variáveis simultaneamente. Sendo ideal para análises exploratórias em estudos que utilizam diversas amostras e muitos resultados são obtidos de cada amostra. O conjunto de técnicas da análise multivariada tende a simplificar os resultados e permitem a análise das relações entre as variáveis de maneira abrangente (MÉLOT, 2005; MUKHOPADHYAY, 2008; RENCHER, 2005). As técnicas adotadas nesse trabalho foram análise de componentes principais (PCA), análise de agrupamento hierárquico e análise de correlação.

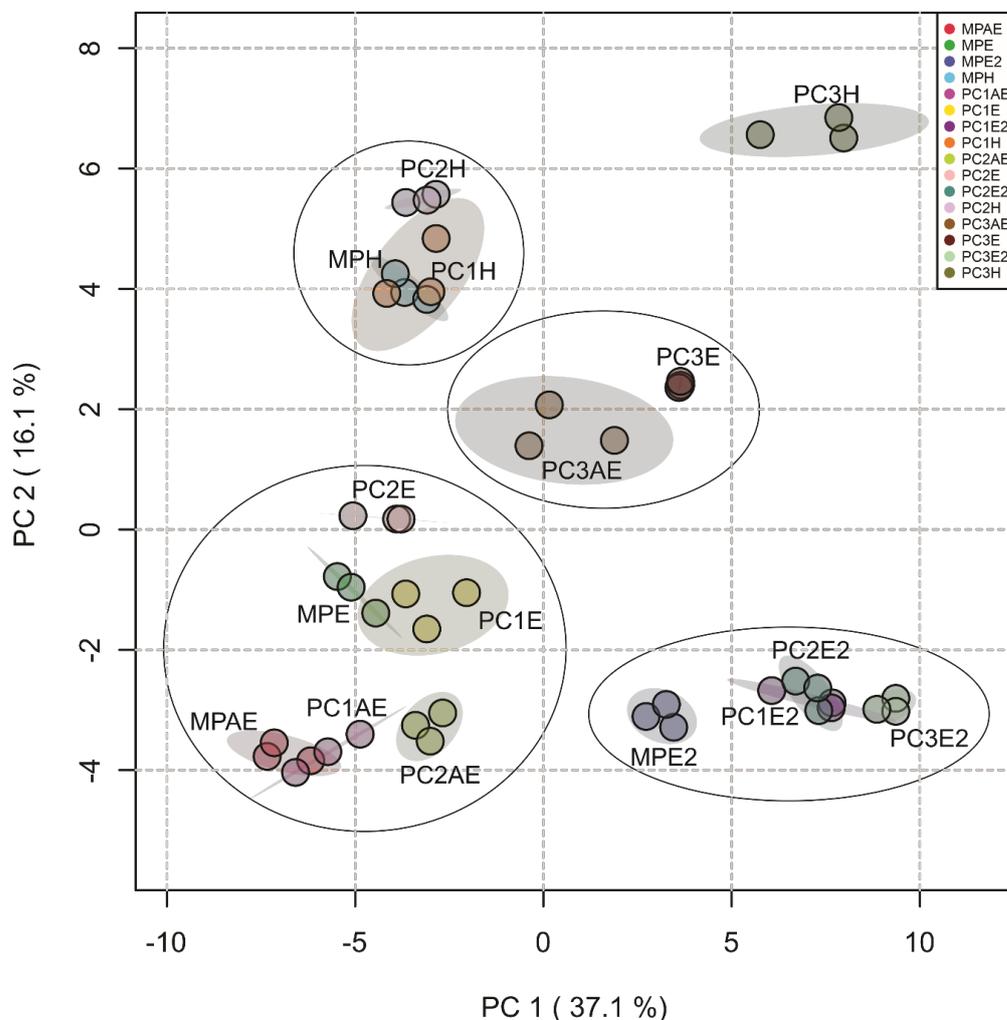
A PCA permite a análise de uma grande quantidade de dados/variáveis, identifica os fatores responsáveis pelas maiores variações entre os resultados e agrupa indivíduos similares de forma visual em dispersões gráficas (JOLLIFE; CADIMA, 2016). Para isso, as variáveis originais são transformadas em um novo conjunto de variáveis, os componentes principais, essa transformação é uma redução das variáveis originais sem causar perdas relevantes de informações, facilitando a interpretação dos resultados. O primeiro componente explica a maioria da variação entre os dados, seguido do segundo componente que explica a segunda maior variação. Portanto os dois primeiros componentes já explicam 50% a 70% da variação entre os dados (JOLLIFE; CADIMA, 2016).

A PCA foi aplicada no conjunto total de metabólitos identificados. O componente principal 1 explicou 37,1% da variância total, enquanto o componente principal 2 explicou 16,1% da variância total (Figura 10). A maior parte da variação na composição dos metabólitos pode ser atribuída aos diferentes solventes usados na extração, pois a polaridade do solvente vai afetar no tipo de metabólito que será extraído, o que vai interferir diretamente na composição do extrato.

Há quatro grandes agrupamentos entre os extratos. O primeiro agrupamento é formado pelos extratos em acetato e etanólicos 1 da maca desidratada e dos produtos comerciais 1 e 2 (MPAE, PC1AE, PC2AE, MPE, PC1E e PC2E), o segundo agrupamento é formado pelos extratos em acetato e etanólicos 1 do produto comercial 3 (PC3AE e PC3E), o terceiro agrupamento é formado pelos extratos em hexano da maca desidratada e dos produtos comerciais 1 e 2 (MPH, PC1H e PC2H) e o quarto agrupamento é formado pelos extratos etanólicos 2 (MPE2, PC1E2, PC2E2 e PC3E2), além disso o PC3H não se agrupa com os demais extratos. Quanto maior a proximidade dos extratos na figura maior é a semelhança da

composição de metabólitos entre eles. Desse modo, sugere-se que a composição de metabólitos tem maior similaridade entre cada agrupamento (Figura 10).

**Figura 10.** Análise de componentes principais (PCA) a partir dos metabólitos da raiz *L. meyenii* e seus produtos comerciais, identificados através da CLAE-EM e GC-EM



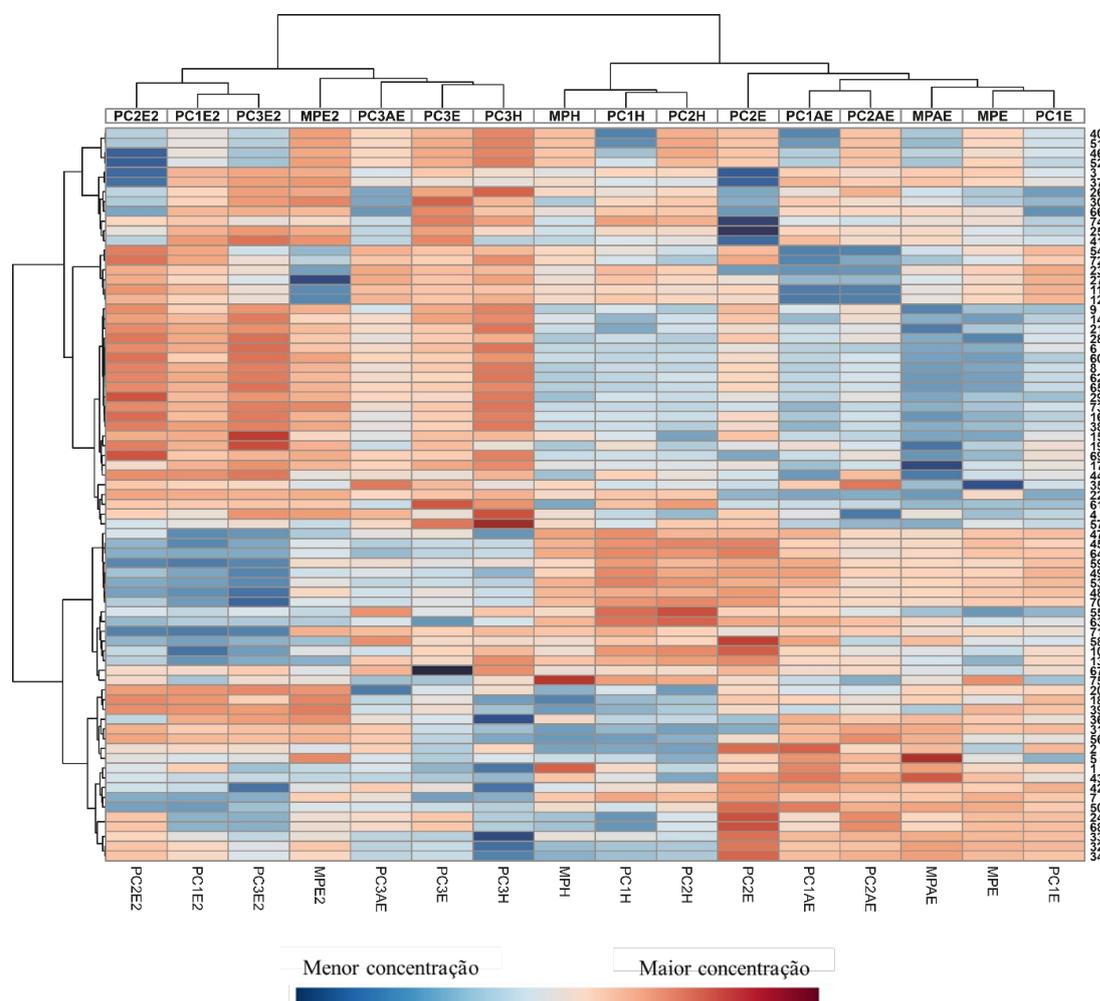
MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; AE= acetato de etila; E= Etanol (extratos etanólico 1); E2= Etanol 2 (extratos etanólico 2); H= Hexano.

Outra técnica de análise estatística multivariada adotada foi a análise de agrupamento hierárquico. Essa técnica visa encontrar e separar dados que possuam semelhanças, buscando padrões em um conjunto de dados, de modo a formar agrupamentos entre eles (RENCHER, 2005). A partir da análise de agrupamento hierárquico pode-se perceber os agrupamentos formados a partir da semelhança da composição química de cada extrato, tendo em vista os metabólitos em maior e menor concentração em cada extrato. A ordenação de cada extrato no heatmap foi estabelecida de forma que quanto maior a proximidade entre cada extrato maior a homogeneidade da composição de metabólitos entre eles. O mesmo ocorre com a ordenação

dos metabólitos no heatmap, quanto maior a proximidade entre eles maior a semelhança química (Figura 11).

Há um agrupamento entre os extratos em acetato de etila (MPAE, PC1AE e PC2AE) e os extratos etanólicos 1 (MPE, PC1E e PC2E) por existir uma semelhança na composição de metabólitos. As principais classes de metabólitos presentes nesses extratos são macamidas, ácidos graxos, alcaloides e glicosídeos. Os extratos PC3AE e PC3E se diferenciam dos demais extratos em acetato e etanólicos 1, por possuir composição de metabólitos diferente e as principais classes de metabólitos presentes nesses extratos são macamidas e ácidos graxos. Os extratos em hexano (MPH, PC1H e PC2H) também estão agrupados entre si e as principais classes de metabólitos que estão em maior concentração nesses extratos são, macamidas e ácidos graxos. O extrato PC3H é o único que difere a composição de metabólitos dos demais extratos em hexano (MPH, PC1H e PC2H), sendo a composição desse extrato (PC3H) muito semelhante a composição dos extratos etanólicos 2 (MPE2, PC1E2, PC2E2 e PC3E2), visto o agrupamento formado por esses extratos. Apesar de não haver presença predominante de uma classe nos extratos PC3H e etanólicos 2 (MPE2, PC1E2, PC2E2 e PC3E2) é possível identificar que os metabólitos que estão em maior concentração nesses extratos são macamidas, flavonoides, alcaloides e terpenos (Figura 11).

**Figura 11.** Agrupamento hierárquico representado em heatmap demonstrando os metabólitos da *L. meyenii* e seus produtos comerciais, em maior concentração em cada extrato e os agrupamentos formados entre os extratos

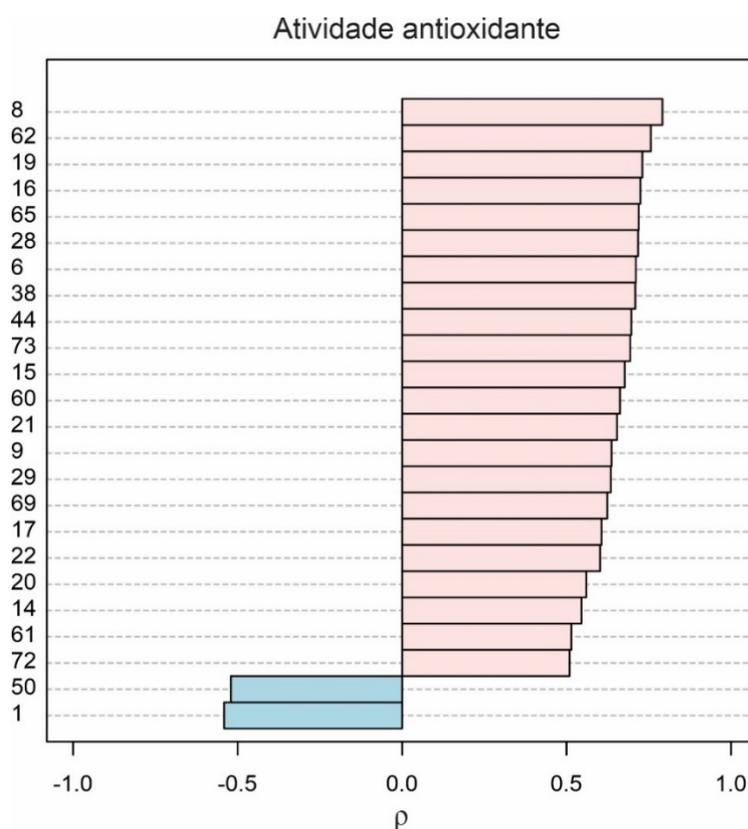


MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; AE= acetato de etila; E= Etanol (extratos etanólicos 1); E2= Etanol 2 (extratos etanólicos 2); H= Hexano. **1**= 1,2,10- óxido de trihidroxidiidro-trans-linalil 7-O-β-D-glicopiranosídeo; **2**= 1-hexilglicerol; **3**= 1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina, 1-benzil-6,7-dimetoxi; **4**= ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico; **5**= 1-o-(8R-hidroxi-8-metil-3Z,9-decadienoil)-β-D-glicopiranosídeo; **6**= ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico; **7**= ácido 2-oxononadecanoico; **8**= 3- β-acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno; **9**= 3-geranil-4,2',4',6'-tetrahidroxi-5-prenildiidrochalcona; **10**= ácido 5-oxo-6E,8E-octadecadienoico/ ácido 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoico; **11**= linoleato de metila; **12**= ácido linoleico, éster etílico; **13**= ácido 9-oxo-10E,12E-octadecadienoico; **14**= acetoxi-6-gingerol; **15**= ácido eicosanoico; **16**= argenteana; **17**= avenasterol; **18**= benzosimulina; **19**= cassaidina; **20**= cis-3-hexenil b-primeverosídeo; **21**=d-manosil-1-raminosil-d-galactose-1-difosfolípido; **22**= ácido docasanoico; **23**= 9-octadecenoato de etila; **24**= gíngerglicolípídido B; **25**= ácido glicérico; **26**= glicerol; **27**= ácido hexadecanoico, ester etílico; **28**= hiperforina; **29**= icaritin 3-rhamnosida; **30**= ácido láctico; **31**= lepidilina A; **32**= lepidilina B; **33**= lepidilina C; **34**= lepidilina D; **35**= ácido linoleico; **36**= l-prolina, 1-(trimetilsilil), trimetilsilil éster; **37**= l-valina; **38**= licoperosídeo D; **39**= macahidantoina A; **40**= macamida B; **41**= ácido málico, éster tris (trimetilsilil); **42**= mamamide B; **43**= meyenihidantoina A; **44**= monoanidrohidroxiloxantina; **45**= n-(3-metoxibenzil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida; **46**= n-(3-metoxibenzil)-hexadecanamida/ anandamida; **47**= n-benzil octanamida; **48**= n-benzil-(9Z,12Z)-octadecadienamida/ n-benzil-5-oxo-6E,8E-octadecadienamida/ n-benzil-9-oxo-(12Z,15Z)-octadecadienamida/ n-benzil-13-oxo-(9E,11E)-octadecadienamida/ n-benzil-9-oxo-10E,12E-octadecadienamida/ n-benzil-9-oxo-10E,12Z-octadecadienamida; **50**= n-benzil-9-oxo-12Z-octadecanamida; **51**= n-benzil-9Z-octadecanamida/ n-benziloleamida; **52**= n-benzil-heptadecanamida **53**= n-benzilpentadecanamida; **54**= ácido oleico; **55**= ácido cláidico; **56**= o-metilsomniferina; **57**= ácido palmítico; **58**= ácido palmítoleico; **59**= pentahomometionina; **60**= rutinosídeo de fenetil; **61**= ácido p-hidroxibenzóico; **62**= filoquinona; **63**= fitosfingosina; **64**= piperidina; **65**= pirohiperforina ; **66**= ácido pirúvico; **67**= rebaudiosídeo F; **68**= septentriodina; **69**= sinapoispermina; **70**= esteamida; **71**= ácido esteárico; **72**= ácido mirístico; **73**= uvaricina; **74**= ácido vanílico; **75**= xantoplanina.

A análise de correlação foi mais uma técnica da análise multivariada empregada e tem como objetivo avaliar a relação entre conjuntos de variáveis (FRANZESE; IULIANO, 2018). O coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) foi escolhido pela presença de dados com característica não linear.

O metabólito mais correlacionado com a atividade antioxidante é o 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno (8) seguido da filoquinona (62), cassaidina (19), argenteana (16) e pirohiperforina (65). O 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno, a cassaidina e a pirohiperforina pertencem a classe dos terpenos, já a filoquinona, conhecida também como vitamina K1 pertence à classe das naftoquinonas e das vitaminas lipossolúveis e a argenteana pertence a classe das lignanas (Figura 12).

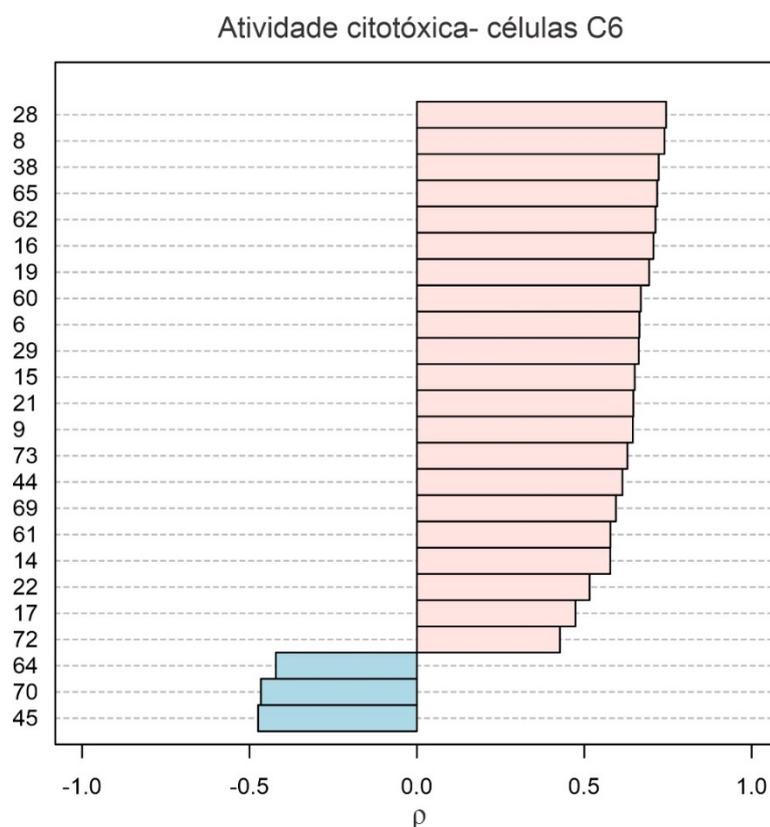
**Figura 12.** Correlação entre a atividade antioxidante e os metabólitos dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais



O coeficiente de correlação de Spearman está representado por ' $\rho$ '. Valores de  $\rho > 0$  = correlação positiva e valores de  $\rho < 0$  = correlação negativa. Valores de  $\rho$  mais próximos de 1 representa correlação mais forte entre as variáveis. **8**= 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno; **62** filoquinona; **19**= cassaidina; **16**= argenteana; **65**= pirohiperforina; **28**= hiperforina; **6**= ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico; **38**= licoperosídeo D; **44**= monoanidrohidroxiloxantina; **73**= uvaricina; **15**= ácido eicosanoico; **60**= rutinosídeo de fenetil; **21**= d-manosil-l-raminosil-d-galactose-1-difosfolípido; **9**= 3-geranil-4,2',4',6'-tetrahidroxi-5-prenildihidrochalcona; **29**= icaritin 3-rhamnosida; **69**= sinapoispermina; **17**= avenasterol; **22**= ácido docasanoico; **20**= cis-3-hexenil b-primeverosídeo; **14**= acetoxi-6-gingerol; **61**= ácido p-hidroxibenzóico; **72**= ácido mirístico; **50**= n-benzil-9-oxo-12Z-octadecenamida; **1**= 1,2,10-óxido de trihidroxidiidro-trans-linalil 7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

O metabólito mais correlacionado com a atividade citotóxica contra células C6 é a hiperforina (28) seguido do 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno (8), licoperisídeo D (38), pirohiperforina (65) e filoquinona (62). A hiperforina, o 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno e a pirohiperforina pertencem a classe dos terpenos. O licoperisídeo D é um alcaloide e a filoquinona pertence à classe das naftoquinonas (Figura 13).

**Figura 13.** Correlação entre a atividade citotóxica contra células C6 e os metabólitos dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais

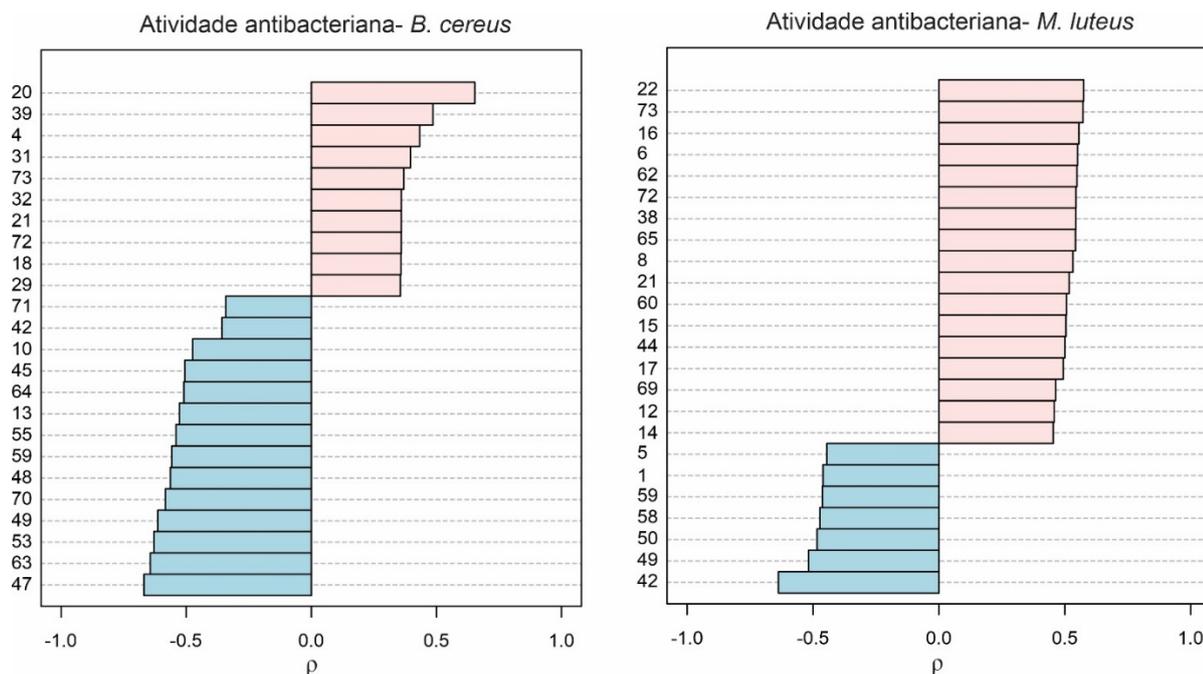


O coeficiente de correlação de Spearman está representado por ' $\rho$ '. Valores de  $\rho > 0$  = correlação positiva e valores de  $\rho < 0$  = correlação negativa. Valores de  $\rho$  mais próximos de 1 representa correlação mais forte entre as variáveis. **28**= hiperforina; **8**= 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno; **38**= licoperisídeo D; **65**= pirohiperforina; **62**= filoquinona; **16**= argenteana; **19**= cassaidina; **60**= rutinosídeo de fenetil; **6**= ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico; **29**= icaritin 3-rhamnosida; **15**= ácido eicosanoico; **21**= d-manosil-l-raminosil-d-galactose-1-difosfolípido; **9**= 3-geranil-4,2',4',6'-tetrahidroxi-5-prenildihidrochalcona; **73**= uvaricina; **44**= monoanidrohidroxiloxantina; **69**= sinapoispermina; **61**= ácido p-hidroxibenzóico; **14**= acetoxi-6-gingerol; **22**= ácido docasanoico; **17**= avenasterol; **72**= ácido mirístico; **50**= n-benzil-9-oxo-12Z-octadecenamida; **70**= estearamida; **64**= piperidina; **45**= n-(3-metoxibenzil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida.

O metabólito mais correlacionado com a atividade antibacteriana frente ao *B. cereus* foi o cis-3-hexenil b-primeverosídeo (20), que pertence à classe dos glicosídeos, seguido da macahidantoina A (39), que pertence à classe das tiohidantoinas, do ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico (4), que pertence à classe dos ácidos graxos, da lepidilina A (31), que pertence à classe dos alcaloides e da uvaricina (73), que pertence à classe dos policetídeos (Figura 14).

O metabólito mais correlacionado com a atividade antibacteriana frente ao *M. luteus* foi o ácido docasanoico (22), que é um ácido graxo, seguido da uvaricina (73), que é um policetídeo, da argenteana (16), que é uma lignana, do ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico (6), que é um ácido orgânico e da filoquinona (62), que é uma naftoquinonas (Figura 14).

**Figura 14.** Correlação entre a atividade antimicrobiana frente ao *B. cereus* e ao *M. luteus* e os metabólitos dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais



O coeficiente de correlação de Spearman está representado por ' $\rho$ '. Valores de  $\rho > 0$  = correlação positiva e valores de  $\rho < 0$  = correlação negativa. Valores de  $\rho$  mais próximos de 1 representa correlação mais forte entre as variáveis. **1**= 1,2,10- óxido de trihidroxidiidro-trans-linalil 7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo; **4**= ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico; **5**= 1-o-(8R-hidroxi-8-metil-3Z,9-decadienoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo; **6**= ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico; **8**= 3- $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno; **10**= ácido 5-oxo-6E,8E-octadecadienoico/ ácido 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoico; **12**= ácido linoleico, éster etílico; **13**= ácido 9-oxo-10E,12E-octadecadienoico; **14**= acetoxi-6-gingerol; **15**= ácido eicosanoico; **16**= argenteana; **17**= avenasterol; **18**= benzosimulina; **20**= cis-3-hexenil b-primeverosídeo; **21**=d-manosil-l-raminosil-d-galactose-1-difosfolipídio; **22**= ácido docasanoico; **29**= icaritin 3-rhamnosida; **31**= lepidilina A; **32**= lepidilina B; **38**= licoperosídeo D; **39**= macahidantoina A; **42**= mamamide B; A; **44**= monoanidrohidroxiloxantina; **45**= n-(3-metoxibenzil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida; **47**= n-benzil octanamida; **48**= n-benzil-(9Z,12Z)-octadecadienamida; **49**= n-benzil-5-oxo-6E,8E-octadecadienamida/ n-benzil-9-oxo-(12Z,15Z)-octadecadienamida/ n-benzil-13-oxo-(9E,11E)-octadecadienamida/ n-benzil-9-oxo-10E,12E-octadecadienamida/ n-benzil-9-oxo-10E,12Z-octadecadienamida; **50**= n-benzil-9-oxo-12Z-octadecenamida; **53**= n-benzilpentadecanamida; **55**= ácido eláidico; **56**= o-metilsomniferina; **58**= ácido palmitoleico; **59**= pentahomometionina; **60**= rutinosídeo de fenetil; **62**= filoquinona; **63**= fitosfingosina; **64**= piperidina; **65**= pirohiperforina ; **66**= ácido pirúvico; **69**= sinapoispermina; **70**= estearamida; **71**= ácido esteárico; **72**= ácido mirístico; **73**= uvaricina.

## 6 DISCUSSÃO

A identificação de novos metabólitos relacionados a atividades biológicas tem grande aplicabilidade para a indústria farmacêutica e para o campo da fitoterapia. Metabólitos com o potencial antioxidante têm sido relacionados a melhora e prevenção de doenças crônicas como diabetes e hipertensão (JURIKOVA et al., 2017), câncer (THYAGARAJAN; SAHU, 2018) e doenças neurodegenerativas (KUNDU; MITRA, 2013). Além disso, populações que tem um maior consumo de alimentos como vegetais, frutas, sementes, e grãos, que são fontes de substâncias antioxidantes, apresentam maior longevidade entre os habitantes (WILSON et al., 2017). O presente trabalho demonstrou que a *L. meyenii* pode ser utilizada como fonte de compostos antioxidantes, tendo em vista a atividade observada nos extratos da raiz da planta bem como de seus produtos comerciais e os extratos com maior atividade foram os MPAE, PC2AE, PC1AE e PC3AE. Portanto, o acetato de etila foi o melhor solvente para a extração de compostos antioxidantes.

Os extratos em acetato foram os que apresentaram maior atividade antioxidante e os cinco metabólitos mais correlacionados com essa atividade foram o 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno, a filoquinona, a cassaidina, a argenteana e a pirohiperforina. O 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno, a cassaidina e a pirohiperforina pertencem a classe dos terpenos e não há estudos que avaliaram a atividade antioxidante desses metabólitos isoladamente. No entanto, os terpenos representam uma grande classe de metabólitos sintetizados pelas plantas e são responsáveis por diversas atividades biológicas (ZHOU; PICHERSKY, 2020) inclusive atividade antioxidante (WANG; CHEN; HOU, 2019). Terpenos encontrados em vinhos demonstraram alta capacidade em capturar o radical DPPH e a atividade antioxidante representada em  $IC_{50}$  variou de 12,57  $mg \cdot mL^{-1}$  para o  $\alpha$ -pineno a 40,83  $mg \cdot mL^{-1}$  para o mirceno (WANG; CHEN; HOU, 2019). Algumas características estruturais dos terpenos podem estar relacionadas com as propriedades antioxidantes como a presença de grupos hidroxila e metoxila no anel aromático, presença de múltiplas ligações contidas em suas estruturas e presença de ligações duplas conjugadas acopladas aos grupos hidroxila nos anéis terminais (GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Além dos terpenos, outros dois metabólitos entre os cinco mais correlacionados com a atividade antioxidante são a filoquinona (vitamina K1) e a argenteana. Em relação a filoquinona, não há estudos que avaliem a atividade antioxidante desse metabólito de forma isolada, porém há uma tendência de encontrar alta atividade antioxidante em alimentos que são fonte dessa

vitamina, como os vegetais verde escuros (YASIN et al., 2014). A filoquinona pertence a classe das naftoquinonas e diversas naftoquinonas possuem atividade antioxidante como a 7-hidroxi-nafto[1,2-b:4,3-b']difuran-3,4-ácido dicarboxílico, isolada da *Juglans regia*, com valor de IC<sub>50</sub> de 8.31 µg·mL<sup>-1</sup> (MATHIYAZHAGAN; KUMARAN; ARJUN, 2018). A filoquinona possui em sua estrutura um anel 2-metil-1,4-naftoquinona e uma cadeia alifática. A 1,4-naftoquinona pode ser reduzida em semiquinona e conseqüentemente em hidroquinona. A hidroquinona possui em sua estrutura o grupo hidroxila, e pode agir como agente redutor, aumentando a capacidade em eliminar radicais livres, o que influencia diretamente a atividade antioxidante (LÓPEZ LÓPEZ et al., 2014). Em relação a argenteana, que faz parte da classe das lignanas, já foi visto uma alta capacidade em capturar o radical DPPH e a atividade antioxidante desse metabólito representada em IC<sub>50</sub> foi de 70 µM. Além disso, foi demonstrado que o mecanismo de ação envolve a capacidade da fração central da argenteana em liberar um ou dois átomos de H para os radicais livres (CALLISTE et al., 2010). Embora esses cinco metabólitos sejam os mais correlacionados com a atividade antioxidante, não apresentam alta concentração nos extratos mais ativos, o que indica o grande potencial antioxidante desses compostos.

Outros compostos que poderiam contribuir para a atividade antioxidante dos extratos são os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são antioxidantes não enzimáticos presentes nas plantas que atuam na detoxificação de radicais livres, doando átomos de hidrogênio (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018). Porém os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante não foram os mesmos que apresentaram maior quantidade de fenóis totais, confirmando desse modo, a contribuição de outros metabólitos (3-β-acetoxi-19-alfa-hidroxi-12-urseno, a filoquinona, a cassaidina, a argenteana e a pirohiperforina) para a atividade antioxidante dos extratos.

Em relação a atividade citotóxica, foi utilizada a linhagem de células tumorais C6, que são células de glioma de ratos. As células da glia são células do sistema nervoso central que nutrem, protegem e dão suporte aos neurônios, são elas os astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann e microglia (JÄKEL; DIMOU, 2017). O glioma é um tumor de células gliais, exceto a microglia, e de acordo com a célula de origem, tem diferentes classificações e quando ocorre nos astrócitos é denominado de glioblastoma/astrocitoma (WESSELING; CAPPER, 2018). O glioblastoma é o tumor cerebral mais maligno e agressivo e conseqüentemente é resistente a intervenções terapêuticas. Desse modo, a taxa de mortalidade relacionada a essa patologia é grande. Ao longo dos anos, diferentes tipos de tratamentos foram investigados, mas apresentaram sucesso limitado. No entanto, avanços nas abordagens cirúrgicas, de radioterapia

e de quimioterapia mostraram melhorias graduais na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (WESSELING; CAPPER, 2018), portanto o estudo de novas drogas que possam auxiliar no tratamento do glioblastoma é importante. A linhagem C6, que é uma linhagem celular desenvolvida pela indução de glioma em ratos causada pela administração de n-nitrosometilureia (BENDA et al., 1968), é muito utilizada nos estudo de glioblastoma pois é tem fenótipo parecido com o glioblastoma humano (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002).

Analisando a citotoxicidade dos extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais contra as células C6, os extratos que apresentaram maior citotoxicidade frente às células C6 foram os extratos em acetato de etila (PC1AE, PC3AE e MPAE), seguido do extrato em hexano PC2H e do extrato etanólico 1 MPE, portanto, o acetato de etila foi o melhor solvente para a extração de compostos antitumorais.

Os cinco metabólitos mais correlacionados com a atividade citotóxica contra células C6 foram a hiperforina, o 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno, o licoperisídeo D, a pirohiperforina e a filoquinona. A hiperforina, o 3-  $\beta$ -acetoxi-19 alfa-hidroxi-12-urseno e a pirohiperforina pertencem a classe dos terpenos. A hiperforina já foi identificada como composto antitumoral, demonstrando contribuir na redução da adesão de células de adenocarcinoma do cólon (HT-29), reduzindo a possibilidade de metástase das células tumorais (ŠEMELÁKOVÁ; SAČKOVÁ; FEDOROČKO, 2018) e a hiperforina também induziu apoptose em células de adenocarcinoma hepático (SK-Hep1) (CHIANG et al., 2017). Para os demais terpenos não há estudos que avaliam a atividade citotóxica isoladamente, porém existem diversos terpenos que apresentam efeito antitumoral como o pleibin C e E, isolados da *Salvia plebeian*, que demonstraram atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de carcinoma colorretal humano (CaCo2) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) com valores de IC<sub>50</sub> variando de 9,65  $\mu$ M a 27,51  $\mu$ M (ZHANG et al., 2017a). Os mecanismos de ação que envolvem a relação entre estrutura química dos terpenos e atividade citotóxica ainda não estão bem elucidados.

Além dos terpenos, outros dois metabólitos entre os cinco mais correlacionados com a atividade citotóxica, são o licoperisídeo D e a filoquinona. Em relação ao licoperisídeo D, não há estudos que avaliam a atividade citotóxica. Porém a atividade citotóxica já foi identificada em outros alcaloides como a coccinina e a motanina, isolados da *Haemanthus humilis*, que apresentaram toxicidade contra linhagens celulares de câncer de mama (MCF7, Hs578T e MDA-MB-231), câncer de cólon (HCT-15), câncer de pulmão (A549) e melanoma (SK-MEL-

28) com IC<sub>50</sub> variando de 1,9 µM a 23,2 µM (MASI et al., 2019). Os mecanismos de ação que envolvem a relação entre estrutura química dos alcaloides e atividade citotóxica/antitumoral ainda não estão bem elucidados. Em relação a filoquinona, já foi identificada atividade antitumoral desse metabólito contra células do adenocarcinoma de cólon humano (SW480), com redução de 90% da viabilidade celular após 48h de tratamento utilizando a concentração de 200 µM da filoquinona (ORLANDO et al., 2015). A 1,4 naftoquinona, que compõe a estrutura da filoquinona pode ser reduzida em semiquinona e conseqüentemente em hidroquinona e essas duas espécies podem sofrer reoxidação por uma molécula de oxigênio (O<sub>2</sub>) e gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido e peróxido de hidrogênio. A geração de EROs pode levar ao estresse oxidativo nas células cancerígenas induzindo morte celular. Portanto o ciclo redox da quinona pode explicar a atividade antitumoral da filoquinona (LAMSON; PLAZA, 2003; LÓPEZ LÓPEZ et al., 2014). Esse mecanismo de ação é uma das hipóteses que explicam a atividade citotóxica da filoquinona, porém outros mecanismos estão sendo estudados. Assim como na atividade antioxidante, os metabólitos mais correlacionados com a atividade citotóxica, não apresentam alta concentração nos extratos mais ativos, o que indica o grande potencial antitumoral desses compostos.

O efeito citotóxico também foi avaliado contra células normais do sistema nervoso central (SNC), os astrócitos, pois as drogas antitumorais não devem exercer efeito tóxico para as células normais. Todos os extratos mais ativos contra células C6 foram testados contra astrócitos e exceto o extrato PC1H, nenhum apresentou citotoxicidade contra astrócitos. O percentual de células viáveis para alguns extratos foi maior do que no grupo controle (DMSO), isso pode ser justificado pela reatividade astrocitária. Os astrócitos além de outras funções contribuem na defesa imunológica e são capazes detectar sinais de perigo e em resposta secretam citocinas inflamatórias (COLOMBO; FARINA, 2016) e substâncias estranhas como drogas podem ser identificados como uma ameaça pelos astrócitos e uma série de alterações moleculares, funcionais e morfológicas podem ocorrer como resposta, tais como alterações na expressão gênica, hipertrofia e proliferação celular, caracterizando a reatividade astrocitária (JENSEN; MASSIE; DE KEYSER, 2013; SOFRONIEW, 2015). Portanto o tratamento com os extratos da *L. meyenii* pode ter estimulado essa reatividade astrocitária.

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Essas bactérias estão associadas a diversas infecções gastrointestinais bem como com infecções

pós cirúrgicas, infecções de pele e do trato urinário (MOSTAFA et al., 2018; TONG et al., 2015; ALLOCATI et al., 2013; DROBNIEWSKI, 1993; NOVOA et al., 2017). Já o gênero de levedura *Candida* é a causa de vários tipos de infecções de mucosa como, candidíase vaginal e infecções de orofaringe e esofágica (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999).

Em relação a atividade antimicrobiana, os extratos PC1AE, PC1E, PC1E2, PC2AE, PC2E, PC2E2 e MP AE apresentaram atividade contra a bactéria *M. luteus* e os extratos PC1E2 e PC3E contra *B. cereus*. Portanto esses extratos apresentaram atividade antibacteriana contra duas bactérias Gram positivas e de forma geral, os extratos em acetato de etila do produto comercial 1 (PC1AE) e da *L. meyenii* desidratada (MP AE) foram os mais ativos, portanto, o acetato de etila foi o melhor solvente para a extração de compostos antibacterianos. Os extratos testados não apresentaram atividade frente a bactérias Gram- negativas, o que pode ser justificado pela maior resistências dessas bactérias em relação as bactérias Gram- positivas pois possuem uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos e glicerofosfolipídios que funciona como uma barreira para proteção contra compostos tóxicos, incluindo antibióticos (WESSELING; CAPPER, 2018).

Os cinco metabólitos mais correlacionados com a atividade antibacteriana frente ao *B. cereus* foram o cis-3-hexenil b-primeverosídeo, a macahidantoina A, o ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico, a lepidilina A e a uvaricina. O cis-3-hexenil b-primeverosídeo é um glicosídeo e não há estudos que avaliam a atividade antibacteriana desse metabólito. Porém outros glicosídeos já foram identificados como compostos antibacterianos, como o metil 12-o-( $\beta$ -d-arabinofuranosil)-ricinoleato e o metil 12-o-( $\alpha$ -d-manopiranosil)-ricinoleato que apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus* com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (KUPPALA et al., 2016). A presença do açúcar na estrutura dos glicosídeos contribui para sua atividade antibacteriana, uma vez que, o açúcar interage com os fosfolipídeos da membrana plasmática das bactérias causando uma desestabilização na membrana alterando sua permeabilidade e causando ruptura do envelope celular com consequente morte das bactérias (DIAS et al., 2018).

A macahidantoina A é uma tiohidantoina isolada da raiz da *L. meyenii* e ainda não há estudos que avaliam a atividade antibacteriana desse metabólito. Porém compostos pertencentes a classe das tiohidantoinas já foram identificados como antibacterianos, como a tiohidantoina cis-dimetil 1-((benzoil)carbamotioil)-5,5-difenilpirrolidina-2,4-dicarboxilato, sintetizada a partir dos compostos difenilpirrolidina e tiourea e apresentou atividade antibacteriana frente a

*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila* e *Acinetobacter baumannii* com valores de CIM variando de  $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (ERŞEN et al., 2017). Os mecanismos de ação que correlacionam a estrutura química das tiohidantoínas e a atividade antibacteriana ainda não estão elucidados.

O ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico é um ácido graxo e não há estudos que avaliam a atividade antibacteriana desse metabólito. Porém diversos ácidos graxos já foram identificados como compostos antibacterianos, a exemplo do ácido 2-hexadecínico e do ácido 2-octadecínico que apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* com valores de CIM variando de  $7,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (SANABRIA-RÍOS et al., 2014). O tamanho da cadeia carbônica assim como a presença de ligações duplas e do grupo hidroxila podem interferir na atividade antibacteriana dos ácidos graxos, além disso a hidroxila do grupo carboxila dos ácidos graxos parece favorecer essa atividade quando comparados aos ácidos graxos metilados (ausência da hidroxila). Os ácidos graxos insaturados parecem ter a atividade antibacteriana potencializada em comparação com ácidos graxos saturados com mesmo comprimento de cadeia carbônica. Já os ácidos graxos saturados mais ativos têm cadeia carbônica constituída por 10 a 12 carbonos e variações nessa quantidade de carbonos interferem na redução da atividade antibacteriana. Além disso, a propriedade detergente dos ácidos graxos permite interação com a membrana celular podendo causar a solubilização da membrana interferindo na cadeia de transporte de elétrons causando lesão celular (DESBOIS; SMITH, 2010).

A lepidilina A é um alcaloide isolado da raiz da *L. meyenii* e ainda não há estudos que avaliam a atividade antibacteriana desse metabólito. Porém diversos alcaloides já foram identificados como compostos antibacterianos, como a talicfoetina, isolada da *Thalictrum foetidum* que apresentou atividade antibacteriana frente a *B. subtilis* e *E. coli* com valores de CIM variando de  $3,12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $6,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (DING et al., 2019). Os alcaloides possuem estrutura química diversas, desse modo, os mecanismos de ação variam de acordo com o tipo de alcaloide, mas de forma geral esses compostos podem atuar nas células das bactérias afetando a divisão celular, causando inibição respiratória e enzimática e rompimento da membrana plasmática (OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019).

A uvaricina é um policetídeo e ainda não há estudos que avaliam a atividade antibacteriana desse metabólito. Porém diversos policetídeos já foram identificadas como compostos antibacterianos, como os peniciclones A-E que demonstraram atividade

antibacteriana frente a *S. aureus* com valores de CIM variando de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (GUO et al., 2015; QIN et al., 2017). Os mecanismos de ação que envolvem a estrutura química dos policetídeos com a atividade antibacteriana ainda não estão bem elucidados.

Os cinco metabólitos mais correlacionados com a atividade antibacteriana frente a *M. luteus* foram o ácido docasanoico, a uvaricina, a argenteana, o ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico e a filoquinona. O ácido docasanoico é um ácido graxo e não há estudos que testam sua atividade antibacteriana de forma isolada, porém diversos ácidos graxos já foram identificados como compostos antibacterianos como citado acima (SANABRIA-RÍOS et al., 2014). A argenteana é uma lignana e não há estudos que testam sua atividade antibacteriana porém diversas lignanas já foram identificadas como compostos antibacterianos como o 3, 3'-demetoxi-6-o-demetilisoguaiacin, isolado da *Larrea tridentata* que apresentou atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *Enterobacter cloacae* com valores de CIM variando de  $12,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2012). Os mecanismos de ação que envolvem a estrutura química das lignanas com a atividade antibacteriana ainda não estão bem elucidados.

O ácido 2,6-diamino-7-hidroxi-azelaico é um ácido orgânico e não há estudos que testam sua atividade antibacteriana de forma isolada porém diversos ácidos orgânicos já foram identificadas como compostos antibacterianos, como o ácido salicílico que apresentou atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, *E. Faecalis*, *E. Coli* e *P. Aeruginosa* com valores de CIM variando de  $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (ADAMCZAK; OŹAROWSKI; KARPÍŃSKI, 2019). A atividade antibacteriana dos ácidos orgânicos é baseada na capacidade de atravessar livremente a membrana celular das bactérias, tendo em vista a característica lipofílica de sua forma não dissociada, e reduzir o pH intracelular causando danos nas atividades metabólicas das bactérias (AMRUTHA; SUNDAR; SHETTY, 2017; GÓMEZ-GARCÍA et al., 2019).

A filoquinona é uma naftoquinona e não há estudos que testam sua atividade antibacteriana de forma isolada porém diversas naftoquinonas já foram identificadas como compostos antibacterianos, como os análogos da 1,4-naftoquinona que apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* com valores de CIM variando de  $15,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (RAVICHANDIRAN et al., 2019). O mecanismo de ação da filoquinona que explica a atividade antimicrobiana é igual ao mecanismo relacionado com a atividade citotóxica já citado, que em resumo justifica-se pela

geração de EROs, causando estresse oxidativos nas células das bactérias (RAVICHANDIRAN et al., 2019).

Apesar da diversidade de metabólitos correlacionados com a atividade antibacteriana, tanto para a *B. cereus* quanto para a *M. luteus*, os metabólitos que apresentaram atividade antibacteriana em comum com as duas bactérias foram ácidos graxos (ácido -15-oxo-18Z tetracosenóico e ácido docasanoico) e o policetídeo uvaricina. Assim como para as demais atividades biológicas testadas, os metabólitos mais correlacionados com a atividade antibacteriana, não apresentam alta concentração nos extratos mais ativos, o que indica o grande potencial antibacteriano desses compostos.

Portanto os extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais tem potenciais compostos antibacterianos, o que representa grande vantagem no tratamento das patologias envolvidas com bactérias, uma vez que, o uso cada vez mais difundido associado ao mau uso de antibióticos levaram ao rápido aparecimento de cepas resistentes a antibióticos e como consequência mais infecções são causadas por microrganismos que não respondem aos tratamentos convencionais (LI; WEBSTER, 2018).

## 7 CONCLUSÃO

Nesse estudo os extratos da raiz da *L. meyenii* e seus produtos comerciais apresentaram relevante atividade antioxidante, antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e antitumoral contra células C6, não apresentando citotoxicidade para os astrócitos. Os extratos em acetato de etila foram os mais ativos em relação as atividades antioxidante, citotóxica e antibacteriana, portanto o acetato de etila foi o melhor solvente para a extração dos compostos bioativos relacionados a todas as atividades biológicas testadas. A metabolômica permitiu traçar o perfil químico dos extratos e 76 metabólitos foram identificados e a partir da análise estatística multivariada foi possível diferenciar o metaboloma dos extratos e identificar que os terpenos encontrados nos extratos são possivelmente os principais metabólitos responsáveis pelas atividades antioxidante e citotóxica e os ácidos graxos e o policetídeo uvaricina pela atividade antibacteriana. Os metabólitos mais correlacionados com as atividades biológicas testadas não estão, necessariamente, em altas concentrações nos extratos mais ativos, o que indica o alto potencial farmacológico desses compostos. Os resultados apresentados nessa dissertação contribuem para ampliar o conhecimento científico acerca do potencial farmacológico da *L. meyenii* o que implica diretamente em benefícios para a sociedade no tratamento e prevenção de patologias.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZAK, A.; OŻAROWSKI, M.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 109, 2019.
- ADLY, A. A. M. **Oxidative stress and disease: An updated review** **Research Journal of Immunology**, 2010.
- ALBISHI, T. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 930–939, 2013.
- ALLOCATI, N. et al. Escherichia coli in Europe: An overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235–6254, 2013.
- ALTEMIMI, A. et al. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, 2017.
- AMARO-ORTIZ, A.; YAN, B.; D’ORAZIO, J. A. Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6202–6219, 2014.
- AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 156–162, 2017.
- ASLANTÜRK, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**. [s.l.] InTech, 2018.
- BENDA, P. et al. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370–371, 26 jul. 1968.
- BIJTTEBIER, S. et al. Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 935, p. 136–150, 2016.
- BINGOL, K. Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. **High-Throughput**, v. 7, n. 2, p. 9, 2018.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, n. January, p. 9–19, 2012.
- BOUKANDOU MOUNANGA, M.; MEWONO, L.; ABOUGHE ANGONE, S. Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 618–627, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CAICAI, K. et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the leaves of maca (*Lepidium Meyenii*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2611–2619, 2017.

CALLISTE, C. A. et al. A new antioxidant from wild nutmeg. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 489–496, 2010.

CANUTO, G. A. B. et al. New insights into the mechanistic action of methyldehydrodieugenol B towards *Leishmania (L.) infantum* via a multiplatform based untargeted metabolomics approach. **Metabolomics**, v. 13, n. 5, p. 0, 2017.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 107–120, 2018.

CARVALHO, F. V.; RIBEIRO, P. R. Structural diversity, biosynthetic aspects, and LC-HRMS data compilation for the identification of bioactive compounds of *Lepidium meyenii*. **Food Research International**, v. 125, 2019a.

CARVALHO, F. V.; RIBEIRO, P. R. Structural diversity, biosynthetic aspects, and LC-HRMS data compilation for the identification of bioactive compounds of *Lepidium meyenii*. **Food Research International**, v. 125, n. August, p. 108615, nov. 2019b.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 3–23, 2010.

CHEN, L.; LI, J.; FAN, L. The nutritional composition of maca in hypocotyls (*Lepidium meyenii* walp.) cultivated in different regions of China. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.

CHENG, N. et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 234–240, 2013.

CHIANG, I. T. et al. Hyperforin inhibits cell growth by inducing intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in Hepatocellular carcinoma cells. **Anticancer Research**, v. 37, n. 1, p. 161–167, 2017.

CHOI, E. H. et al. Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 568–573, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introducao a Metodos Cromatograficos**, 1997.

COLOMBO, E.; FARINA, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 9, p. 608–620, 2016.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Fundamentals of innate immunity with. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 55, n. 11, 2010.

DALAR, A. et al. Traditional medicinal plants of Ağrı Province, Turkey. **Journal of**

**Ethnopharmacology**, v. 226, n. August, p. 56–72, 2018.

DEBNATH, B. et al. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 56–72, 2018.

DEMETROWITSCH, T.; SCHWARZ, K. Metabolomics: new analytical methods for metabolome research. **Science & Research**, p. 102–111, 2014.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2010.

DIAS, C. et al. Sugar-based bactericides targeting phosphatidylethanolamine-enriched membranes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

DING, C. F. et al. Thalicloetine, a novel isoquinoline alkaloid with antibacterial activity from *Thalictrum foetidum*. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 41, p. 151135, 2019.

DINI, A. et al. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 347–349, 1994.

DROBNIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324–338, out. 1993.

DRÓZDŹ, P.; IENÉ, V.; PYRZYNSKA, K. Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 4, p. 360–364, 2017.

EL BAABOUA, A. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Four Organic Acids Used in Chicks Feed to Control *Salmonella typhimurium*: Suggestion of Amendment in the Search Standard. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, 2018.

ELLOF, J. A quick Microplate Method to Determine the Minimum Inhibitory Sensitive and Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 2, p. 711–713, 1998.

ERŞEN, D. et al. Synthesis and anti(myco)bacterial activity of novel 5,5-diphenylpyrrolidine N-arylthiourea derivatives and a functionalized hexahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]imidazole. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 9, p. 2152–2160, 2017.

ESPARZA, E. et al. Bioactive Maca (*Lepidium meyenii*) alkamides are a result of traditional Andean postharvest drying practices. **Phytochemistry**, v. 116, n. 1, p. 138–148, 2015.

FARJANA, A.; ZERIN, N.; KABIR, M. S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. S2, p. S920–S923, 2014.

FAVELA-HERNÁNDEZ, J. M. J. et al. Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 12, p. 1957–1960, 2012.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 80–96, jan. 1999.

FRANZESE, M.; IULIANO, A. Correlation Analysis. In: **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 706–721.

FUNGI, M. et al. Anti-Phytopathogenic and Cytotoxic Activities of Crude Extracts and Secondary Metabolites of. p. 1–15, 2018.

GÓMEZ-GARCÍA, M. et al. Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. **Porcine Health Management**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2019.

GONZALES-CASTAÑEDA, C. et al. Photoprotection against the UVB-induced oxidative stress and epidermal damage in mice using leaves of three different varieties of *Lepidium meyenii* (maca). **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 8, p. 928–938, 2011.

GONZALES-CASTAÑEDA, C.; GONZALES, G. F. Hypocotyls of *lepidium meyenii* (maca), a plant of the Peruvian highlands, prevent ultraviolet A-, B-, and C-induced skin damage in rats. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 24, n. 1, p. 24–31, 2008.

GONZALES et al. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). **Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 87–95, 2004.

GONZALES, G. F. MACA: Del alimento perdido de los Incas al milagro de los Andes: Estudio de seguridad alimentaria y nutricional. **Seguranca Alimentar e Nutricional, Campinas**, v. 16–17, n. 1, p. 16–36, 2010.

GONZALES, G. F. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the peruvian highlands. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

GONZALES, G. F. et al. Maca (*lepidium meyenii* walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 31, n. 1, p. 100–110, 2014.

GONZALES, G. F.; ALARCÓN-YAQUETTO, D. E. Maca, A Nutraceutical From the Andean Highlands. In: **Therapeutic Foods**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 373–395.

GONZALES, G. F.; GONZALES, C.; GONZALES-CASTAÑEDA, C. *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru--from tradition to science. **Forschende Komplementärmedizin (2006)**, v. 16, n. 6, p. 373–380, 2009.

GONZALES, G. F.; VASQUEZ, V. B.; GASCO, M. The transillumination technique as a method for the assessment of spermatogenesis using medicinal plants: The effect of extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) and camu camu (*Myrciaria dubia*) on stages of the spermatogenic cycle in male rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 23, n. 8, p. 559–565, 2013.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–5341, 2012.

GROBBEN, B.; DE DEYN, P. P.; SLEGGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 3, p. 257–270, 2002.

GUO, W. et al. Penicyclones A-E, Antibacterial Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23-2. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 11, p. 2699–2703, 2015.

HAŁASA, R. et al. Comparison of fluorescence optical respirometry and microbroth dilution methods for testing antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 98–105, 2014.

HERMANN, M.; HELLER, J. **Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon**. [s.l: s.n.].

HUANG, L. Z. et al. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 213–219, 2011.

HUANG, W. C. et al. Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 905–921, 2015.

HUANG, Y.-J.; PENG, X.-R.; QIU, M.-H. Progress on the Chemical Constituents Derived from Glucosinolates in Maca (*Lepidium meyenii*). **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, 2018.

ICHIISHI, E.; LI, X.-K.; IORIO, E. L. Oxidative Stress and Diseases: Clinical Trials and Approaches. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–3, 2016.

INOUE, N.; FARFAN, C.; GONZALES, G. F. Effect of butanolic fraction of yellow and black maca (*Lepidium meyenii*) on the sperm count of adult mice. **Andrologia**, v. 48, n. 8, p. 915–921, 2016.

JÄKEL, S.; DIMOU, L. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. February, p. 1–17, 2017.

JENSEN, C. J.; MASSIE, A.; DE KEYSER, J. Immune players in the CNS: The astrocyte. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 824–839, 2013.

JOLLIFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: A review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, 2016.

JURIKOVA, T. et al. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 944, 7 jun. 2017.

KASOTE, D. M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982–991, 2015.

KUNDU, A.; MITRA, A. Flavoring Extracts of *Hemidesmus indicus* Roots and *Vanilla planifolia* Pods Exhibit In vitro Acetylcholinesterase Inhibitory Activities. 2013.

- KUPPALA, R. et al. Synthesis and antibacterial activity of ricinoleic acid glycosides. **RSC Advances**, v. 6, n. 5, p. 3700–3713, 2016.
- KYSELKA, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of linseed lignans and phenolic acids. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 9, p. 1633–1644, 2017.
- LAMSON, D. W.; PLAZA, S. M. The anticancer effects of vitamin K. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 303–318, 2003.
- LANÇAS, F. M. et al. Cromatografia Líquida (Lc) / Espectrometria De Massas. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. April, p. 35–62, 2009.
- LATIEF, U.; AHMAD, R. Herbal remedies for liver fibrosis: A review on the mode of action of fifty herbs. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, n. 3, p. 352–360, 2018.
- LI, B.; WEBSTER, T. J. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 1, p. 22–32, 2018.
- LI, G.; AMMERMANN, U.; QUIRÓS, C. F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. **Economic Botany**, v. 55, n. 2, p. 255–262, 2001.
- LI, J. et al. Anti-fatigue activity of polysaccharide fractions from *Lepidium meyenii* Walp. (maca). **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 1305–1311, 2016.
- LI, J. et al. The Composition Analysis of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) from Xinjiang and Its Antifatigue Activity. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017a.
- LI, Q. et al. Cholinesterase,  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitory and antioxidant capacities of Chinese medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. July, p. 512–519, 2017b.
- LI, S. et al. Purification, characterization and biological activities of a polysaccharide from *Lepidium meyenii* leaves. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1302–1310, 2017c.
- LINDON J.; NICHOLSON J.; HOLMES E. **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- LIYANAARACHCHI, G. D. et al. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. October 2017, p. 597–605, 2018.
- LÓPEZ LÓPEZ, L. I. et al. Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives — a structured review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.
- MAHDI-POUR, B. et al. Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 12, p. 960–965, 2012.

- MARÍN-BRAVO. Histology of Maca, *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 101–108, 2003.
- MARTEL, J. et al. Immunomodulatory Properties of Plants and Mushrooms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 11, p. 967–981, 2017.
- MARTUCCI, M. E. P. et al. Comprehensive untargeted metabolomics of Lychnophorinae subtribe (Asteraceae: Vernonieae) in a phylogenetic context. **Plos One**, v. 13, n. 1, p. e0190104, 2018.
- MASI, M. et al. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 277–281, 2019.
- MATHIYAZHAGAN, K.; KUMARAN, A.; ARJUN, P. Isolation of Natural Naphthoquinones from *Juglans regia* and In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Studies of Naphthoquinones and the Synthetic Naphthofuran Derivatives. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 346–353, 2018.
- MCGAW, L. J.; ELGORASHI, E. E.; ELOFF, J. N. **Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014.
- MEISSNER, H. O. et al. Peruvian maca (*Lepidium peruvianum*): (II) phytochemical profiles of four prime maca phenotypes grown in two geographically-distant locations. **International Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 1, p. 9–24, 2016.
- MÉLOT, C. Multivariate analysis: An overview. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 22, n. 4, p. 687–690, 2005.
- MONTESANO, D. et al. Bioactive profile of pumpkin: an overview on terpenoids and their health-promoting properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 81–87, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOSTAFA, A. A. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 361–366, 2018.
- MUKHOPADHYAY, P. Multivariate statistical analysis. **Multivariate Statistical Analysis**, n. July 2012, p. 1–549, 2008.
- NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- NOVOA, L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. **PLoS ONE**, p. 1–13, 2017.
- OCHWANG'I, D. O. et al. Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County

- (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 233–240, 2018.
- ORLANDO, A. et al. Vitamin K1 exerts antiproliferative effects and induces apoptosis in three differently graded human colon cancer cell lines. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- OTHMAN, L.; SLEIMAN, A.; ABDEL-MASSIH, R. M. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, 2019.
- OZER, M. S. et al. *Onosma heterophyllum*: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. June 2017, p. 179–184, 2018.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.
- QIN, Z. et al. Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African *Tetraponera* plant-ants. **Chemical Science**, v. 8, n. 4, p. 3218–3227, 2017.
- RAHMOUN, N. M. et al. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 42, n. 6, p. 270–275, 2012.
- RAMASAMY, K. et al. Ultraviolet radiation-induced carcinogenesis: Mechanisms and experimental models. **Journal of Radiation and Cancer Research**, v. 8, n. 1, p. 4, 2017.
- RATH, S.; PADHY, R. N. Antibacterial efficacy of five medicinal plants against multidrug-resistant enteropathogenic bacteria infecting under-5 hospitalized children. **Journal of integrative medicine**, v. 13, n. 1, p. 45–57, 2015.
- RAVICHANDIRAN, P. et al. 1,4-Naphthoquinone analogues: Potent antibacterial agents and mode of action evaluation. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1–14, 2019.
- RENCHER, A. C. **A Review Of “Methods of Multivariate Analysis, Second Edition”**. [s.l.: s.n.]. v. 37
- RODRÍGUEZ-HUAMÁN, Á. et al. Antioxidant and neuroprotector effect of *Lepidium meyenii* (maca) methanol leaf extract against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA)-induced toxicity in PC12 cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 27, n. 4, p. 279–285, 2017.
- RUMMUN, N. et al. The role of endemic plants in Mauritian traditional medicine – Potential therapeutic benefits or placebo effect? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, n. October 2017, p. 111–117, 2018.
- SAFARPOOR, M. et al. Ultrasound-assisted extraction of antimicrobial compounds from *Thymus daenensis* and *Silybum marianum*: Antimicrobial activity with and without the

presence of natural silver nanoparticles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 42, p. 76–83, 2018.

SAIBABA, S.; SATHISH KUMAR, M.; SHANMUGA PANDIYAN, P. Mini Review on Lc/Ms Techniques. **Saibaba et al. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. April, 2016.

SALEM, M. Z. M. et al. Bioactivity of essential oils extracted from *Cupressus macrocarpa* branchlets and *Corymbia citriodora* leaves grown in Egypt. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2018.

SANABRIA-RÍOS, D. J. et al. Antibacterial activity of 2-alkynoic fatty acids against multidrug-resistant bacteria. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 178, p. 84–91, 2014.

SANDOVAL, M. et al. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). **Food Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 207–213, 2002.

SANGHA, J. S. et al. Liuwei Dihuang (LWDH), a Traditional Chinese Medicinal Formula, Protects against  $\beta$ -Amyloid Toxicity in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

SANTOS, P. M. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. June, p. 834–844, 2018.

SARIKAHYA, N. B. et al. Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. **Phytomedicine**, v. 38, n. November 2017, p. 135–144, 2018.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

ŠEMELÁKOVÁ, M.; SAČKOVÁ, V.; FEDOROČKO, P. The potential of hypericin and hyperforin for antiadhesion therapy to prevent metastasis of parental and oxaliplatin-resistant human adenocarcinoma cells (HT-29). **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 10, p. 983–994, 2018.

SILAMBARASAN, R. et al. Traditional herbal medicines practiced by the ethnic people in Sathyamangalam forests of Western Ghats, India. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. August, p. 61–72, 2017.

SOFRONIEW, M. V. Astroglialosis perspectives. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 2, p. 1–16, 2015.

TANG, T. et al. Antidiabetic activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* and *Anoectochilus formosanus* in STZ-induced diabetic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 2017, 2018a.

TANG, W. et al. Structural Characterization and Antifatigue Effect In Vivo of Maca (*Lepidium meyenii* Walp) Polysaccharide. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 757–764, 2017.

TANG, Y. et al. Structure analysis and anti-fatigue activity of a polysaccharide from *Lepidium meyenii* Walp. **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–10, 2018b.

TAO, H. X. et al. Discrimination of three *Siegesbeckia* Herba species using UPLC-QTOF/MS-based metabolomics approach. **Food and Chemical Toxicology**, n. December 2017, 2018.

TEKWU, E. M.; PIEME, A. C.; BENG, V. P. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 265–273, 2012.

THYAGARAJAN, A.; SAHU, R. P. Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy : Immunomodulation and Radiosensitization. 2018.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

VALENTOVÁ, K.; J., U. *Smallanthus sonchifolius* and *lepidium meyenii* – prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, v. 147, n. 2, p. 119–130, 2003.

VÁSQUEZ-APESTEGUI, B. V. Influencia De La Difusión De Las Investigaciones Sobre Las Propiedades De La Maca En La Demanda Del Mercado Internacional: 1998-2008. **Revista de Ciencias Empresariales de la Universidad de San Martín de Porres**, v. 1, p. 9–24, 2010.

WANG, C. Y.; CHEN, Y. W.; HOU, C. Y. Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 230–238, 2019.

WANG, M. et al. Metabolomics highlights pharmacological bioactivity and biochemical mechanism of traditional Chinese medicine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 133–141, 2017.

WANG, W. et al. Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 542–553, 2016.

WANG, W. et al. Structure characterization of one polysaccharide from *Lepidium meyenii* Walp., and its antioxidant activity and protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury RAW264.7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 816–833, 2018a.

WANG, Y.-H. et al. Substituting one Paris for another? In vitro cytotoxic and in vivo antitumor activities of *Paris forrestii*, a substitute of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018b.

WESSELING, P.; CAPPER, D. WHO 2016 Classification of gliomas. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 44, n. 2, p. 139–150, 2018.

WIEGAND I.; HILPERT K.; HANCOCK R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

WILSON, D. W. et al. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person : An Overview. p. 1–20, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who Global Report on Traditional and Complementary Medicine 2019**. [s.l: s.n.].

WU, J. Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 200–206, 2013.

XIAO, J.; BAI, W. Bioactive phytochemicals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 6, p. 827–829, 2019.

XU, C. C. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721–731, 2017.

YANG, Q. et al. Effects of macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 5, p. 827–834, 2015.

YASIN, M. et al. Chemical, antioxidant and sensory profiling of vitamin K-rich dietary sources. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 153–160, 2014.

YUAN, H. et al. Antioxidant activity of isothiocyanate extracts from broccoli. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 2, p. 312–321, 2010.

ZHA, Z. et al. Isolation, purification, structural characterization and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Lepidium meyenii*. **Phytochemistry**, v. 147, p. 184–193, 2018.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 570–577, 2013.

ZHANG, C. G. et al. Plebeins A-F, sesquiterpenoids and diterpenoids from *Salvia plebeian*. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 254–258, 2017a.

ZHANG, L. et al. Protective effect of polysaccharide from maca (*Lepidium meyenii*) on Hep-G2 cells and alcoholic liver oxidative injury in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 63–70, 2017b.

ZHAO, J. G. et al. In vivo antioxidant, hypoglycemic, and anti-tumor activities of anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Nutrition Research and Practice**, v. 7, n. 5, p. 359–365, 2013.

ZHAO, Y. et al. Accepted Manuscript Title: The improvement of oxidative stress by two proprietary herbal medicines in type 2 diabetes. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 40, n. August, p. 120–125, 2018.

ZHENG, B. L. et al. Effect of Aqueous Extract from *Lepidium meyenii* on Mouse Behavior in Forced Swimming Test. p. 258–268, 2002.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1–10, 2020.

## APÊNDICE A- Artigo publicado

O apêndice A trata-se de um artigo publicado na revista “Food Research International” intitulado “Structural diversity, biosynthetic aspects, and LC-HRMS data compilation for the identification of bioactive compounds of *Lepidium meyenii*” que apresenta os principais metabólitos já identificados da *L. meyenii* abordando os aspectos relacionados a biossíntese desses metabólitos e as atividades biológicas testadas.

Food Research International 125 (2019) 108615



Review

### Structural diversity, biosynthetic aspects, and LC-HRMS data compilation for the identification of bioactive compounds of *Lepidium meyenii*

Fernanda V. Carvalho, Paulo R. Ribeiro\*

Metabolomics Research Group, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo s/n, 40170-115 Salvador, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Bioactive compounds  
Chemical composition  
Metabolomics  
Peruvian maca

#### ABSTRACT

*Lepidium meyenii* is widely used as a food supplement because of its medicinal properties and nutritional value. Several studies have described the identification of its metabolites and LC-HRMS analysis is one of the most frequently used analytical tool to assess plant extract metabolome. Nevertheless, proper and reliable metabolite identification is essential for such metabolomics studies. Although HRMS distinguishes even minor changes in the metabolites structures, highly specialized secondary metabolites might not be present on available databases imposing serious obstacles for metabolite identification. This review discusses the structural diversity and biosynthetic aspects of 101 compounds previously identified in *L. meyenii*. More importantly, we have compiled the available information on expected and experimental high-resolution masses of *L. meyenii* compounds. This will help upcoming metabolomics studies not only of *L. meyenii* but also other plant species by providing the necessary tools to perform proper and reliable identification of their bioactive compounds.

#### 1. Introduction

Medicinal plants are historically used by economically vulnerable or traditional communities that have difficulties accessing modern medicine treatments. Often, these communities are isolated in villages, provinces, islands or tribes far away from large cities or urban centers (Dalar, Mukemre, Unal, & Ozgokce, 2018; Rummun, Neergheen-Bhujun, Pynee, Baidar, & Bahorun, 2018). Therefore, medicinal plants are essential for those communities to ensure basic healthcare (Silambarasan, Sureshkumar, Krupa, Amalraj, & Ayyanar, 2017). A diverse panel of secondary metabolites are responsible to confer the pharmacological properties to these plants, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, cytotoxic, and immunomodulatory activities (Bittencourt et al., 2015; Debnath et al., 2018; D'Sousa Costa et al., 2015; Geris, Ribeiro, Da Silva Brandão, Da Silva, & Da Silva, 2012; Lima Pereira et al., 2017; Montesano, Rocchetti, Putnik, & Lucini, 2018; Sarikahya et al., 2018). These bioactive compounds include alkaloids, phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, lignans, stilbenes and tannins), steroids, glucosides, tannins, terpenoids and phytoalexins (Debnath et al., 2018; Ribeiro, de Castro, & Fernandez, 2016; Ribeiro, Ferraz, & Cruz, 2019; Santos et al., 2018). Therefore, medicinal plants are potential sources of bioactive compounds for the development of more efficient new drugs.

*Lepidium meyenii*, popularly known as Peruvian maca, is originally

found in the Peruvian Andes. This region possesses very unique climatic and environmental conditions, which includes high altitudes, low temperatures and humidity, intense winds, rain and sunlight, low pressure, high UV and cosmic radiation (Gonzales, Gonzales, & Gonzales-Castañeda, 2009). This is a biennial plant that presents different phenotypes primarily based on the hypocotyl color. As a matter of fact, thirteen distinct colors have been described so far, but red, yellow and black are the most hypocotyl color found (Inoue, Farfan, & Gonzales, 2016; Qiu, Zhu, Lan, Zeng, & Du, 2016). *Lepidium meyenii* is used as a food supplement because of its medicinal properties and nutritional value. *L. meyenii* traditional uses encompass spermatogenesis, female fertility, and sexual performance enhancement (Dording et al., 2008; Gonzales et al., 2009; Inoue et al., 2016), reduction of osteoporosis (Gonzales et al., 2010; Zhang, Yu, Ao, & Jin, 2006), improvement of learning and memory skills (Rubio et al., 2007; Rubio, Yucra, Gasco, & Gonzales, 2011), ultraviolet radiation protection (Gonzales-Castañeda & Gonzales, 2008; Gonzales-Castañeda, Rivera, Chirinos, Evelson, & Gonzales, 2011), anti-fatigue (Tang et al., 2017; Yang et al., 2015), hepatoprotective (Cheng et al., 2013; Zhou et al., 2018), antioxidant (Rodríguez-Huamán et al., 2017; Wang et al., 2018), and immunomodulatory properties (Wang et al., 2016; Zhang, Wang, Lai, & Wu, 2016). *L. meyenii* roots are used in the traditional medicine as liquid preparations such as juices, although hypocotyls are boiled prior to consumption to make it softer (Gonzales, 2010, 2012). Curiously, it is

\* Corresponding author.

E-mail addresses: pauloribeiro@ufba.br, paulodc3@gmail.com (P.R. Ribeiro).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108615>

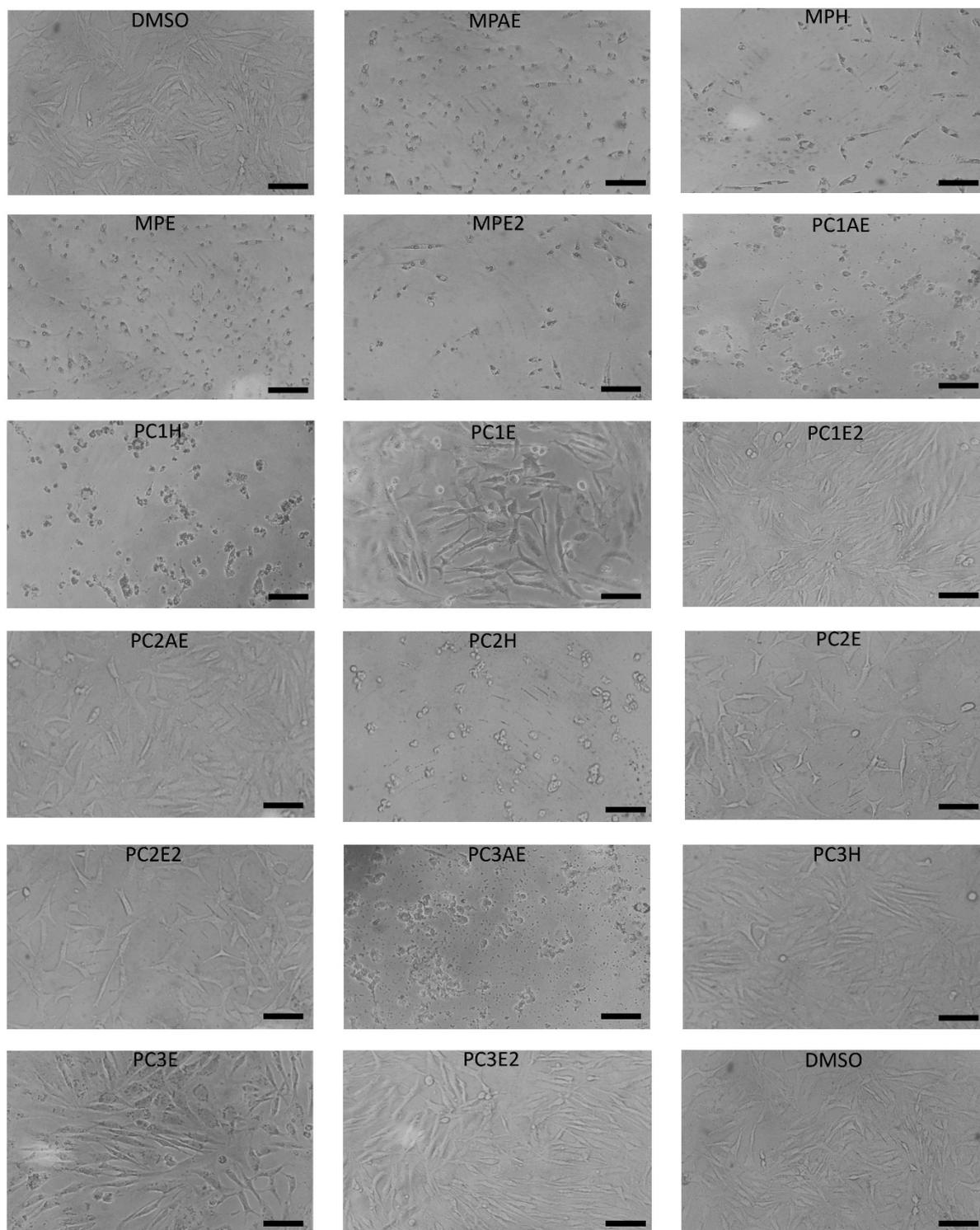
Received 13 April 2019; Received in revised form 6 August 2019; Accepted 11 August 2019

Available online 13 August 2019

0963-9969/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

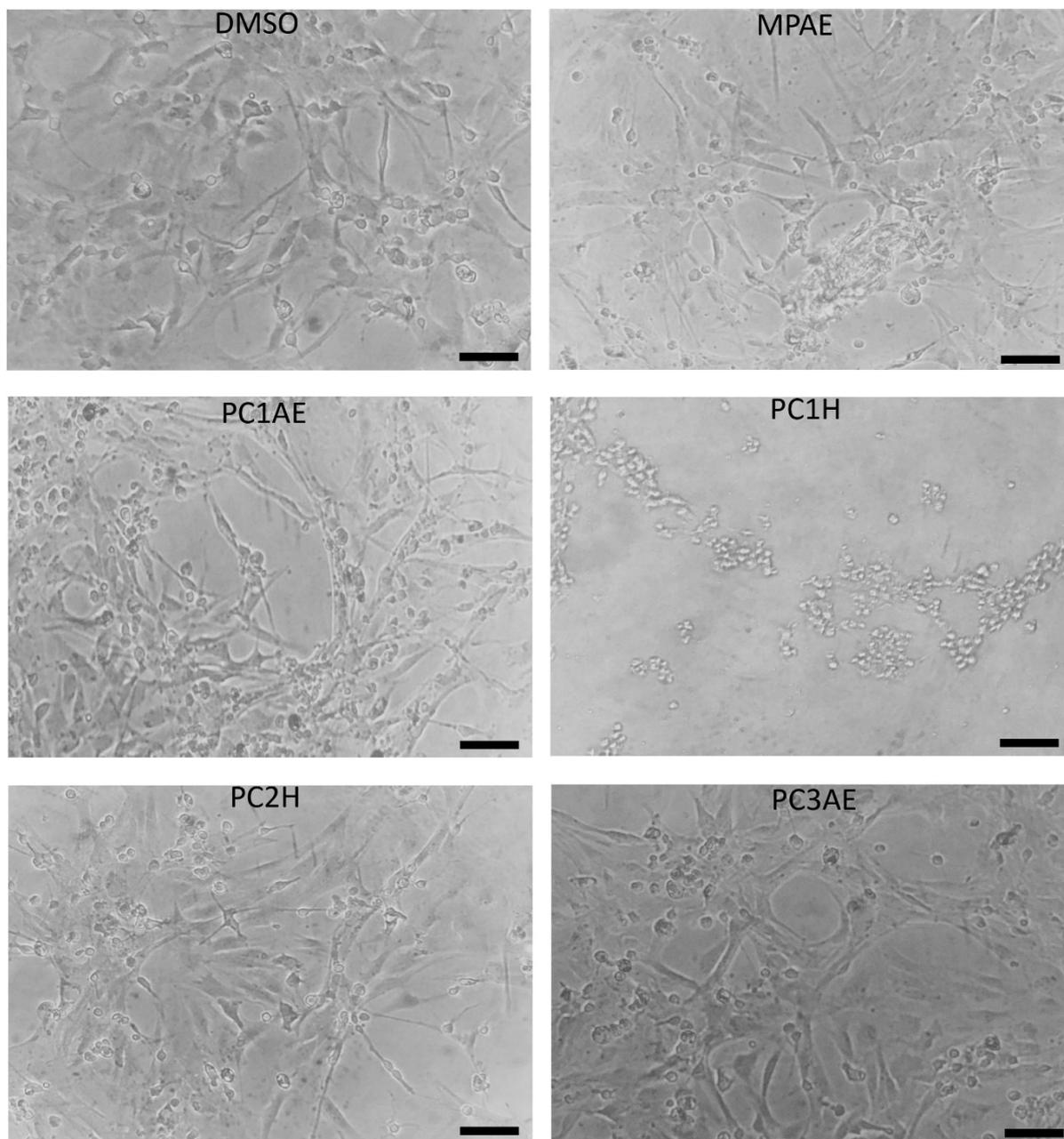
## APÊNDICE B- Figuras suplementares

**Figura 15.** Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 tratadas com os extratos da raiz da *L. meyenii* e de seus produtos comerciais ( $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e células C6 não tratadas ( $\text{DMSO } 100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) após um período de 24 horas



MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. ( $\text{DMSO } 100\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Barra = 50 µm.

**Figura 16.** Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de astrócitos tratados com os extratos da raiz da *L. meyenii* e de seus produtos comerciais ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e astrócitos não tratados (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) após um período de 24 horas



MP= Maca peruana desidratada; PC1= Produto comercial 1; PC2= Produto comercial 2; PC3= Produto comercial 3; H= hexano; AE= acetato de etila; E = Extrato etanólico 1; E2 = Extrato etanólico 2. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

## ANEXO A- Certificado da CEUA



# Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Prospecção de potencial farmacológico de metabolitos de plantas em modelos de doenças do SNC.", protocolada sob o CEUA nº 6731220818 (ID 000058), sob a responsabilidade de **Silvia Lima Costa e equipe**; *Silvia Lima Costa; Maria de Fátima Dias Costa; Ramon dos Santos El-Bachá; Victor Diógenes Amaral da Silva; Suzana Braga de Souza; Juliana Helena Castro e Silva; Leticia Oliveira dos Santos; Monique Marylin Alves de Almeida Carneiro; Naiara Silva Dourado; Balbino Lino dos Santos; Joana Luz Oliveira; Ravena Pereira Nascimento; Cleonice Creusa dos Santos; Fillipe Mendes de Araújo; Rafael Short Ferreira; Luã Tainã Costa Reis; Jessika Alves Oliveira Amparo; Fernanda Bueno de Oliveira; Sarah Alexandra Silva Lima; Janaina Ribeiro Pereira Soares* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 20/03/2019.

We certify that the proposal "Prospecting the pharmacological potential of plant metabolites in CNS disease models.", utilizing 107 Heterogenics rats (males and females), 77 Isogenics mice (77 males), protocol number CEUA 6731220818 (ID 000058), under the responsibility of **Silvia Lima Costa and team**; *Silvia Lima Costa; Maria de Fátima Dias Costa; Ramon dos Santos El-Bachá; Victor Diógenes Amaral da Silva; Suzana Braga de Souza; Juliana Helena Castro e Silva; Leticia Oliveira dos Santos; Monique Marylin Alves de Almeida Carneiro; Naiara Silva Dourado; Balbino Lino dos Santos; Joana Luz Oliveira; Ravena Pereira Nascimento; Cleonice Creusa dos Santos; Fillipe Mendes de Araújo; Rafael Short Ferreira; Luã Tainã Costa Reis; Jessika Alves Oliveira Amparo; Fernanda Bueno de Oliveira; Sarah Alexandra Silva Lima; Janaina Ribeiro Pereira Soares* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 03/20/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **12/2022**

Área: **Biotecnologia**

Origem:	<b>Biotério do Laboratório de Neurociências</b>	sexo:	<b>Machos e Fêmeas</b>	idade:	<b>0 a 2 dias</b>	N:	<b>81</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>			Peso:	<b>3 a 6 g</b>		
Linhagem:	<b>Wistar</b>						
Origem:	<b>Biotério do Instituto Gonçalo Muniz</b>	sexo:	<b>Machos</b>	idade:	<b>4 a 8 semanas</b>	N:	<b>77</b>
Espécie:	<b>Camundongos isogênicos</b>			Peso:	<b>40 a 55 g</b>		
Linhagem:	<b>C57BL/6</b>						
Origem:	<b>Biotério do Laboratório de Neurociências</b>	sexo:	<b>Machos e Fêmeas</b>	idade:	<b>6 a 8 dias</b>	N:	<b>12</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>			Peso:	<b>15 a 20 g</b>		
Linhagem:	<b>Wistar</b>						
Origem:	<b>Biotério do Laboratório de Neurociências</b>	sexo:	<b>Fêmeas</b>	idade:	<b>6 a 14 semanas</b>	N:	<b>14</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>			Peso:	<b>200 a 300 g</b>		
Linhagem:	<b>Wistar</b>						

Local do experimento: Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/nº, Vale do Canela, Salvador, 40.110-902, Salvador, Bahia.

Salvador, 25 de março de 2019



# Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)