



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Filipa Jesus Alves Farinha

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
ANTITUMORAIS DE PLANTAS DO VALE DO
CÔA**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, orientado pela Doutora Célia Margarida dos Santos Cabral e coorientada pela Doutora Helena Maria de Oliveira Freitas e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Filipa Jesus Alves Farinha

**Avaliação de propriedades antitumorais de plantas do Vale do Côa:
Rumex induratus Boiss. & Reut.**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pela Doutora Margarida dos Santos Cabral e coorientada pela Doutora
Helena Maria de Oliveira Freitas e apresentada ao Departamento Ciência da Vida,
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

outubro de 2021

Resumo

O carcinoma hepatocelular (HCC) é um dos câncros que provoca mais mortes em todo o Mundo. Os tratamentos para esta neoplasia são escassos, paliativos e não são específicos para cada doente. É deveras importante encontrar terapias mais eficazes e com menos efeitos secundários. A descoberta de novos compostos em plantas medicinais ou alimentos é uma estratégia promissora para a prevenção e o tratamento de doenças, não só porque as plantas têm imenso potenciais terapêuticos que sempre foram usados para o tratamento de doenças, mas também porque novas tecnologias permitem isolar compostos naturais e maximizar o seu poder terapêutico.

Com este mote, o objetivo deste trabalho é verificar a citotoxicidade de *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (*R. induratus*) através de três extratos diferentes: infusão, extratos hidroalcolico e etanólico nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular (HepG2, HuH7 e Hep3B). Deste modo, pretende-se descobrir novas funções desta planta que é atualmente consumida na alimentação, levando assim a sua valorização.

Nos extratos de *R. induratus* foram identificados os compostos fenólicos: luteolina, ácido cafeico, quercetina e apigenina e alguns derivados. O potencial antioxidante destas moléculas possibilita perceber que os extratos vegetais induziram o aumento do potencial de membrana em todas as linhas celulares, tendo a linha HepG2 os valores mais elevados. Quanto a quantificação de ROS foi detetado um padrão de crescimento na concentração do anião superóxido e uma diminuição dos peróxidos perante o aumento da concentração dos extratos de *R. induratus*. O aumento de ROS provoca a alteração do potencial de membrana, levando a diminuição da atividade metabólica nas células tumorais.

Em conclusão o extrato vegetal proporciona diferenças intracelulares que podem levar ao desencadeamento da apoptose nas células tumorais.

Palavras-chave: Vale do Côa,

Plantas hepatoprotetoras,

Rumex induratus,

Carcinoma hepatocelular,

Espécies reativas de oxigénio.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the deadliest worldwide. Treatments for this neoplasia are scarce, palliative and are not specific to each patient. It is very important to find more effective therapies with fewer side effects. The discovery of new compounds in medicinal plants or foods is a promising strategy for the prevention and combat of diseases, not only because plants have immense therapeutic potential that have always been used for the treatment of diseases, but also because new technologies allow the isolation of natural compounds with greater therapeutic effect.

Beating this in mind, the objective of this work is the verification of the toxicity of those extracts from *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (*R. induratus*): infusion, hydroethanolic and ethanolic in HCC cells lines (HepG2, HuH7 e Hep3B). This aims to discover new functions of this plant that is currently consumed as food, leading to its valorization.

In the extracts of *R. induratus* it is possible to identify phenolic compounds like luteolin, caffeic acid, quercetin or apigenin and some derivatives. The antioxidant potential of these molecules allows the understanding that plant extracts led to an increase in membrane potential in all cell lines, with the HepG2 line presenting the highest values. As for the quantification of ROS, a growth pattern in the concentration of the superoxide anion and a decrease in peroxides was detected due to the increase in the concentration of *R. induratus* extracts.

The increase in ROS is related to the increase in membrane potential, leading to decreased cell viability of tumor cells.

In conclusion, the plant extract provides intracellular differences that can lead to the triggering of apoptosis in tumor cells.

Keywords: Côa Valley,

Hepatoprotective plants,

Rumex induratus,

Hepatocellular carcinoma,

Reactive oxygen species.

Esta tese foi apoiada por:



Fundação para a Ciência
e a Tecnologia



Coimbra Institute for Clinical
and Biomedical Research



Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra



Instituto Politécnico de
Bragança



Projeto CoaMedPlants
COA/BRB/0019/2019

Agradecimentos

Aproximando-se o fim desta caminhada incrível de aprendizagem, só me resta agradecer às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

As minhas orientadoras, em primeiro lugar, Doutora Célia Cabral, Doutora Ana Cristina Gonçalves e Doutora Helena Freitas pela partilha de conhecimentos, pela paciência, por toda a disponibilidade, esforço e palavras sábias durante todo o tempo de trabalho.

À Raquel, à Joana, à Beatriz, à Mariana e à Inês, um agradecimento gigante por todo o apoio no laboratório, por responderem a todas as minhas questões e pela disponibilidade total para me ajudarem. Um agradecimento especial à Raquel por ter acompanhado e realizado um trabalho mais próximo comigo, sendo que um obrigado não é suficiente.

Aos meus colegas de bancada, Inês, Tânia e Miguel pelo companheirismo no laboratório, pela entreatajuda na realização do trabalho e pela partilha de experiências.

À Beatriz Lourenço (Cv), à Beatriz Cristóvão, à Rute, à Carolina Nunes e à Fragão pelo apoio em todas as horas, pelo ombro amigo nos momentos de tristeza e frustração e pela coragem e força transmitida para não desistir.

À Carolina Nunes, Fragão, Rita, Cadilhe, Ruivinho e Inês Silva, que mesmo longe e no meio de uma vida extremamente preenchida, conseguem encontrar um momento para me ajudar e apoiar, o que Coimbra junta ninguém separa.

Ao pessoal da Sertã, Sofia, Rute, Mariana, Bia, Sara, Rafa, Rui, Bruno e João pela amizade, resiliência e apoio ao longo dos anos. Pelas noites de descontração e conversas sobre tudo e sobre nada.

Às minhas Teodoritas, às antigas Filipa, Sara e Bina e às novas Maria Júlia, Abigail, Jénifer e Beatriz que convivem comigo 24/24 horas, pelo companheirismo, pela amizade e pelas conversas a meio da noite. À D. Isabel que me atura há quase 6 anos e continua a ter paciência para longas conversas e brincadeiras.

A todos os que não mencionei, mas que estão no meu pensamento. Muito obrigada!

E por fim, mas aos mais importantes, à minha mãe que tornou tudo isto possível, a realização de uma licenciatura, de um mestrado e uma tese, sem ti nada disto era possível, obrigada por nunca teres desistido. Aos meus irmãos, Cristiana e Ricardo pela motivação e por estarem sempre por perto, pelas brincadeiras e descontração tantas vezes precisas. Por fim a minha avó pela preocupação no meu bem-estar e por ser um exemplo de força a seguir. Obrigada!

Índice	
Resumo	III
Abstract.....	V
Agradecimentos.....	IX
Índice de Figuras	XIII
Índice de tabelas.....	XIII
Abreviaturas.....	XV
I. Introdução	1
1.1 Vale do Côa.....	3
1.2 Plantas Medicinais.....	4
1.3 Plantas Hepatoprotetoras.....	6
1.3.1 <i>Rumex induratus</i> Boiss. & Reut.	7
1.4 Cancro.....	10
1.4.1 Fígado.....	10
1.4.2 Carcinoma hepatocelular	11
1.4.3 Fatores de risco e incidência	13
1.4.4 Diagnóstico e Tratamento	14
1.5 Objetivos	15
II. Materiais e Métodos.....	17
2.1 Material Vegetal	19
2.1.1 Reagentes.....	19
2.1.2 Recolha das plantas	19
2.2 Material Celular.....	20
2.2.1 Linhas Celulares	20
2.2.2 Cultura de Células	21
2.3 Ensaio Celulares	22
2.3.1 Atividade metabólica	22
2.3.2 Morfologia Celular	23
2.3.3 Morte Celular.....	24
2.3.4 ROS	25
2.3.4.1 Avaliação dos níveis do anião superóxido.....	26
2.3.4.2 Avaliação dos níveis do superóxido de hidrogénio.....	26
2.4 Análise estatística.....	27
III. Resultados.....	29
3.1 Caraterização dos extratos vegetais	31

3.2	Ensaio biológicos	32
3.2.1	Ensaio com cisplatina	32
3.2.2	Ensaio com os extratos vegetais	34
3.3	Morfologia Celular	38
3.4	Morte Celular	40
3.5	ROS	42
IV.	Discussão	45
4.1	Caraterização dos extratos	47
4.2	Ensaio biológicos	49
V.	Conclusões e perspectivas futuras	55
VI.	Referências bibliográficas	57

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa da região do Côa	3
Figura 2: Distribuição do <i>R. induratus</i>	7
Figura 3: <i>R. induratus</i>	8
Figura 4: Os seis hallmarks do cancro	12
Figura 5: Incidência Mundial de cancro do fígado em 2020	14
Figura 6: Conversão de resazurina em resorufina	23
Figura 7: Estrutura química do hidroetídio e do etídio	26
Figura 8: Detecção de peróxido de hidrogénio através da oxidação DCFH ₂ DA em DCF	27
Figura 9: Curva dose-resposta da cisplatina nas linhas celulares	33
Figura 10: Curva dose-resposta da infusão nas linhas HepG2, HuH7, Hep3B	35
Figura 11: Curva dose-resposta do extrato hidroalcoólico nas linhas HepG2, HuH7, Hep3B	36
Figura 12 Curva dose-resposta do extrato alcoólico nas linhas HepG2, HuH7, Hep3B	37
Figura 13: Morfologia das células HepG2	38
Figura 14: Morfologia das células HuH-7	38
Figura 15: Morfologia das células Hep3B	39
Figura 16: Potencial de membrana em células HepG2, HuH7 e Hep3B	41
Figura 17: Níveis de Anião superóxido em células HepG2, HuH7 e Hep3B	42
Figura 18: Níveis de Peróxido em células HepG2, HuH7 e Hep3B	43
Figura 19: Estrutura química da luteolina	47
Figura 20: Estrutura química do ácido cafeico	48
Figura 21: Estrutura química da quercetina	48
Figura 22: Estrutura química da apigenina	49
Figura 23: Vias de apoptose	52

Índice de tabelas

Tabela 1: Compostos obtidos das folhas de <i>R. induratus</i>	9
Tabela 2: Compostos extraídos de <i>R. induratus</i>	31

Abreviaturas

5-FU- 5-fluorouracilo

AC- Ácido cafeico

AKT- (do inglês) Serine/threonine kinase

ALP- Fosfatase alcalina

ALT- Alanina aminotransferase

Apaf-1- Fator de ativação de protéases apoptóticas

AST- Aspartato aminotransferase

ATCC- (do inglês) American Type Culture Collection

CCL₄-Tetracloroeto de carbono

Cyt C- Citocromo C

DAD -Deteção de matriz de díodos

DCFH₂- 2',7'-Diclorofluoresceína

DCFH₂DA- Diclorodihidrofluoresceína

DHE- Diidroetídio

DMEM- (do inglês) Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO- Dimetilsulfóxido

DMXL1- (do inglês) DmX-Like Protein 1

DNA- (do inglês) Deoxyribonucleic acid

DPPH- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-radical

EGFR- (do inglês) Epidermal Growth Factor Receptor

Et100%- Extração etanólica

Et80%- Extração hidroalcolica (80:20v/v)

FBS- Soro fetal bovino

FDA - (do inglês) Food and Drug Administration

GSH- Glutathiona reduzida

H₂O- Água

H₂O MQ -Água miliQ

H₂O₂-Peróxido de hidrogénio

HCC- Carcinoma hepatocelular

HPLC- (do inglês) High-performance liquid chromatography

IGF1-(do inglês) Insulin-Like Growth Factor 1

IGFR- (do inglês) Insulin-Like Growth Factor 1 receptor vascular

IL6ST- (do inglês) Interleukin 6 Cytokine Family Signal Transducer

JC-1- Sonda 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboianina iodeto

KRAS - (do inglês) KRAS Proto-Oncogene

mg- Miligrama
mL-Mililitro
mM- Milimolar
mRNA- RNA mensageiros
MS- Metabolitos secundários
mTOR- (do inglês) Mammalian target of rapamycin
NLRP1- (do inglês) NLR Family Pyrin Domain Containing 1
nm- Nanometros
NRAS- (do inglês) Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog
O₂⁻- Anião superóxido
°C- Graus celsius
P53- Proteína supressora de tumor
PARP- (do inglês) poly-ADP ribose polymerase
PBS- Tampão fosfato salino
PDGF- (do inglês) Platelet Derived Growth Factor
PI3K- (do inglês) Phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA- (do inglês) Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit
PTEN- (do inglês) Phosphatase and Tensin-Like Protein
RNA- (do inglês) Ribonucleic acid
ROS- Espécies reativas de oxigênio
Rpm-Rotações por minuto
RPS6KA3- (do inglês) Ribosomal Protein S6 Kinase A3
SAMD9L- (do inglês) Sterile Alpha Motif Domain Containing 9 Like
SGOT- Soro glutâmico oxaloacético transaminase
SGPT- Soro glutâmico pirúvico transaminase
TP53- (do inglês) Tumor Protein P53
UV- Raios Ultravioleta
VEGF-Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR- (do inglês) Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor
 $\Delta\Psi_{mit}$ - Potencial da membrana mitocondrial
 μ g-Micrograma
 μ L-Microlitro

I. Introdução

1.1 Vale do Côa

O Vale do Côa está situado na região nordeste de Portugal, pertence ao distrito da Guarda e nas suas margens predomina um clima mediterrânico (Figura 1). Este vale é atravessado pelo rio Côa que nasce na Serra das Mesas e desagua no rio Douro (Aubry et al., 2012), sendo um dos poucos rios portugueses que faz um trajeto sul-norte.

Apresentando um património cultural de Arte Rupestre do período paleolítico bastante valioso, o Vale do Côa foi considerado, em 1998, Património Mundial pela UNESCO (Aubry et al., 2012). Porém, também possui um importante património natural de plantas medicinais, muitas das quais desconhecidas da comunidade científica, mas que a população local usa para a alimentação e/ou tratamento de diversas doenças.

O parque arqueológico do Vale do Côa, localiza-se na foz do rio Côa, abrangendo um território de 200km² e uma enorme diversidade vegetal que ascende a cerca de 1800 espécies identificadas, distribuídas pelos 4 concelhos que o constituem: Vila Nova de Foz Côa (537 espécies), Figueira de Castelo Rodrigo (487 espécies), Pinhel (415 espécies) e Mêda (379 espécies) (Clamote et al., 2021).

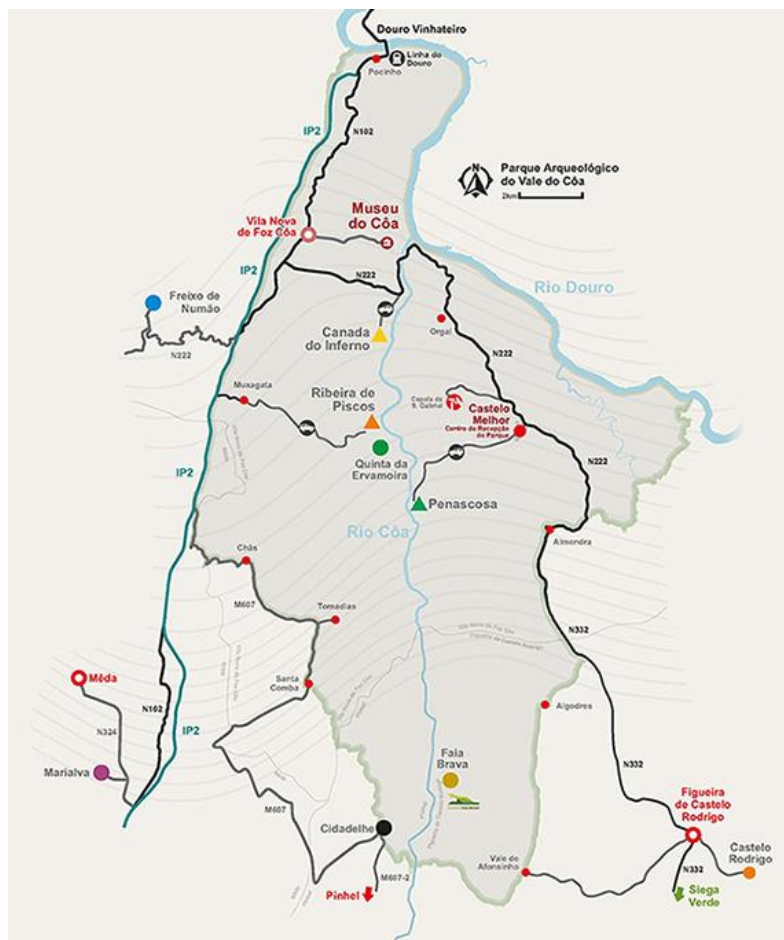


Figura 1: Mapa da região do Côa, destacando-se o parque arqueológico do Vale do Côa e a zona envolvente. (Imagem adaptada do arte-coa.pt).

1.2 Plantas Medicinais

A saúde e a alimentação apresentam uma relação estreita. Uma boa saúde está associada a uma boa alimentação, tendo esta relação uma importância acrescida em alguns países (Pinela et al., 2016). A dieta mediterrânea, por exemplo, graças às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, é conhecida por ter muitos benefícios, como a prevenção no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Estruch et al., 2018) ou a diminuição do risco de desenvolver cancro (próstata, colón e mama) (Mentella et al., 2019). Também as dietas ricas em plantas com propriedades antioxidantes, são conhecidas por previnirem doenças degenerativas (Guerra et al., 2008). Por exemplo o consumo de produtos com β -caroteno previne o declínio cognitivo e o consumo de carotenoides mantém o bom estado da memória, sendo assim produtos associados à prevenção de sintomas de doenças degenerativas como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Chandra et al., 2012).

De fato, diversos medicamentos baseados em produtos naturais têm sido aprovados como antiparasíticos, antifúngicos, anticancerígenos, antidiabéticos, entre outros (Newman & Cragg, 2020). Na mais recente revisão de Newman e Cragg, onde é realçada a importância dos produtos naturais, foi demonstrado que dos fármacos aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 e 2019, 45% tinham por base produtos naturais, podendo ser compostos isolados naturais, medicamentos derivados de produtos naturais ou semissintéticos (que apresentam uma parte natural) (Newman & Cragg, 2020).

Produtos naturais são compostos químicos produzidos por um organismo vivo como bactérias, fungos, plantas e organismos marinhos que possuem atividades biológicas (Katz & Baltz, 2016). As plantas são os organismos mais usados, graças ao fácil acesso, na verdade, há milhares de anos que as plantas são utilizadas na alimentação e no tratamento do Homem. O valor das plantas é conhecido e o uso de compostos naturais tem crescido em todo o mundo (Blowman et al., 2018). A OMS (Organização Mundial de Saúde) declarou que, atualmente, 80% da população global usa plantas para o tratamento de doenças (Sen & Samanta, 2014). Além do aumento do uso de plantas, também a investigação em plantas tem crescido, sendo que em 2015, o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina foi atribuído a uma investigadora, Youyou Tu, que descobriu que compostos ativos da *Artemisia annua* induzem morte em *Plasmodium*, os parasitas da malária.

Estima-se que até à data apenas 17% das plantas com flor tenham sido estudadas (Özaslan & Oguzkan, 2018), mostrando que ainda existe uma enorme fonte de produtos naturais por explorar. Devido ao fato de vários compostos terapêuticos terem sido descobertos nesta pequena percentagem, levanta-se a questão de quantos mais compostos poderão ainda ser descobertos.

Posto isto, torna-se relevante a existência de estudos aprofundados das propriedades medicinais das mais diversas espécies de plantas, que, como já referido, pode levar à descoberta de novos agentes terapêuticos.

As plantas possuem um metabolismo primário, exclusivo para os processos vitais de vida da planta (ex. fotossíntese, respiração, síntese de proteínas) e um metabolismo secundário que sintetiza quantidades reduzidas de compostos para a proteção da planta, os metabolitos secundários (MS). Estes são compostos orgânicos de diversas famílias que apresentam variabilidade interespecífica e em alguns casos, intraespecífica pois são influenciados por fatores abióticos, levando a que cada planta apresente uma composição química única (Özaslan & Oguzkan, 2018).

Os MS são constituintes ativos na proteção das plantas contra as alterações do meio ambiente (ex. mudanças de temperatura, humidade, intensidade de luz), sendo também defesas químicas contra predadores, agentes patogénicos ou outras plantas, podendo ainda ter a função de atração de polinizadores (Blowman et al., 2018; Özaslan & Oguzkan, 2018). Os MS podem ser classificados como terpenos, compostos fenólicos, alcaloides, esteróis, entre outros (Haider, 2020). Além dos vários efeitos de adaptação e sobrevivência das plantas, estes podem apresentar diferentes propriedades benéficas para a saúde humana pois possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e anticancerígena (Madrigal-Santillán et al., 2014).

As propriedades antioxidantes dos MS são as mais estudadas, uma vez que a oxidação celular está associada a várias doenças. Os compostos fenólicos, por exemplo, têm a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigénio (ROS) e diminuir o stress oxidativo celular (Colle et al., 2012). Além disso, os MS podem apresentar efeitos anticancerígenos através da inibição do desenvolvimento de células cancerígenas, da diminuição da metastização e da potenciação da quimioterapia (Y. Zhou et al., 2016).

O uso de plantas como tratamento de doenças é muito frequente, em especial em meios rurais. O consumo de plantas requer uma atenção redobrada, uma vez que a dose terapêutica e tóxica de algumas espécies é muito próxima, o que leva à existência de intoxicações graves. Por exemplo, são relatadas muitas intoxicações através de *Digitalis purpurea* L., os doentes apresentam arritmias cardíacas (Lehmann et al., 2021) depois de ingerirem infusões desta planta, porém os heterósidos cardiotónicos extraídos desta planta são usados em concentrações controladas para o tratamento de doenças cardíacas (Prassas & Diamandis, 2008).

A utilização de produtos naturais extraídos de plantas é importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes compostos podem ser usados como compostos isolados, nomeadamente como a morfina extraída da *Papaver somniferum* L. (Gil et al., 2019), como compostos de hemi-síntese, designadamente o paclitaxel isolado de *Taxus*

brevifolia Nutt (Alves et al., 2018) ou como inspiração para o desenvolvimento de novas moléculas com efeito terapêutico (Howes, 2018).

O potencial terapêutico das plantas é aplicado na medicina como no caso da quimioterapia convencional, onde 25% dos compostos advêm de produtos vegetais (Blowman et al., 2018). A existência de patentes de compostos terapêuticos com base em plantas como os flavonóides da *Butea monosperma* (Lam.) Taub. (*B. monosperma*) que são utilizados no tratamento do carcinoma hepatocelular (Gupta et al., 2006), ou a solamargina e solasonina extraídas de plantas do gênero *Solanum* que inibem a proliferação de células tumorais do fígado, pulmão e mama (Thereof, 2006) demonstram a importância terapêutica das plantas (Sen & Samanta, 2014).

1.3 Plantas Hepatoprotetoras

As plantas dependendo dos MS e das suas concentrações apresentam diferentes atividades biológicas: anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, hepatoprotetora entre outras.

A atividade hepatoprotetora, desempenhada no fígado, apresenta duas vertentes: a regeneração do tecido hepático, onde os extratos ou compostos isolados das plantas protegem os hepatócitos de lesões provocadas por tóxicos (tetracloreto de carbono (CCL₄), drogas entre outros) e o controlo de desenvolvimento de neoplasias, tendo os extratos atividade citotóxica, provocando lesões nas células tumorais hepáticas (Madrigal-Santillán et al., 2014).

As plantas com atividade hepatoprotetora têm na sua constituição MS ativos como cumarinas, terpenóides, carotenoides, glicosídeos, flavonóides, alcalóides, óleos essenciais, taninos, xanteno (Al-malki et al., 2013; Blowman et al., 2018) e quercetina (Fernández-Palanca et al., 2019). Estes compostos protegem as células, reduzindo a necrose induzida por agentes tóxicos, ajudando na reconstituição e estabilização da membrana celular (Madrigal-Santillán et al., 2014), bem como na regulação dos níveis das enzimas hepáticas para os valores normais (Kumar et al., 2012).

Extratos de plantas como a *Artemisia absinthium* L. (*A. absinthium*) e o *Cichorium intybus* L. (*C. intybus*) testados, *in vivo*, comprovaram a atividade hepatoprotetora dos extratos. A exposição de ratos a CCL₄, provoca o aumento do nível de enzimas hepáticas como: a alanina aminotransferase (ALT), o aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (ALP). Um tratamento antes e durante a exposição ao CCL₄ com *A. absinthium* e *C. intybus* respetivamente, diminui significativamente os níveis das enzimas hepáticas (Amat et al., 2010; Elgengaihi et al., 2016).

Plantas como a *Portulaca oleracea* L. (*P. oleracea*) tem por outro lado efeitos citotóxicos em células tumorais do fígado. Testes realizados, *in vitro*, onde o óleo das

sementes de *P. oleracea* foi adicionado ao meio de cultura de células de carcinoma hepatocelular (HepG2), levou à diminuição da atividade metabólica destas células (Al-Sheddi et al., 2015).

Existem ainda plantas como *Silybum marianum* (L.) Gaertn. de onde é possível extrair a silimarina que possuem capacidade hepatoprotetora e citotóxica. A silimarina é dos compostos extraídos de plantas mais estudados cientificamente. Em estudos onde a silimarina foi conjugada com fármacos para proteção hepática, os resultados foram positivos, havendo reduções superiores das enzimas hepáticas (ALT, AST) no tratamento conjugado do que apenas com o uso de fármacos (F. Wei et al., 2013). Por outro lado, a atividade citotóxica já foi comprovada em células de carcinoma hepatocelular (HepG2, HuH7 e Hep3B), onde a exposição destas à silimarina levou a redução da atividade metabólica celular, através da paragem do ciclo celular e pela indução de genes que codificam caspases 3 e 9 entrando as células em apoptose (Federico et al., 2017; Momeny et al., 2008).

1.3.1 *Rumex induratus* Boiss. & Reut.

Rumex induratus Boiss. & Reut. (*R. induratus*) é uma espécie nativa da Península Ibérica em especial de regiões de clima mediterrânico (Ferrerres et al., 2006). É uma planta espontânea no nordeste de Portugal (Figura 2), que cresce em abundância em locais rochosos (Guerra et al., 2008), nestes locais o *R. induratus* é conhecido pelo nome comum de azedas.

R. induratus pertence à família Polygonaceae, sendo o segundo género com mais exemplares desta família, que apresenta mais de 200 espécies (Shafiq et al., 2017). O género *Rumex* tem diversas atividades medicinais comprovadas como antioxidantes, antivirais, antifúngicos, antimutagénicos, antitumorais (Shafiq et al., 2017).

O *R. induratus* é um arbusto que pode atingir os 80 centímetros de altura (Figura 3A), ramificado e com folhas lanceoladas estreitadas na extremidade (Figura 3B). Apresenta inflorescências ramificadas, com várias flores hermafroditas por nó, sendo a época de floração entre maio e junho e tendo um máximo de floração no início de junho. As sementes são silículas que quando estão maduras apresentam uma cor castanho-

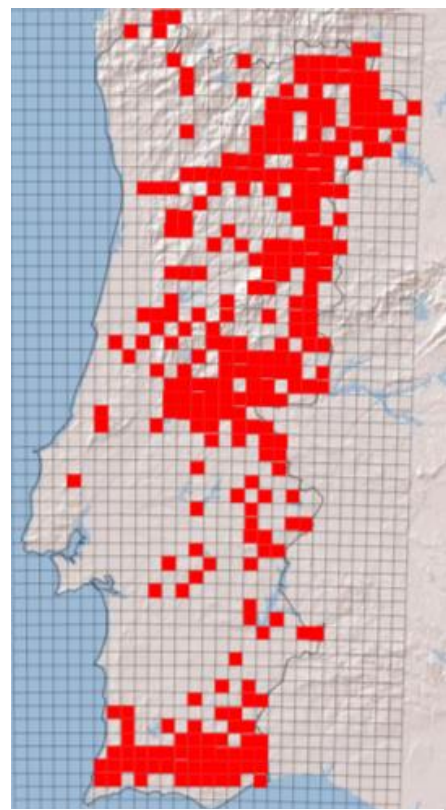


Figura 2: Distribuição do *R.induratus*. (Imagem adaptada da Flora.on).

avermelhada (Figura 3C e 3D) (López González, 1990).

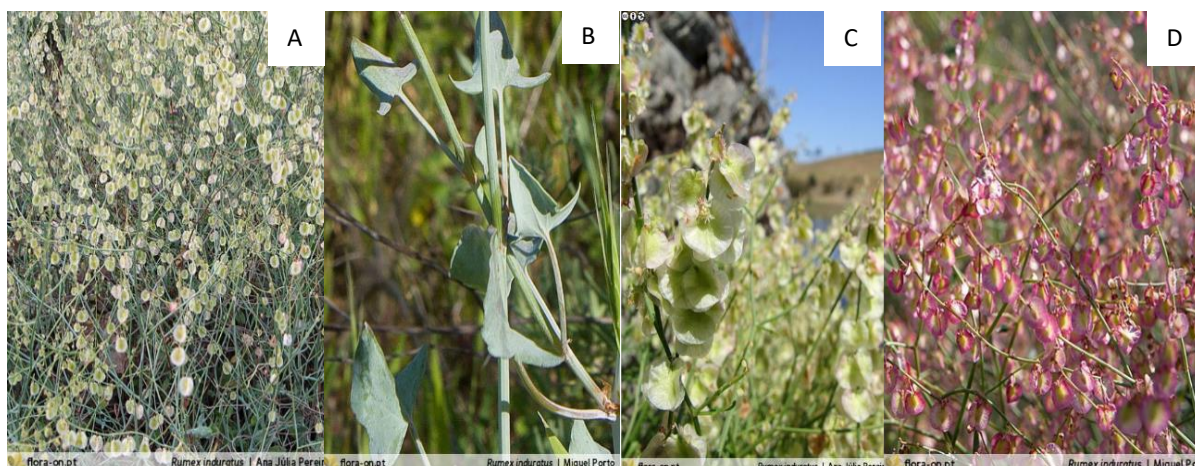


Figura 3: *R. induratus*. Planta inteira (A), folhas lanceoladas (B), frutos imaturos (C), frutos maduros (D) (Imagens adaptadas da Flora.on).

Um dos principais usos desta planta na alimentação é a utilização das folhas em saladas ou em conjunto com azeite para temperar batatas cozidas. Cientificamente apenas a atividade antioxidante foi descoberta nesta planta (Guerra et al., 2008).

Estudos anteriores demonstraram a presença de diversos metabolitos secundários em *R. induratus* (Tabela 1).

A concentração de compostos fenólicos é superior à dos ácidos orgânicos, sendo o composto fenólico mais abundante o 6-C-hexosil-apigenina. Em relação aos ácidos orgânicos, os mais abundantes são o ácido oxálico e málico, a concentração do último é inversamente proporcional ao desenvolvimento da planta, havendo apenas um aumento deste no inverno, enquanto a concentração do ácido oxálico se mantém elevada durante todo o desenvolvimento da planta. (Guerra et al., 2008).

Em 2008, Guerra e os colaboradores provaram que o extrato aquoso de *R. induratus* apresenta atividade antioxidante, *in vitro*, conseguindo sequestrar o radical superóxido apresentando um IC_{50} de $67.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (determinado por ensaios de 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)). O radical superóxido é uma das espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas nos seres vivos, que interage com iões de moléculas levando a alteração do estado de oxidação/redução destas (Ferrerres et al., 2006). Além de sequestrar o radical superóxido também consegue eliminar o óxido nítrico com IC_{50} de $92.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e com menor expressão o ácido hipocloroso com um IC_{20} de $171.3 \mu\text{g mL}^{-1}$. O óxido nítrico e o ácido hipocloroso são compostos que podem dar origem a ROS, podendo ser prejudiciais para as células (Guerra et al., 2008).

A atividade antioxidante que o *R. induratus* possui também existe em outras plantas do mesmo género, bem como outras atividades biológicas. O *Rumex vesicarius* L. (*R. vesicarius*), nativo da Arábia Saudita e o *Rumex abyssinicus* Jacq. (*R. abyssinicus*), nativo

Tabela 1: Compostos obtidos das folhas de *R. induratus*, através de diferentes extrações.

Extrato	Classe dos compostos	Compostos extraídos	Referência
Extrato aquoso das folhas	Ácidos Orgânicos	Ácido oxálico Ácido cítrico Ácido málico Ácido ascórbico Ácido chiquimico Ácido fumárico Ácido linoleico Ácido palmítico Ácidos estéricos Ácido benzoico	(Ferrerres et al., 2006; Guerra et al., 2008; Shafiq et al., 2017)
Extrato aquoso/metanólico das folhas	Compostos Fenólicos	Cafeoil-hexosído, P-coumaroil-hexosído Feruloil- hexosído Sinapoil-hexosido 6-C-hexosil-quercetina 6-C-hexosil apigenina 8-C-hexosil-luteolina 2"-O-pentosil-8-C-hexosil-luteolina 6-C-hexosil-luteolina 2"-O-pentosyl-8-C-hexosil-apigenina 6-C-hexosil- apigenina 3-O-hexosil-quercetina 3-O-rutinosil-quercetina 7-O- hexosil-diosmetina 3-O-rutinosil-isoramnetina	(Ferrerres et al., 2006; Guerra et al., 2008)
Compostos isolados	Terpenos	Esqualeno Limoneno Mentol E-piperitol Mirtenol Cânfora α -pineno Canfeno	(Shafiq et al., 2017) (Taveira et al., 2009)
Compostos isolados	Aldeídos	E- cinamaldeído Retinal	(Shafiq et al., 2017)
Compostos isolados	Cetonas	Hexahidrofernesilacetona Acetoianilona Jasmim	(Shafiq et al., 2017)
Compostos isolados	Nor-isoprenóides	Safranal, β -ciclocitral, Homociclocitral, β -demascenona, E-geranilacetona, β -ionona, A β -ionona metil	(Shafiq et al., 2017)
Compostos isolados	Esteroides	β -colestano α -colestano Estigmastano	(Shafiq et al., 2017)

de África por exemplo, apresentam atividade hepatoprotetora. O *R. vesicarius* apresenta compostos fenólicos como 8-C-glucosil-apigenina, 8-C-glucosil-luteolina, 6-C-hexosil-quercetina, 3-O-rutinosil-quercetina, 7-O-ramno-hexosil-diosmetina, catequina, epicatequina, hexosideo feruloil, 6-C-glucosil-naringenina, galato de epicatequina, 6-C-glucosil-catequina (El-Hawary et al., 2011). O *R. abyssinicus* apresenta compostos como ácido oxálico, ácido crisofânico, crisofanol e emodina (Getie et al., 2003).

Ratos que foram expostos ao agente tóxico CCL₄ (provoca o aumento do nível das enzimas hepáticas) e realizaram um pré-tratamento de 7 dias com extrato metanólico de *R. vesicarius* (Ganaie et al., 2015) e *R. abyssinicus* (Adamu et al., 2020) apresentaram uma diminuição dos níveis de expressão das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP, exibindo a concentração de 200 mg/kg do extrato de *R. vesicarius* níveis mais baixos que o controlo (Ganaie et al., 2015). Em ambos os estudos, foi analisada a histologia do tecido hepático, havendo em ambos os extratos uma recuperação do tecido lesionado pelo contacto com o CCL₄.

O extrato metanólico de *R. vesicarius* apresenta também atividade anti-tumoral/antiproliferativa para vários cancros como o do colón, ovários, da pele, do sistema nervoso e do sistema gástrico. Esta atividade julga-se estar associada aos polifenóis que constituem esta planta, em especial a quercetina e a miricetina (Shahat et al., 2015), neste estudo o extrato de *R. vesicarius* também inibe a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), impedindo a angiogénese (Shahat et al., 2015) levando a que as células tumorais, que necessitam de uma maior quantidade de nutrientes, para acompanhar o crescimento exponencial, fiquem sem acesso a estes, levando a uma redução da sua proliferação.

1.4 Cancro

1.4.1 Fígado

O fígado é um órgão que apresenta uma elevada importância no corpo humano uma vez que realiza diversas funções, como a regulação do metabolismo, a homeostase dos lípidos e do colesterol, a agregação e secreção de substâncias tóxicas e funções imunitárias (Eidi et al., 2012; Madrigal-Santillán et al., 2014; Trefts et al., 2017).

A regulação e estabilização do metabolismo corporal, realizada no fígado, é uma das funções mais importantes deste órgão, uma vez que permite reduzir altos níveis de glicose no sangue, através do processo de glicogénese, processo que converte a glicose em glicogénio que é armazenado no fígado e será utilizado posteriormente em situações de baixos níveis de glicose (Trefts et al., 2017).

A homeostase de lípidos é assegurada pelo fígado pois este é um dos dois órgãos que são responsáveis pela produção de ácidos gordos (principal constituinte dos lipídios) (Nguyen et al., 2008). Além da produção, o fígado também é responsável pela captação e armazenamento dos ácidos gordos em excesso no plasma (Alves-Bezerra & Cohen, 2018). Os ácidos gordos sintetizados no fígado são transportados em lipoproteínas estando envolvidos na construção das membranas plasmáticas celulares (Nguyen et al., 2008), sendo esta função de extrema importância para todo o organismo.

A eliminação de substâncias tóxicas como medicamentos, drogas, toxinas, álcool entre outras, realizada pelo fígado ocorre devido às várias enzimas associadas ao citocromo P450. Estas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias dos hepatócitos e são as mais conhecidas na metabolização de substâncias tóxicas no corpo humano (Almazroo et al., 2017). Estas enzimas reduzem, hidrolisam e oxidam produtos tóxicos de forma a transformá-los em produtos de menor toxicidade e facilitando a sua eliminação pelos rins.

Devido à sua função de desintoxicação do organismo, o fígado está extremamente suscetível aos efeitos nefastos destas substâncias. De facto a permanência de substâncias tóxicas no organismo, um estilo de vida pouco saudável, associado a uma má alimentação, o consumo de medicamentos ou drogas, levam a lesões hepáticas (Eidi et al., 2012), reduzindo a capacidade do fígado de realizar as suas funções.

As lesões no fígado verificam-se devido a um aumento da necrose das células hepáticas, aumentando a peroxidação lipídica e conseqüentemente a um aumento dos níveis das enzimas do fígado, como a glutamato oxaloacetato transaminase, a alanina aminotransferase (ALT), o aspartato aminotransferase (AST), a fosfatase alcalina (ALP) e a lactato desidrogenase (Mahesh et al., 2014). O aumento das enzimas do fígado é observado quando o fígado está lesionado, nomeadamente em: infeções virais, cirroses, esteatohepatite não alcoólica e toxicidade por drogas (Shahat et al., 2015).

1.4.2 Carcinoma hepatocelular

O cancro é atualmente uma doença muito preocupante, não só porque o número de casos aumenta de ano para ano, mas também o número de mortes associadas tem vindo a aumentar nos últimos anos. As células têm características que as capacitam para um crescimento exponencial, tais como, possuírem sinalização que favorece a proliferação, a existência de supressores de tumores, a capacidade de resistir a morte celular, uma ativa invasão e metastização, a indução de angiogénese e a passagem de imortalidade as célula filhas (Figura 4).

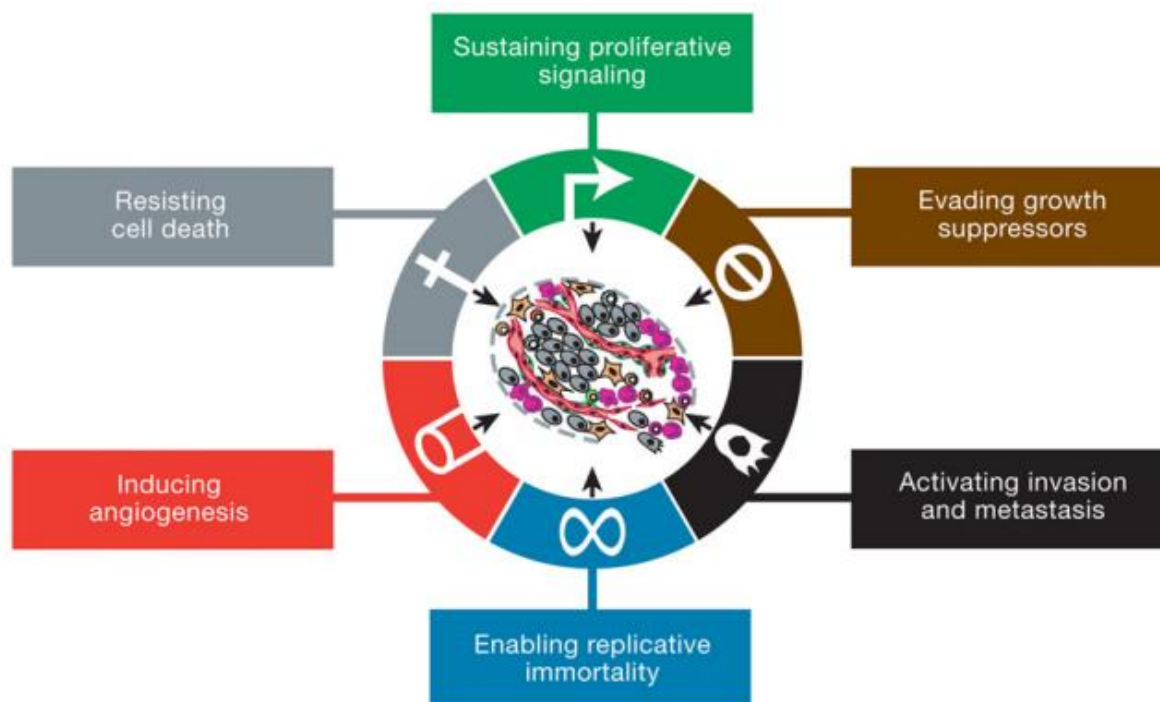


Figura 4: Os seis hallmarks do cancro. Proliferação celular, supressores de tumores, invasão e metastização, resistência a morte celular, indução da angiogénese e replicação de imortalidade.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é um cancro do fígado, que afeta os hepatócitos, as células primárias do fígado. O HCC representa cerca de 84% dos cancros de fígado (Ji et al., 2016; Y. Zhou et al., 2016), sendo o quinto cancro mais comum nos homens e o sétimo nas mulheres (Sagnelli et al., 2020). É o segundo cancro a apresentar mais mortes em todo o mundo (Y. Zhou et al., 2016), estando este número a aumentar. Os doentes apresentam, em média, idades entre os 30 e os 60 anos (Sagnelli et al., 2020).

O HCC é caracterizado por uma inflamação do fígado, o que leva ao aumento de ROS no interior das células, aumentando a probabilidade de ocorrência de mutações e necrose celular. A lesão induzida pelas ROS nas células aumenta a peroxidação dos lípidos celulares e leva ao aumento dos níveis de enzimas hepáticas (Mahesh et al., 2014). Em muitos casos os doentes são assintomáticos, sendo que quando surgem sintomas a neoplasia já está muito avançada (Molla et al., 2020).

A nível celular, o HCC é caracterizado pela existência de diversos genes mutados como dmX-like protein 1 (*DMXL1*), interleukin 6 cytokine family signal transducer (*IL6ST*), KRAS proto-oncogene (*KRAS*), NLR family pyrin domain containing 1 (*NLRP1*), neuroblastoma RAS viral (*V-Ras*), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*), phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), ribosomal protein S6 kinase A3 (*RPS6KA3*), sterile alpha motif domain containing 9 like (*SAMD9L*) e tumor protein P53 (*TP53*), levando a ativação de diversas vias como RAS/RAF/MEK/ERK, platelet derived

growth factor (PDGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), WNT- β -catenina, phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR), insulin-like growth factor 1 insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1/IGF1R) e vascular endothelial growth factor (VEGF) que permitem as células proliferarem mais rapidamente e terem acesso aos nutrientes necessários para sustentar o aumento exponencial (Akula et al., 2019).

A ativação das várias vias, leva à alteração também de algumas proteínas, por exemplo no HCC existe uma sobre-expressão da proteína SIRT1. A SIRT1 é uma desacetilase que causa desacetilações de outras proteínas, com consumo de NAD⁺, estimulando ou inibindo-as. Assim, a SIRT1 é um regulador de fatores e cofatores que mantém a homeostase celular (Molla et al., 2020). Esta é expressa em diversos órgãos apresentando funções diferentes e regulando vários processos biológicos.

A SIRT1 interage com diferentes fatores que podem induzir vias de apoptose ou proliferação como a FOXO3, P53, P73, E2F1, Ku70. A SIRT1 interage com a P53 levando à desacetilação desta, com conseqüente diminuição da sua atividade (Rahman & Islam, 2011). A P53 é uma proteína que existe em todas as células humanas e quando existem lesões no DNA, esta é ativada, tendo como função interromper o ciclo celular; caso a lesão seja reversível, ou de ativar vias de apoptose, caso a lesão seja irreversível (Ghosh, 2019).

Quando a SIRT1 está sobre-expressa, inativa a P53, levando a inibição de vias de apoptose. Sem apoptose, células com lesões no DNA não são reparadas e conseguem sobreviver, sendo ativados oncogenes como *c-Myc*, *PTEN*, *PI3K/AKT* e *YAP/TEAD* que aumentam a proliferação celular.

1.4.3 Fatores de risco e incidência

O HCC está associado a diversos fatores de risco como cirrose, infecções virais de hepatite B e C (Braillon, 2012), exposição a aflatoxina B1, doenças metabólicas como a diabetes tipo 2 (Y. Zhou et al., 2016) e obesidade. Um estilo de vida não saudável associado a consumo exagerado de álcool ou ao tabagismo também são fatores de risco.

A distribuição geográfica é outro fator que influencia a incidência de HCC associada a hepatite B e C. Nos países em desenvolvimento, 60% dos casos de cancro do fígado estão associados a hepatite B e 33% a hepatite C, já nos países desenvolvidos estes números caem para 33% e 20%, respetivamente (Xia et al., 2013). As percentagens mais baixas nos países desenvolvidos, estão associados à facilidade de acesso à vacina contra ambas as infecções virais (Figura 5). O HCC tem uma maior incidência na Ásia e na África subsariana, seguindo-se o oeste de África, sudoeste da Ásia e Austrália, norte da América e por fim o este da Europa (Wallace et al., 2015).

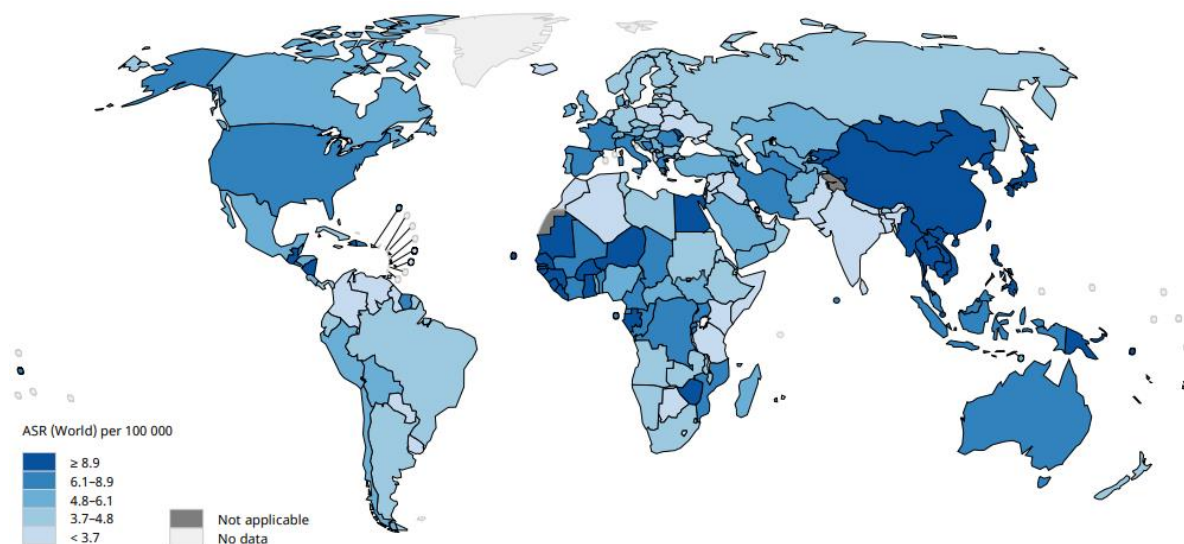


Figura 5: Incidência Mundial de cancro do fígado em 2020. (Adaptado de Globocan 2020-IARC da OMS).

1.4.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico de HCC é bastante difícil uma vez que os sintomas são similares aos apresentados nas hepatites e cirrose, o que leva a um atraso no diagnóstico da doença. Muitas vezes quando é diagnosticada a neoplasia já apresenta dimensões extensas e a ocorrência de metástases é elevada, dificultando o tratamento.

Os métodos usados para o diagnóstico não são específicos para cancros hepáticos e são pouco sensíveis, dificultando um diagnóstico correto. Um dos métodos realizado é através da análise dos valores da alfa-fetoproteína, porém 30-40% dos doentes de HCC têm os valores desta enzima normais, levando a falsos negativos (Ji et al., 2016). Recentemente, está a ser estudado um novo método de diagnóstico, o qual é realizado através de micro-RNAs envolvidos no cancro do fígado. Por exemplo, o teste da expressão do miR-137 que está envolvido no desenvolvimento do HCC (Q. Wei et al., 2019).

Não existe um tratamento eficaz para o HCC, e em muitos casos o tratamento realizado está associado a outras doenças, por exemplo a monitorização da progressão da fibrose hepática associada a cirrose e a toma de antivirais para infeções virais (Sagnelli et al., 2020). Quando o estado de desenvolvimento da neoplasia é avançado, o tratamento pode passar pela realização de um transplante de fígado, uma ablação, uma resseção, tratamentos de quimioterapia e quimioembolização. No HCC, como as neoplasias são descobertas em estados muito avançados, os tratamentos mais usados são os paliativos (Feng et al., 2014), através da administração de sorafenib (Au & Frenette, 2015).

O tratamento para cada doente depende do estado de desenvolvimento da neoplasia, da resposta a tratamentos anteriores, da progressão do cancro e da condição do fígado saudável do doente (Llovet, 2005). A cirurgia para resseção tumoral é a terapêutica mais usada no HCC (Feng et al., 2014), uma vez que o fígado tem uma capacidade de

regeneração elevada conseguindo regenerar a parte retirada. Porém apenas uma pequena parte dos doentes (20%) pode ser sujeito à cirurgia uma vez que muitos doentes já apresentam lesões e metástases extra-hepáticas (Y. Zhou et al., 2016). Os doentes que realizam a cirurgia têm uma probabilidade de 40% de sobrevivência nos 5 anos a seguir a cirurgia (Ji et al., 2016).

Desde 2007, que a sorafenib é usada em tratamentos paliativos, como molécula inibidora do HCC. Esta liga-se a diferentes tirosina quinases como RAF, PDGFR, FLT3, VEGFR, MEK, ERK no local ativo do ATP, inibindo a atividade destas proteínas, levando a uma diminuição da proliferação das células cancerígenas (Akula et al., 2019; Tellapuri et al., 2018). Porém, além dos efeitos positivos no retardamento do cancro, o uso contínuo de sorafenib leva ao rápido desenvolvimento de resistência a terapia (Akula et al., 2019; Y. Zhou et al., 2016), tendo os doentes expostos a esta terapia em média, apenas, cerca de 2,8 meses de vida (Kuo et al., 2016).

Posto isto, torna-se necessário encontrar novas formas de diagnóstico, para que o HCC seja diagnosticado em estádios iniciais. É igualmente importante a descoberta de novas abordagens terapêuticas que melhorem o tratamento do HCC. O uso de plantas medicinais pode ser uma estratégia para encontrar terapias menos invasivas e mais eficazes, mais preventivas, mais naturais e com menos efeitos secundários.

1.5 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é a valorização das plantas do Vale do Côa, em especial as que integram a alimentação da população local e que têm atividade hepatoprotetora. Neste sentido, procedeu-se à recolha das plantas e à sua identificação, realizou-se a extração e a caracterização dos extratos e averiguou-se a atividade antitumoral dos diferentes extratos obtidos.

O potencial antitumoral foi avaliado utilizando modelos *in vitro* de HCC, nas linhas celulares HepG2, HuH7 e Hep3B.

Foram realizados testes de atividade metabólica celular através de ensaios de resazurina, testes de morfologia celular seguindo o protocolo May Grunwald-Giemsa, testes para monitorizar a morte celular através de ensaios de potencial de membrana e ensaios de stress oxidativo através da quantificação das ROS.

Os resultados deste trabalho sobre o *R. induratus* permitirá valorizar a planta através do conhecimento dos seus compostos químicos e das propriedades desta na saúde humana. Permitirá também perceber se o *R. induratus* poderá vir a ser uma esperança no tratamento do HCC.

II. Materiais e Métodos

2.1 Material Vegetal

2.1.1 Reagentes

Acetonitrilo (99, 9%) para cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) foi adquirido da Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). O ácido fórmico foi adquirido da Panreac Química S.L.U (Barcelona, Espanha). Os padrões fenólicos forma adquiridos na Extrasynthèse (Genay, França). A água foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.1.2 Recolha das plantas

Para este trabalho foram usadas plantas inteiras de *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (*R. induratus*), colhidas no Vale do Côa (Guarda, Portugal), na Primavera entre março e maio de 2021. No laboratório as plantas foram secas em estufa que não ultrapassou a temperatura de 40°C, de forma a garantir que os compostos naturais não fossem degradados. Após secagem, as plantas foram pulverizadas e mantidas a -20°C até a extração. Foram realizados exemplares de herbário (exemplares testemunho) depositados no herbário da Universidade de Aveiro), um exemplar testemunho: Mário Pedro Marques AVE254A, sendo a identificação taxonómica da planta confirmada por Rosa Pinho e Lísia Lopes.

2.1.3 Extrações

As extrações foram realizadas com 3 solventes diferentes, água, etanol a 80% e etanol a 100%, para obter diferentes compostos da planta.

Na extração hidroalcoólica (Et 80%), foi pesado 1g do pulverizado do *R. induratus*, que foi extraída em 30 mL de etanol/água (80:20 v/v), a uma temperatura de 25°C, com agitação de 150 rotações por minuto (rpm) durante 1 hora. O resultante da extração foi filtrado, recorrendo a um kit de filtração e a papel de filtro Whatman N° 4. O resíduo foi novamente extraído com a solução hidroalcoólica, repetindo-se todo o processo. No final das 2 extrações ambos os extratos foram associados originando uma solução homogénea. De seguida os extratos foram evaporados sob vácuo a 50°C num evaporador rotativo (Büchi R-210 Flawil, Suíça). A fase aquosa foi congelada, liofilizada e posteriormente armazenada sob condições controladas de luz e humidade para análises futuras.

Para a extração etanólica (100% etanol) foi utilizado o mesmo procedimento que para a extração hidroalcoólica, sendo o solvente da extração 30 mL de etanol.

Na infusão, foram pesadas 2g de pulverizado *R. induratus* que foi adicionado a 50 mL de água destilada fervida (pH 6.6) a 100°C, deixando em repouso durante 5 minutos. As

amostras foram filtradas sob uma pressão reduzida (0,22 μm), concentradas num evaporador rotativo sendo posteriormente congeladas e liofilizadas.

Os liofilizados foram dissolvidos em meio de cultura, no dia em que iam ser administrados as células. A dissolução foi realizada de forma a obter uma solução stock com 10 mg/ml. Através do stock foram realizadas diluições sucessivas, obtendo concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada extração.

2.1.4 Caracterização dos extratos

O perfil fenólico das amostras foi determinado através da redissolução dos extratos secos em uma solução de metanol: água (80:20, v/v). A análise da cromatografia foi realizada através de LC-DAD-ESI/MSn (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), sendo realizadas as condições descritas em Bessada, Barreira, Barros, Ferreira & Oliveira (2016) (Bessada et al., 2016).

Foram utilizados comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm para a detecção online dupla, foi utilizado um espectrômetro de massa conectado ao sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) através da saída de detecção de matriz de díodos (DAD). A detecção do espectrômetro de massa foi realizada em modo negativo, utilizando um espectrômetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte ESI. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através de compostos padrão, quando disponíveis, através da comparação do tempo de retenção, dos UV-vis, dos espectros de massa, e também, da comparação da informação obtida com os dados existentes na literatura, numa tentativa de identificação.

Para a análise quantitativa, com base no sinal de UV foi construída uma curva de calibração para cada padrão fenólico disponível. Para os compostos fenólicos identificados que não tinham um padrão descrito na literatura, a quantificação foi realizada por meio da curva de calibração do padrão mais semelhante disponível na literatura. Os resultados foram expressos em mg/g de extrato.

2.2 Material Celular

2.2.1 Linhas Celulares

Os ensaios foram realizados em três linhas celulares de carcinoma hepatocelular: células HepG2, HuH7 e Hep3B. As linhas celulares foram obtidas na American Type Culture Collection (ATCC).

A linha HepG2 deriva de células de hepatocarcinoma de um doente caucasiano de 15 anos. Esta linha expressa diferentes proteínas como a albumina, transferrina, haptoglobina. Não tendo evidência da existência de genoma do vírus de hepatite B.

A linha Hep3B deriva de células de hepatocarcinoma de um doente com 8 anos de idade. Esta linha expressa várias proteínas como a alfa-fetoproteína, albumina, macroglobulina, transferrina e apresenta no genoma celular o genoma do vírus de hepatite B, possuindo antígenos para a hepatite B.

A linha celular HuH7 deriva de células de hepatocarcinoma de um doente japonês de 57 anos. Esta linha celular é semelhante as linhas epiteliais, sendo muito suscetível ao vírus da hepatite C.

As diferenças entre as três linhas de hepatocarcinoma é a expressão da proteína P53. A linha HepG2 apresenta uma expressão normal da proteína, as células HuH7 possuem uma sobre-expressão da proteína e a linha Hep3B não possui a expressão da P53 (Rodríguez-Hernández et al., 2020). Através destas diferenças é possível perceber qual a ação dos extratos vegetais e que mecanismos desencadeiam, uma vez que a P53 é uma das principais moléculas para o desencadeamento da apoptose.

2.2.2 Cultura de Células

As linhas celulares humanas de hepatocarcinoma (HepG2, HuH7 e Hep3B) são células aderentes e foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS), 10 mM de HEPES, 12mM de bicarbonato e 1% de antibióticos (100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen)). Todas as linhas celulares foram mantidas num ambiente a 5% CO₂ e com temperatura de 37°C, numa atmosfera humidificada.

As culturas celulares cresceram em frascos de cultura de 75 cm² e foram passadas quando a confluência celular nos frascos era igual ou superior a 80% do frasco. Antes de executar as passagens, foi avaliada a atividade metabólica celular em cada mL através do teste de exclusão de azul tripano.

O azul tripano é um corante vital que apenas penetra nas células, se existirem poros (menor permeabilidade membranar) nas membranas celulares. Através deste é possível identificar células viáveis, onde a membrana está intacta, não permitindo a entrada do azul de tripano, permanecendo as células transparentes. As células em apoptose avançada e/ou necrose, onde as membranas já apresentam poros permitindo a entrada do corante, apresentam citoplasma azul.

Assim, antes de cada passagem foi adicionado 30 µL de azul de tripano (Sigma-Aldrich) a 30 µL de suspensão celular. Seguidamente foram retirados 30 µL e adicionados a uma câmara de Neubauer ou hemocítmetro, sendo realizada de seguida uma contagem de células, calculando-se a densidade celular e a viabilidade celular da suspensão celular.

Para as passagens, o meio de cultura foi aspirado, e foi realizada uma lavagem com 10 mL de PBS, para retirar todo o meio. De seguida foram adicionados 3 mL de tripsina,

para o destacamento das células do fundo do frasco deixando atuar por 5 minutos dentro da incubadora. Posteriormente foram adicionados 8 mL de meio, para inativar a tripsina e o conteúdo celular foi homogeneizado e diluído numa proporção de 1/3 nos frascos.

2.3 Ensaios Celulares

Os ensaios celulares realizados foram testes de atividade metabólica, morfologia celular, morte celular e quantificação das espécies reativas de oxigénio (ROS) às 24, 48 e 72 horas de incubação.

Os ensaios foram realizados nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular. O controlo positivo usado foi a cisplatina, para verificar a atividade metabólica das células. A cisplatina é um agente tóxico para as células, que provoca a apoptose através das ROS. A cisplatina ao induzir stress oxidativo nas células induz peroxidação lipídica, delação de grupos sulfidrilos e alterações de sinais de transdução que causam lesões no DNA, levando a célula a ser marcada para apoptose. Esta via pode ser ativada pelas ROS em contacto com a proteína Bax e Ca^{2+} que leva a perda da permeabilidade da membrana mitocondrial, havendo rutura das mitocôndrias. A libertação do conteúdo mitocondrial deixa o citocromo C (Cyt C) e a procaspase 9 em contacto com ATP e com o fator de ativação de protéase apoptótica 1 (APAF-1), levando a ativação da caspase 9, iniciando-se uma cascata de reações, onde caspases como a 3, 6 e 7 são ativadas e levam a célula a entrar em apoptose (Ghosh, 2019).

Outra mecanismo de ação da cisplatina é através da paragem do ciclo celular nas fases G1, S, G2, permitindo o reparo do DNA danificado. A cisplatina também ativa quinases como Chk1 e Chk2, impedindo assim a verificação do ciclo na fase G e S, provocando o início de um novo ciclo celular com o DNA danificado, levando a existência de mutações que não irão permitir o avanço do ciclo e a célula entrará em apoptose (Ghosh, 2019).

2.3.1 Atividade metabólica

A atividade metabólica foi avaliada através do ensaio da resazurina. A resazurina (cor azul) entra nas células e é metabolizada por desidrogenases (enzimas maioritariamente mitocondriais), originando resorufina (cor-de-rosa) (Figura 6). Este ensaio permite verificar a atividade metabólica das células pois para existir metabolização da resazurina em resofurina, as células tem de estar viáveis e com capacidade de metabolização (Sittampalam et al., 2016).

Os ensaios foram efetuados em placas de 96 poços, foram plaqueadas 50 000 células/poço num volume de 100 μ L de meio DMEM. Após 24 horas de incubação para permitir a adesão das células ao fundo dos poços, foi adicionado a cada poço o extrato

pretendido, bem como a cisplatina nas diferentes concentrações, realizando triplicados de cada ensaio.

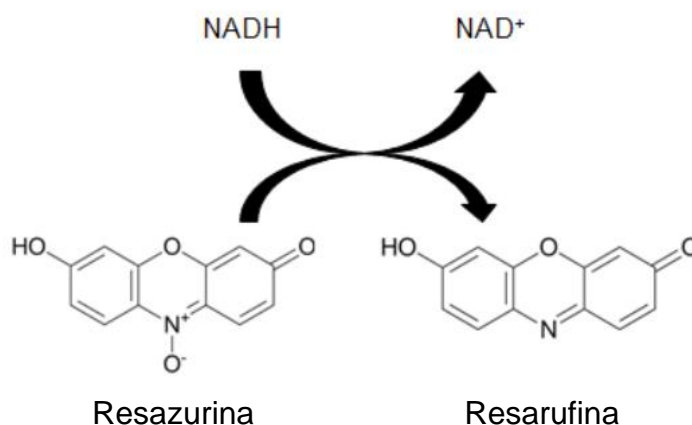


Figura 6: Conversão de resazurina em resorufina. Através de desidrogenases, presentes nas mitocôndrias das células, a resazurina é convertida em resorufina. (Figura adaptada de Sittampalam et al., 2016).

Passado o tempo de incubação pretendido (24h, 48h e 72h) foi retirado o meio e adicionados 100 μ L de meio com 10% de resazurina (10mM) (Sigma-Aldrich) em cada poço, ficando a incubar a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. A leitura no espectrofotômetro foi realizada, passado em média 2 horas na linha HepG2 e 3 horas nas linhas HuH7 e Hep3B. A medição da absorvância foi realizada no espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments), com dois comprimentos de onda, 600 nm (resazurina) e 570 nm (resofurina). Os resultados foram normalizados ao controle, sendo o efeito dos extratos vegetais calculado através da fórmula:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{[A_{(570-600)}Amostra] - [A_{(570-600)}Branco]}{[A_{(570-600)}Controlo] - [A_{(570-600)}Branco]} \times 100$$

Nesta equação o A570 corresponde a absorvância no comprimento de onda 570 nm e A600 corresponde a absorvância no comprimento de onda de 600 nm.

2.3.2 Morfologia Celular

A Morfologia Celular foi realizada usando o corante Giemsa. A morfologia celular é um ensaio importante, para verificar as alterações celulares, permitindo perceber que tipo de morte celular está a ocorrer nas células. Entre a apoptose e a necrose existem diferenças morfológicas como a diferença de tamanho celular, a estabilidade membranar, a formação

de corpos apoptóticos, entre outras. Estas diferenças podem ser observadas através da morfologia celular.

O corante Giemsa contém eosina e o azure B. A eosina cora de vermelho alaranjado os componentes alcalinos das células e o azure B cora de vermelho e roxo componentes básicos.

Para a morfologia celular foi depositada uma lamela no fundo de cada poço em placas 24 poços, sendo posteriormente adicionadas $2,5 \times 10^5$ células, perfazendo um volume de 500 μL em cada poço, ficando a incubar durante 24h (para permitir a aderência das células à lamela). Passadas 24h, o meio foi retirado e adicionado novo meio com os diferentes extratos vegetais deixando incubar durante 24 horas. Após este tempo foi realizada a coloração das células.

Para a coloração foi usado o corante Giemsa. Em cada poço foram adicionados 3 mL de corante Giemsa (Sigma-Aldrich) diluídos em H_2O MQ durante 15 minutos. De seguida o corante foi retirado e foi realizada uma lavagem com PBS, deixando depois as lamelas a secar. Depois de secas as lamelas foram retiradas dos poços e colocadas em lâminas.

As lâminas foram depois observadas no microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com uma Nikon Digital Câmara DXM 1200 F, numa ampliação de 250x.

2.3.3 Morte Celular

A morte celular foi avaliada através do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$), realizando ensaios com a sonda 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboianina iodeto (JC-1).

O JC-1 é uma molécula catiónica lipofílica, que é usada como sonda, pois não é tóxica para as células, porém emite fluorescência. Esta atravessa a membrana plasmática, entrando nas células em monómero (emitindo fluorescência verde), através do potencial de membrana das mitocôndrias (em células viáveis), os monómeros de JC-1 agregam-se, ficando em forma de agregados (emitindo fluorescência vermelha) (Szilágyi et al., 2006).

Para a realização do ensaio de morte celular, através da sonda JC-1, foram plaqueadas $1,5 \times 10^6$ células em placas de 6 poços, sendo adicionados 3 mL de meio em cada poço. Após 24h, para permitir a aderência das células ao fundo do poço, o meio foi retirado e foram adicionados 3 mL de meio com cada extrato, nas diferentes concentrações ficando a incubar durante 24 horas. Depois deste tempo, o meio foi aspirado e realizada uma lavagem com 2 mL de PBS. Este foi depois aspirado e adicionados 380 μL de tripsina em cada poço, ficando a incubar durante 5 minutos. Quando houve destacamento das células do poço, a tripsina foi inativada com 2,6 mL de meio.

Após o destacamento das células, todo o conteúdo foi transferido para um falcon e deixado em repouso durante 30 minutos a 5% CO_2 e com temperatura de 37°C , numa

atmosfera humidificada, para permitir que as lesões realizadas pela tripsina nas membranas fossem reparadas. Posteriormente, foi distribuído 1 mL de cada falcon para tubos de citometria, ficando cada um com 5×10^6 células e foi efetuada uma lavagem com PBS (adicionar PBS e centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos).

Posteriormente foi realizada a marcação com a sonda JC-1. Em cada tubo de citometria com 5×10^6 células foi adicionado 1 μ L JC-1 (Molecular Probes, Invitrogen) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 mM, que incubou durante 15 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação foi realizada uma lavagem com PBS, para retirar a sonda que não aderiu. Foi ressuspensionado em 500 μ L de PBS e posteriormente foi realizada uma medição no espectrofotómetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments), no comprimento de onda de 525 nm para os monómeros e 540nm para os agregados.

2.3.4 ROS

As ROS foram avaliadas através de ensaios de medição dos níveis do anião superóxido e do peróxido de hidrogénio (peróxidos intracelulares) (Pires et al., 2016).

As ROS estão associadas ao desenvolvimento de células tumorais, uma vez que provocam alterações no DNA, levando a existência de mutações genómicas ou oxidando biomoléculas essenciais para a sobrevivência celular. Por outro lado, ROS, também estão associados ao desencadeamento da apoptose e a autofagia (Longo et al., 2008), sendo assim um teste importante para perceber os mecanismos desencadeados nas células.

Os ensaios de stress oxidativo foram realizados através de ensaios de citometria de fluxo, para a realização destes, iniciou-se o plaqueamento de $1,5 \times 10^6$ células em placas de 6 poços, sendo adicionados 3 mL de meio em cada poço. Após 24h, para permitir a adesão das células ao fundo do poço, o meio foi retirado e adicionados 3 mL de meio com cada extrato, nas diferentes concentrações ficando a incubar durante 24 horas. Depois deste tempo, o meio foi aspirado e realizada uma lavagem com 2 mL de PBS. Este foi depois aspirado e adicionados 380 μ L de tripsina em cada poço, incubando durante 5 minutos. Quando houve destacamento das células do poço, a tripsina foi inativada com 2,6 mL de meio.

Após o destacamento das células, todo o conteúdo foi transferido para um falcon e deixado em repouso durante 30 minutos a 5% CO₂ e com temperatura de 37°C, numa atmosfera humidificada, para permitir que as lesões realizadas pela tripsina nas membranas fossem reparadas. Posteriormente foi distribuído 1 mL de cada falcon para tubos de citometria, ficando cada um com 5×10^6 células, foi efetuada uma lavagem com PBS (adicionar PBS e centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos). Foram posteriormente realizadas as marcação específicas com as diferentes sondas de citometria de fluxo.

2.3.4.1 Avaliação dos níveis do anião superóxido

Os níveis do anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foram medidos através da sonda Diidroetídio (DHE). O DHE é uma sonda não fluorescente, de cor azul que entra por difusão na membrana celular. No interior da célula, na presença de $O_2^{\cdot-}$ é oxidado, originando etídio (composto com fluorescência vermelha) (Figura 7) este intercala-se com o DNA, ficando aprisionado no espaço intracelular (Fan & Li, 2014).

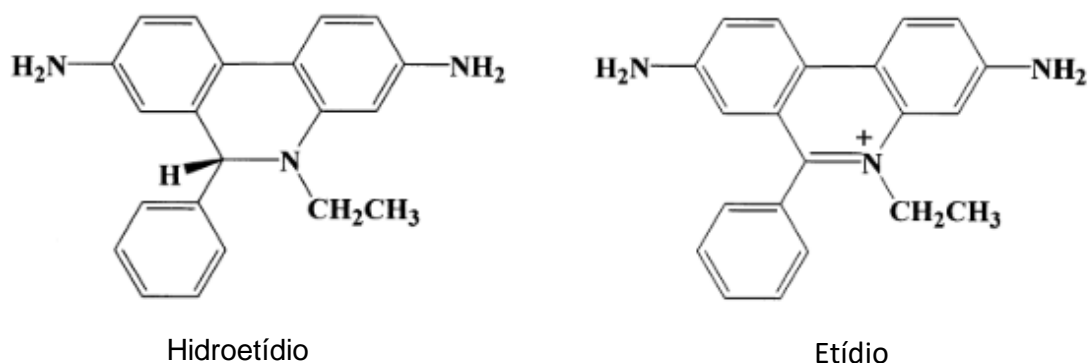


Figura 7: Estrutura química do hidroetídio e do etídio. Conversão realizada na presença de ROS como o anião superóxido (adaptada de Zhao et al., 2003).

Para a marcação com a sonda DHE, em cada tubo de citometria com 5×10^6 células foram adicionados 2 μ L DHE (Sigma-Aldrich) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mM que incubou durante 15 minutos a 37°C, protegidos da luz. Após o tempo de incubação foi realizada uma lavagem com PBS, para retirar a sonda que não aderiu. Foi ressuspenso em 500 μ L de PBS e posteriormente foi realizada uma medição no espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments), no comprimento de onda de 620 nm.

2.3.4.2 Avaliação dos níveis do superóxido de hidrogênio

Além do anião superóxido, também foi analisada a presença de superóxido de hidrogênio (H_2O_2) através do teste com Diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂DA).

O DCFH₂DA (não fluorescente) é uma molécula que atravessa livremente a membrana celular, sendo hidrolisado, por esterases, enzimas intracelulares, originando DCFH₂. A presença de peroxidases celulares e H_2O_2 , levam a oxidação do DCFH₂ originando 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) que emite uma fluorescência verde (Figura 8).

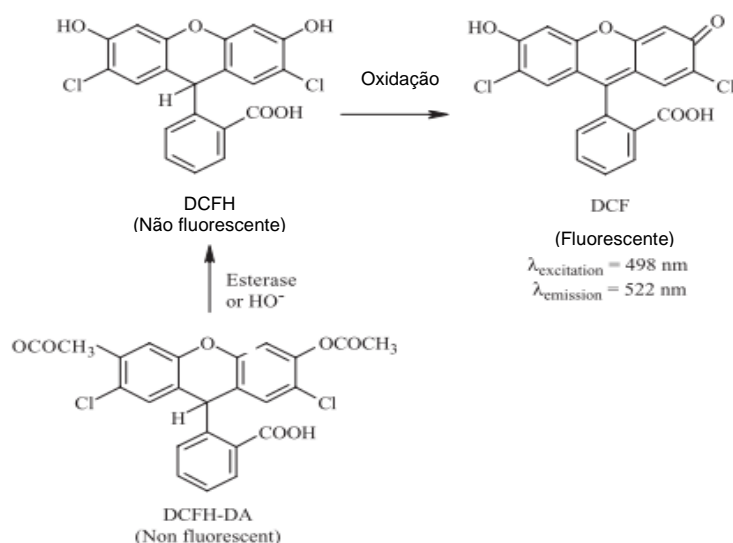


Figura 8: Detecção de peróxido de hidrogénio através da oxidação DCFH₂DA em DCF. O DCFH₂DA (não fluorescente) difunde-se na membrana celular, sendo hidrolisado em DCFH₂ por esterases. Em contacto com peróxidos origina DFC. (adaptada de Gomes et al., 2005).

Para a marcação com a sonda DCFH₂DA, em cada tubo de citometria com 5x10⁶ células foi adicionado 1 µL de DCFH₂DA (Molecular Probes, Invitrogen) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mM que incubou durante 45 minutos a 37°C, protegidos da luz. Após o tempo de incubação foi realizada uma lavagem com PBS, para retirar a sonda que não aderiu. Foi ressuspenso em 500µL de PBS e posteriormente foi realizada uma medição no espectrofotómetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments), no comprimento de onda de 525 nm.

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism edição 7 (version 7.04 for Windows; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Foi realizado o teste Kruskal-Wallis, para assegurar a normalidade do dados. Quando esta foi confirmada foram realizadas ANOVAS, quando a normalidade não foi confirmada foi realizado o teste não paramétrico de Dunnet's para comparar os resultados entre horas e entre concentrações com o controlo dentro do mesmo tratamento.

Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes. Expressam a média +/- SD dos ensaios independentes, sendo identificadas em cada figura as diferenças significativas.

III. Resultados

3.1 Caracterização dos extratos vegetais

Os compostos fenólicos existentes nos extratos de *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (*R. induratus*) estão identificados na Tabela 2.

Tabela 2: Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes na infusão, extratos hidroalcoólico e etanólico de *R. induratus*. (mg/g de extrato).

Pico	Rt (min)	λmax (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Composto	Quantificação (mg/g de extrato)		
						Etanol	Etanol:H ₂ O Infusão	
1	4.91	324	341	179(100),135(25)	Hexosídeo de ácido cafeico	1,30±0,04	1,20±0,03	1,39±0,01
2	5.13	325	353	191(100),179(10),173(5),161(8)	Ácido 3-O-Cafeoilquinico	4,70±0,2	4,70±0,06	3,70±0,3
3	6.63	327	353	191(100),179(15),173(7),161(9)	Ácido 5-O-Cafeoilquinico	3,40±0,1	3,18±0,01	3,20±0,1
Ácidos Fenólicos totais						9,40±0,2	9,08±0,04	8,29±0,25
4	13.35	349	579	459(45),429(61),357(50),327(100)	Luteolina-O-pentossil-C-hexosídeo	96,50±4,2	67,60±1,5	62,90±1,6
5	13.83	349	477	429(61),357(50),327(100)	Luteolina-6-C-glucosídeo	132,40±4,6	98,10±1,5	78,40±3,8
6	16.63	353	609	301(100)	Quercetina-3-O-rutinosídeo	2,40±0,1	1,80±0,1	1,74±0,03
7	17.5	357	477	413(13),341(25),311(100)	Apigenina-6-C-glucosídeo	2,56±0,03	2,11±0,04	1,85±0,02
8	20.6	359	623	315(100)	Luteolina-7-O-rutinosídeo	1,05±0,02	0,90±0,1	0,90±0,2
Flavonóides totais						234,91±9	170,51±3	145,79±2
Compostos fenólicos total						244,31±9	179,59±3	154,08±2

Rt, Tempo de retenção; λmax- comprimentos de onda de absorção máxima na região visível, MS²- dados espectrais de massa; quantificação representada pela média ±SD

A caracterização dos extratos de *R. induratus* identificou oito compostos fenólicos, dos quais três são ácidos cafeoilquínicos, três são luteolinas, uma quercetina e uma apigenina. Os três extratos apresentam os oito compostos fenólicos, porém a quantidade de cada composto é variável.

O extrato etanólico é o que apresenta uma maior quantidade de compostos fenólicos (244,31±9 mg/g de extrato), sendo a infusão a que apresenta menor quantidade destes compostos (154,08±2 mg/g de extrato). Ambos os extratos com etanol, apresentam valores superiores de luteolina, sendo que o extrato etanólico possui 229,95 mg de luteolinas, representando 94% compostos fenólicos totais do extrato e no extrato hidroalcoólico existem 166,60 mg de luteolinas, representando 92% dos compostos fenólicos totais. A infusão apresenta o menor valor de 142,20 mg de luteolinas, representando 92% de extrato.

A luteolina-6-*C*-glucosídeo é o composto que apresenta maior quantidade em todos os extratos, representando mais de 50% dos compostos de todos os extratos. No extrato etanólico é o composto com maior quantidade, representando 132,40±4,6 mg/g de extrato, imediatamente seguido pela luteolina-*O*-pentosil-*C*-hexosídeo que apresenta 96.50 mg/g de extrato (40% do extrato). O composto fenólico menos representado neste extrato foi a luteolina-7-*O*-rutinosídeo.

A infusão é o extrato com menor quantidade de compostos fenólicos, porém é o extrato que apresenta uma maior quantidade de hexosídeo de ácido cafeico (1,39±0,01 mg/g). No extrato hidroalcoólico, os valores da quantificação ficam entre os da infusão e os do extrato etanólico, apresentando 179,59±3 mg/g de extrato de compostos fenólicos totais.

3.2 Ensaios biológicos

3.2.1 Ensaio com cisplatina

O efeito da cisplatina, no metabolismo celular das diferentes linhas está representado na Figura 9. Este ensaio foi realizado, na perspectiva de perceber se as células se encontravam sensíveis aos tratamentos. Como se pode observar na Figura 9, a cisplatina induziu diminuição da atividade metabólica de modo dependente da concentração, do tempo e da linha celular. Entre as três linhas celulares a mais sensível à cisplatina foi a HepG2 apresentando o valor mais baixo (8,06%) de atividade metabólica às 72h na concentração de 15 µg/mL, seguindo-se a HuH-7 (9,36%); sendo a linha celular Hep3B (15,77%) a menos sensível a cisplatina.

Na linha celular HepG2 (Figura 9A) existe uma grande diminuição da atividade metabólica até as 48h, havendo uma estabilização entre as 48h e as 72h. Às 72 horas o IC₅₀ das HepG2 foi de 8,03±SD µg/mL. A linha HuH-7 (Figura 9B) foi a que apresentou menor diferença entre os tratamentos às 24h, havendo uma grande diminuição da atividade metabólica às 48 e 72h de todas as concentrações, sendo o IC₅₀ no último tempo de ensaio

de $6,97 \pm \text{SD } \mu\text{g/mL}$. Por fim a linha Hep3B (Figura 9C), sendo a menos sensível à cisplatina, apresenta os valores mais altos de atividade metabólica em todos os pontos, bem como o IC_{50} às 72h de $9,32 \pm \text{SD } \mu\text{g/mL}$.

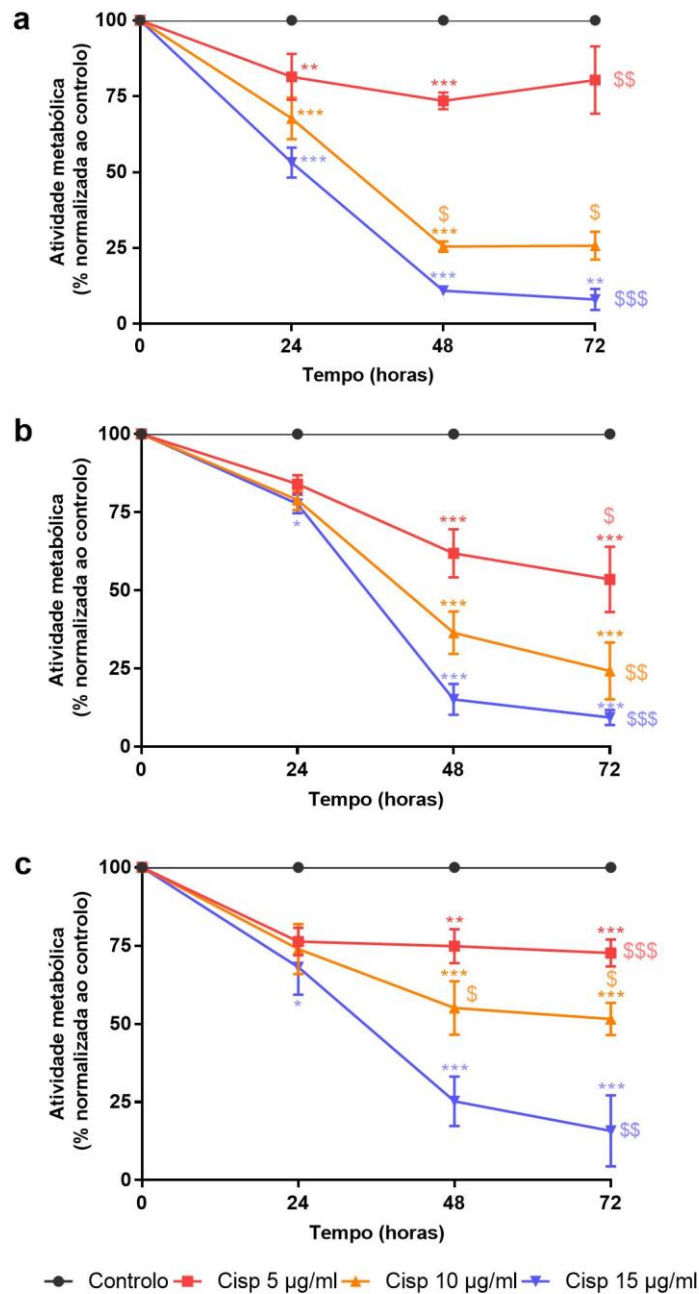


Figura 9: Curva dose-resposta da cisplatina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH-7 (B) e Hep3B (C). Os dados são expressos em percentagem de atividade metabólica (%) normalizada ao controle, representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparação múltiplas de Dunnet's, sendo * diferenças significativas entre as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação e \$ diferenças significativas ao longo do tratamento. Sendo */\$ $p < 0.05$, **/\$\$ $p < 0.01$ e ***/\$\$\$ $p < 0.001$. Os \$ à direita dos gráficos representam que todos os tempos de incubação apresentam diferenças significativas entre si.

3.2.2 Ensaio com os extratos vegetais

Os três extratos de *R. induratus*: a infusão, o extrato hidroalcoólico e o extrato etanólico foram testados nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, pelo teste da resazurina, sendo os resultados apresentados na Figura 10 (infusão), Figura 11 (extrato hidroalcoólico) e Figura 12 (extrato alcoólico).

A infusão (Figura 10) diminuiu a atividade metabólica em todas as linhas celulares às 24h havendo posteriormente um aumento. A concentração superior da infusão (400µg/mL), às 24h, induziu uma diminuição significativa da atividade metabólica nas células HepG2 ($p<0,01$), nas HuH7 ($p<0,05$) e nas Hep3B ($p<0,05$) em comparação com o controlo do mesmo tempo. Esta redução na linha HepG2, representa o valor mais baixo da atividade metabólica de todo o estudo, representando 83,93% da atividade metabólica. Na linha Hep3B e HuH7, a mesma concentração induziu uma atividade metabólica de 84,43% e 88,97%, respetivamente, sendo os valores mais baixos em ambas as linhas. Às 72h, a linha HuH7 apresentou a atividade metabólica mais baixa (94,33%) desta hora de todas as linhas, sendo esta induzida pela concentração de 400µg/mL da infusão.

O extrato hidroalcoólico (Figura 11), diminuiu ligeiramente a atividade metabólica das linhas HepG2 e HuH7, aumentando nas horas seguintes, sendo que na linha HuH7 nenhum dos valores às 48h e 72h foi superior ao controlo. Contudo a linha celular Hep3B diminuiu significativamente a atividade metabólica celular às 24h nas duas concentrações mais altas, apresentando às 72h os valores mais baixos de atividade metabólica para o extrato hidroalcoólico.

Adicionalmente, no extrato etanólico (Figura 12), também as linhas celulares HepG2, e HuH7, não apresentaram diferenças significativas da atividade metabólica depois de expostas aos extratos. Porém na linha celular Hep3B, a concentração de 200 µg/mL, revelou ser a mais tóxica às 24h, induzindo um valor significativamente mais baixo ($p<0,05$) da atividade metabólica em comparação com os valores às 48 e 72h.

A redução da atividade metabólica revela ser dependente do extrato e da concentração, sendo a infusão o extrato mais tóxico e a concentração de 400 µg/mL a que induz menor atividade metabólica. Nas linhas celulares, a Hep3B revelou ser a linha celular mais sensível podendo existir uma correlação com a inexistência da expressão da P53.

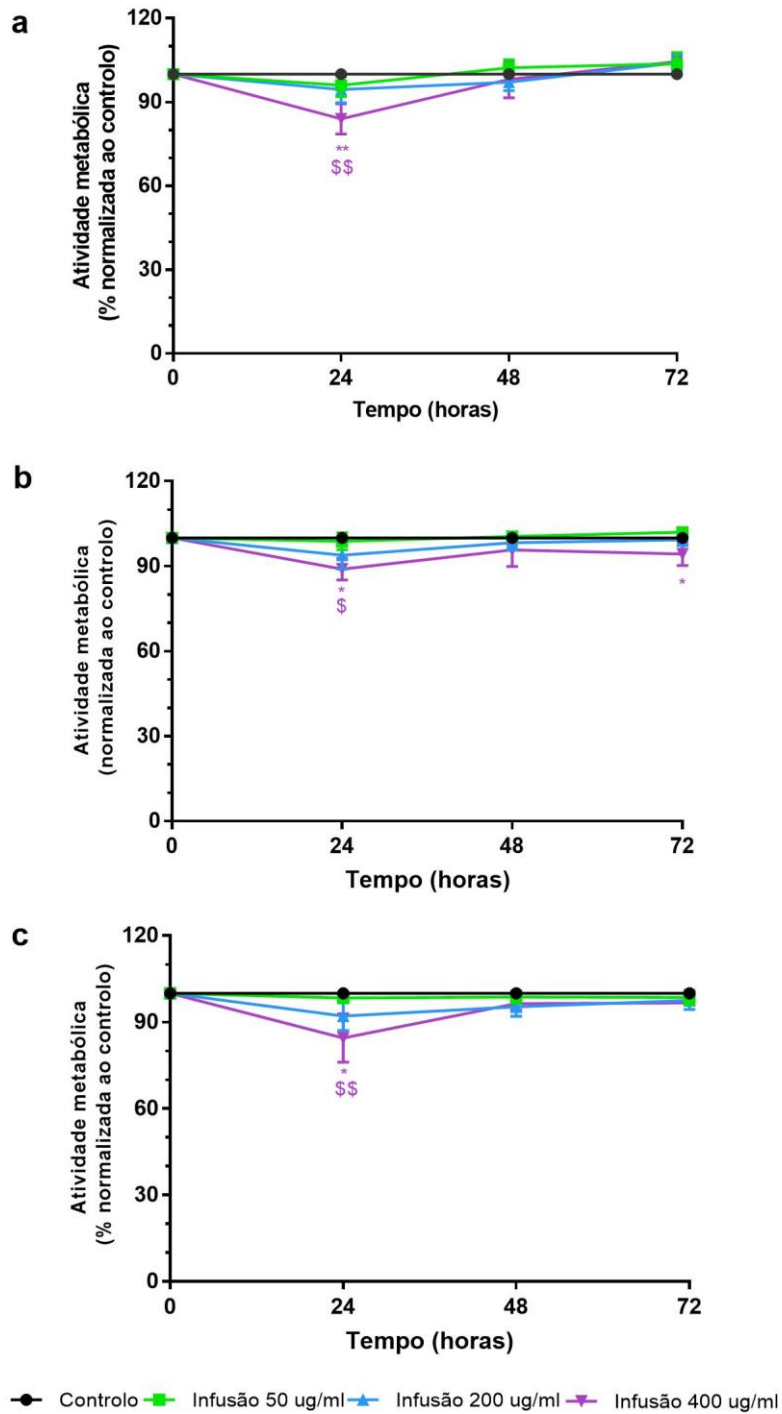


Figura 10: Curva dose-resposta da infusão nas linhas celulares HepG2 (a), HuH7(b), Hep3B (c). Os dados são expressos em porcentagem de atividade metabólica (%) normalizada ao controle, representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparação múltiplas de Dunnet's, sendo * diferenças significativas entre as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação e \$ diferenças significativas ao longo do tratamento. Sendo */\$ $p < 0.05$, **/\$\$ $p < 0.01$.

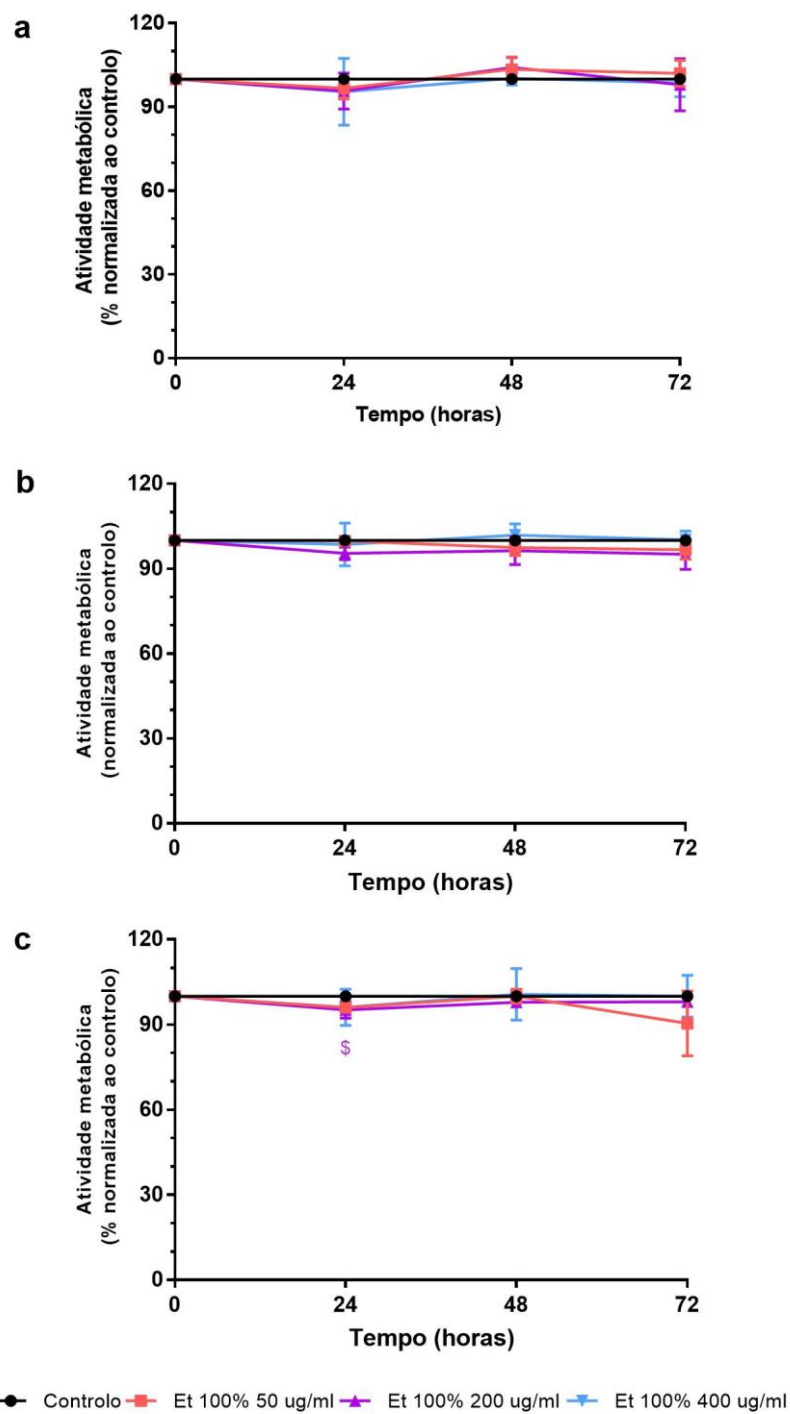


Figura 11: Curva dose-resposta do extrato hidroalcoólico nas linhas HepG2 (a), HuH7 (b), Hep3B (c). Os dados são expressos em percentagem de atividade metabólica (%) normalizada ao controle, representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparação múltiplas de Dunnet's, sendo * diferenças significativas entre as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação e \$ diferenças significativas ao longo do tratamento. Sendo * $p < 0.05$, e \$\$\$ $p < 0.001$.

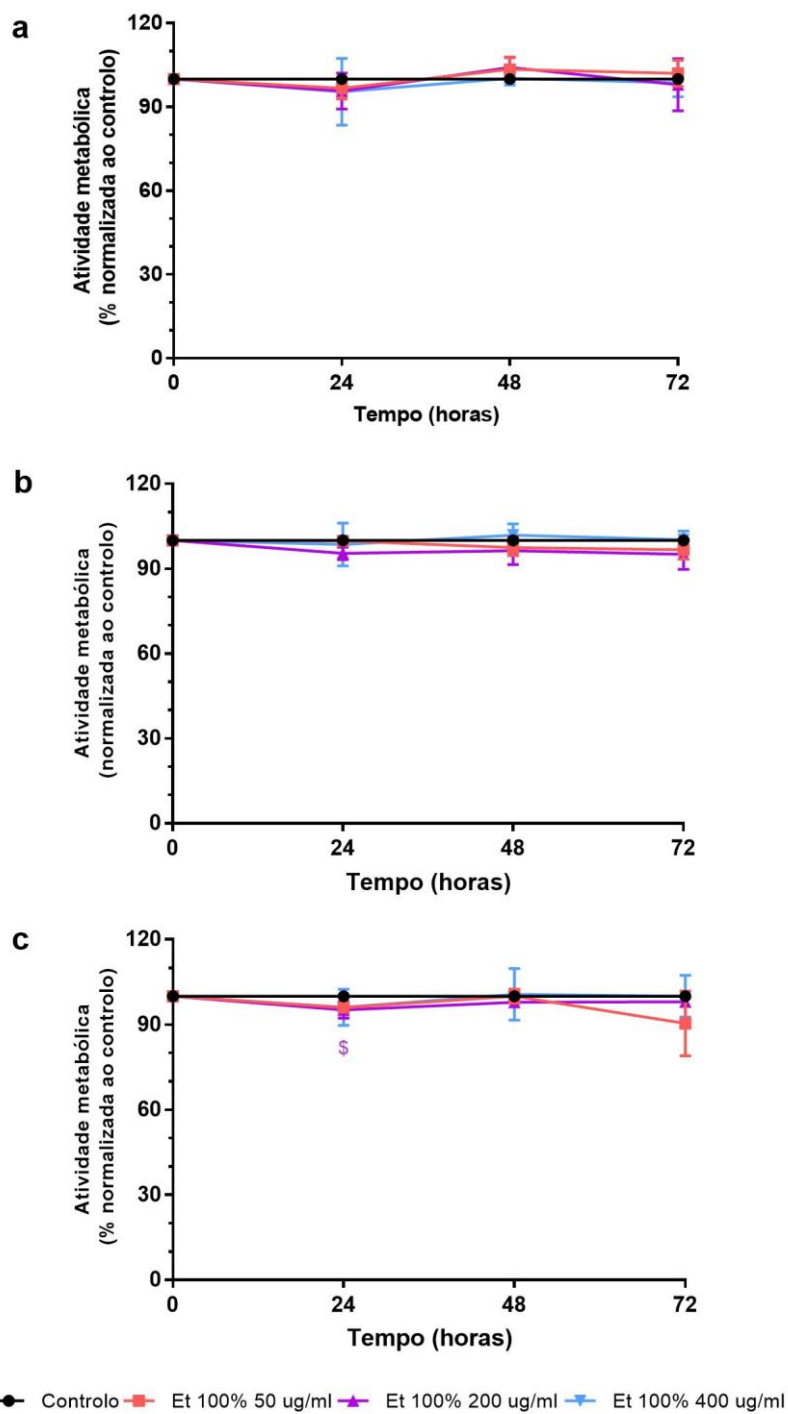


Figura 12: Curva dose-resposta do extrato alcoólico da linha HepG2 (a), HuH7 (b), Hep3B (c). Os dados são expressos em percentagem de atividade metabólica (%) normalizada ao controlo, representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparação múltiplas de Dunnet's, sendo * diferenças significativas entre as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação e \$ diferenças significativas ao longo do tratamento. Sendo \$ $p < 0.05$.

3.3 Morfologia Celular

A atividade metabólica das células foi pouco afetada à exposição dos extratos. Porém existem outros métodos para verificar se os extratos induziram alguma alteração celular. A morfologia celular permite identificar mudanças nas estruturas celulares, como a expansão ou contração do citoplasma, formação de corpos apoptóticos, rupturas na membrana plasmática entre outras. Estas alterações morfológicas permitem avaliar se os extratos induzem morte celular e qual o mecanismo de morte envolvido. A morfologia celular foi observada nas três linhas celulares: HepG2 (Figura 13), HuH7 (Figura 14) e Hep3B (Figura 15) com a infusão e o extrato hidroalcoólico (80% etanol).

Os resultados da morfologia celular apresentam diferenças entre o controle e os diferentes tratamentos, havendo pequenas variações da condensação dos núcleos e do tamanho celular. Na linha HepG2 (Figura 13) não existiu alteração da morfologia celular entre os diferentes tratamentos, contudo na linha HuH7 (Figura 14) as duas concentrações mais baixas da infusão, induziram condensação dos núcleos. Na linha Hep3B (Figura 15), as duas concentrações mais altas do extrato hidroalcoólico induziram contração celular.

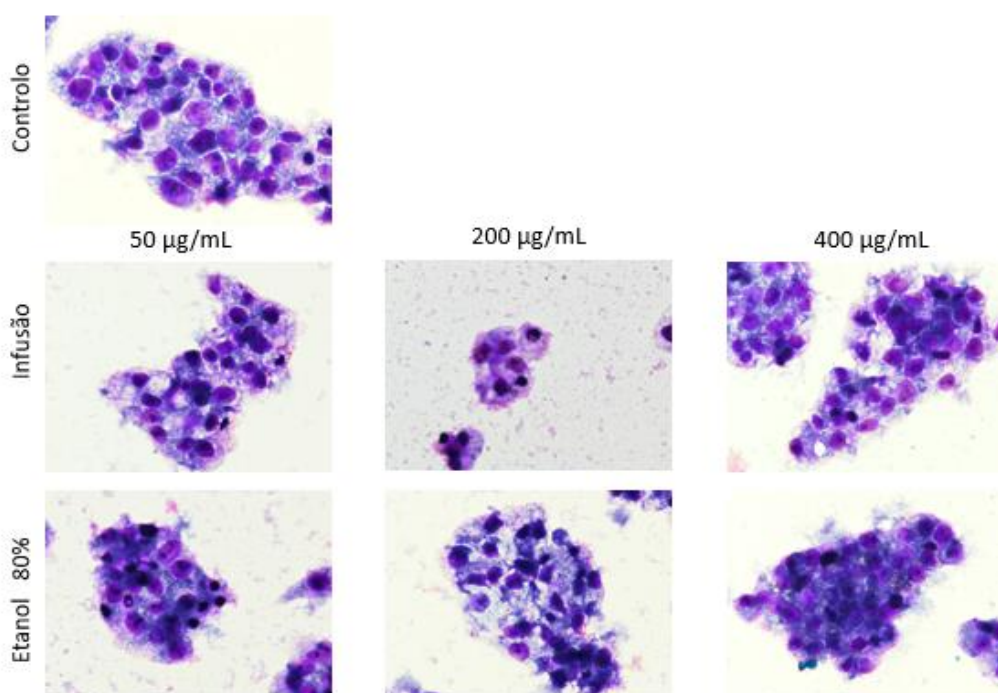


Figura 13: Morfologia das células HepG2. Coloração das lâminas com o corante Giemsa para observação da morfologia celular induzida pela infusão e pela extração hidroalcoólica. As lâminas foram observadas num microscópio de óleo de imersão com ampliação de 250x. As imagens representam uma réplica.

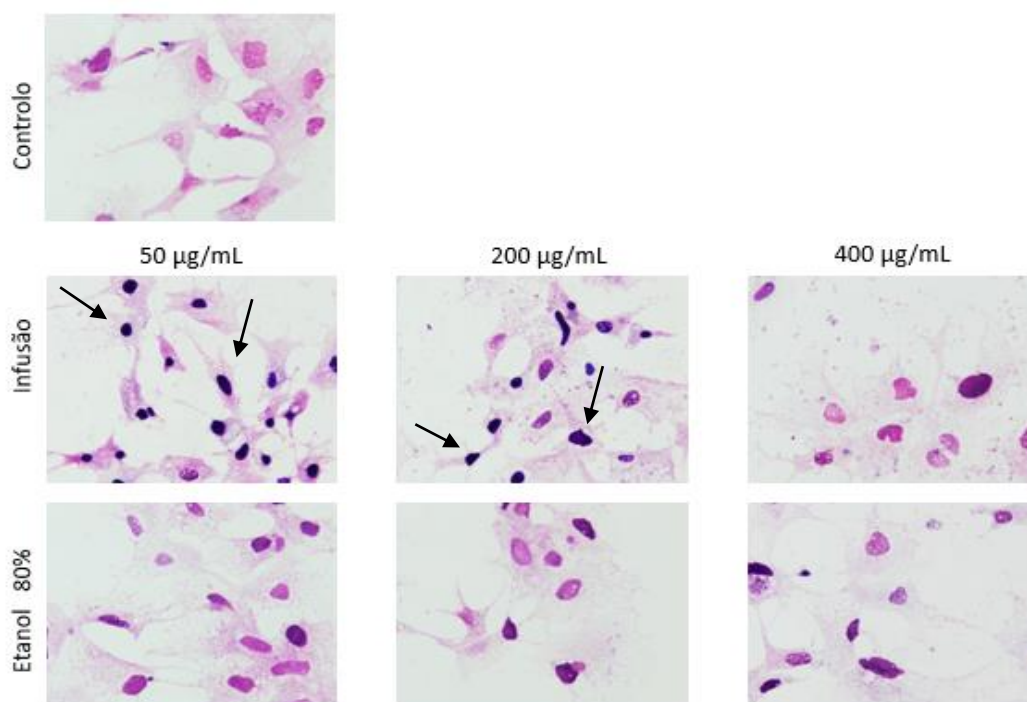


Figura 14: Morfologia das células HuH-7. Coloração das lâminas com o corante Giemsa para observação da morfologia celular induzida pela infusão e pela extração hidroalcólica-Et80%. As lâminas foram observadas num microscópio de óleo de emersão com ampliação de 250x. As imagens representam uma réplica.

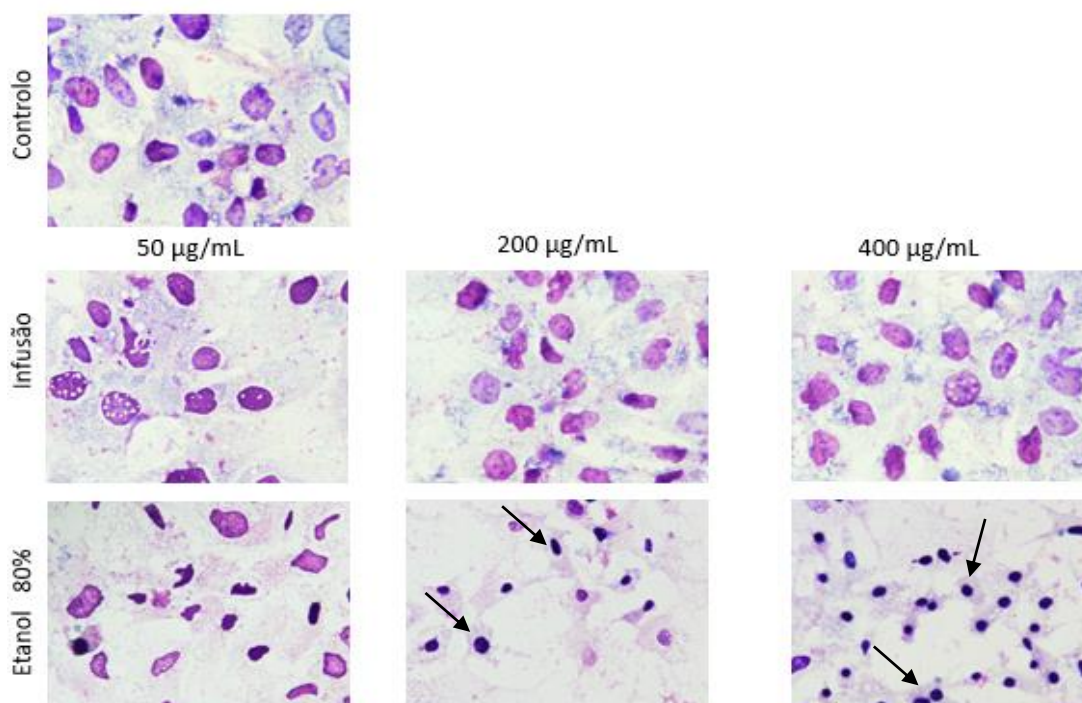


Figura 15: Morfologia das células Hep3B. Coloração das lâminas com o corante Giemsa para observação da morfologia celular induzida pela infusão e pela extração hidroalcólica. As lâminas foram observadas num microscópio de óleo de emersão com ampliação de 250x. As imagens representam uma réplica.

3.4 Morte Celular

A morte celular foi avaliada através do potencial de membrana, com recurso à sonda JC-1, nas três linhas celulares, HepG2 (Figura 16a), HuH7 (Figura 16b) e Hep3B (Figura 16c). A razão monómeros/agregados de JC-1, tem uma relação diretamente proporcional com o potencial de membrana, assim um aumento da razão monómeros/agregados reflete um aumento da despolarização da membrana mitocondrial, estando este associado com uma menor viabilidade celular.

Na linha celular HepG2 (Figura 16a), a exposição aos dois extratos, aumentou a razão monómeros/agregados, sendo que todas as concentrações dos dois extratos induziram aumento da razão para valores superiores ao controlo. A exposição à infusão, demonstrou que o aumento da concentração induz um aumento da despolarização da membrana. A exposição celular da linha HepG2, ao extrato hidroalcoólico, não demonstrou um padrão em relação as concentrações, porém a concentração de 200µg/mL apresenta um aumento de 1,80 vezes comparando ao controlo.

Por outro lado, na linha HuH7 (Figura 16b), ambos os extratos induziram a alteração do potencial, existindo uma tendência de aumento da despolarização conforme o aumento das concentrações dos extratos. A concentração 400µg/mL da infusão e do extrato hidroalcoólico induziram a maior razão, logo o menor potencial de membrana, sendo que esta é 1.75 vezes superior ao controlo. A linha Hep3B (Figura 16c) foi a que apresentou valores da razão mais baixos, tendo os dois extratos uma tendência para diminuição do potencial perante o aumento das concentrações.

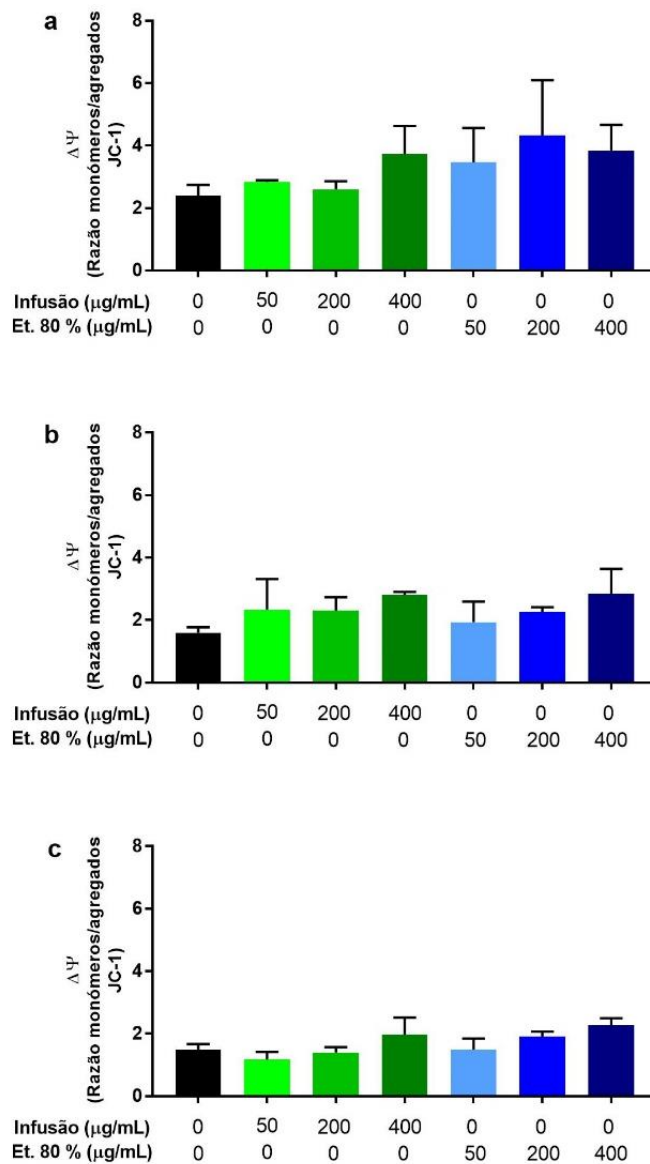


Figura 16: Potencial de membrana em células HepG2, HuH7 e Hep3B. Os dados são expressos pela razão entre os monómeros/agregados, representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. As análises estatísticas foram realizadas tendo como comparação o controlo de cada linha celular, foi usado o teste de comparação múltiplas de Dunnet's. O * representa diferenças significativas entre a concentração e o controlo.

3.5 ROS

A quantificação das ROS nas linhas celulares foi analisado através de dois parâmetros, os níveis de anião superóxido (Figura 17) e de peróxidos intracelular (Figura 18) nas linha celular HepG2, HuH7 e Hep3B.

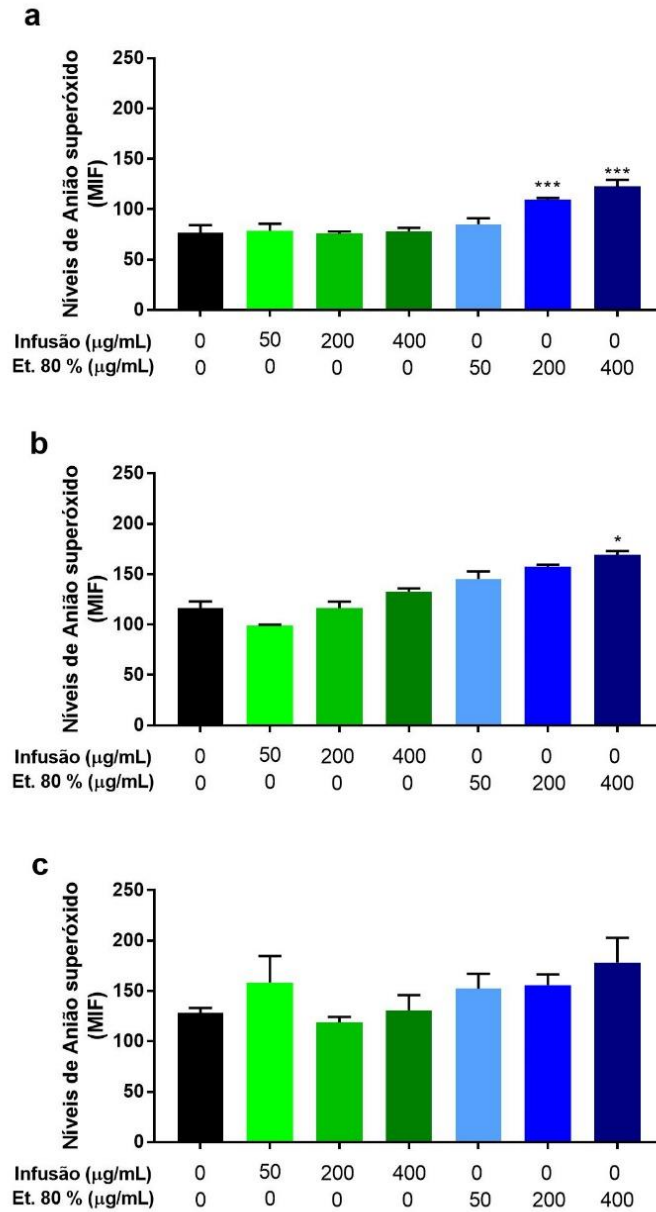


Figura 17: Níveis de Anião superóxido em células HepG2, HuH7 e Hep3B. Os dados são expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF), representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. As análises estatísticas foram realizadas tendo como comparação o controle de cada linha celular, foi usado o teste de comparação múltiplas de Dunnet's. O * representa diferenças significativas entre a concentração e o controle. Sendo * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

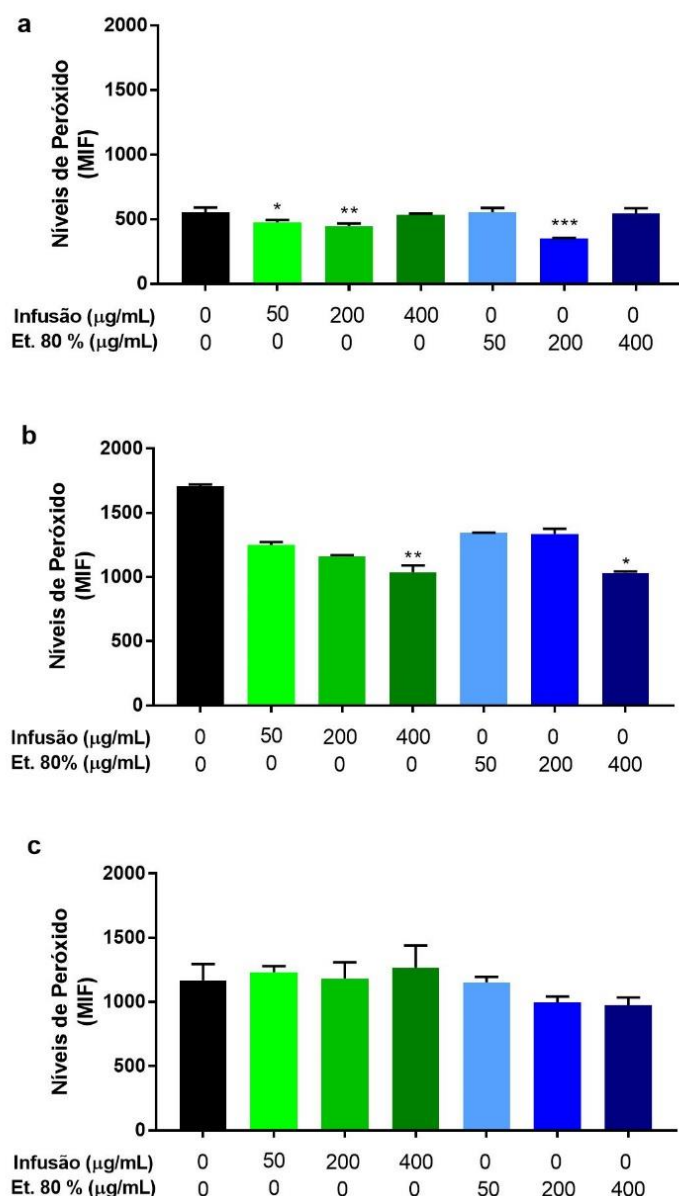


Figura 18: Níveis de Peróxido em células HepG2, HuH7 e Hep3B. Os dados são expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF), representado a média \pm SD de 3 experiências independentes. As análises estatísticas foram realizadas tendo como comparação o controle de cada linha celular, foi usado o teste de comparação múltiplas de Dunnet's. O * representa diferenças significativas entre a concentração e o controle. Sendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Os níveis de anião superóxido são diretamente proporcionais à concentração dos extratos.

Nas células HepG2 (Figura 17a), o extrato hidroalcoólico induziu níveis de anião superóxido superiores a infusão, tendo as concentrações mais altas induzido aumentos significativos ($p < 0,001$) em comparação ao controle. Na linha celular HuH7

(Figura 17b), ambos os extratos induziram um aumento dos níveis do anião superóxido nas células conforme o valor das concentrações era maior, apresentando a concentração de 400 µg/mL do extrato hidroalcoólico um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis do anião superóxido. A linha celular Hep3B (Figura 17c) foi a que apresentou as maiores variações, a concentração de 50 µg/mL induziu níveis de anião superóxido superiores às outras concentrações da infusão, existindo uma tendência de aumento dos níveis de anião proporcional ao aumento da concentração.

Os níveis de peróxido intracelular variaram nas três linhas celulares, porém é possível verificar uma tendência em que as concentrações têm uma relação inversa aos níveis de peróxido, quanto menor a concentração maior os níveis de peróxido.

A linha celular HepG2 (Figura 18a) foi a linha que apresentou valores mais baixos de peróxidos, tendo a concentração de 50 e 200 µg/mL reduzido significativamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) os níveis de peróxido nas células. O extrato hidroalcoólico nas células HepG2 induziu uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de peróxidos na concentração de 200 µg/mL em relação ao controle.

Na linha celular HuH7 (Figura 18b) foi observado, para ambos os extratos, que um aumento da concentração induziu uma diminuição dos níveis de peróxidos nas células. Em ambos os extratos todas as concentrações apresentam valores inferiores ao controle. Nas concentrações mais altas da infusão e do extrato hidroalcoólico existiu uma diminuição significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) em comparação ao controle.

Na linha celular Hep3B (Figura 18c), em ambos os extratos, todas as concentrações apresentaram valores próximos do controle sendo que as concentrações de 200 e 400 µg/mL do extrato hidroalcoólico apresentaram os valores mais baixos dos níveis de peróxidos para esta linha celular.

Os resultados das ROS demonstram um padrão de redução do anião superóxido e um aumento dos níveis do peróxidos intracelulares.

IV. Discussão

Os resultados deste estudo revelam que os extratos de *Rumex induratus* Boiss. & Reut. (*R. induratus*) induziram uma diminuição da atividade metabólica celular pouco significativa, sendo que, esta só foi verificada nas primeiras 24 horas de incubação. Porém, ao realizar estudos mais sensíveis foi possível perceber que mesmo não existindo uma diminuição significativa da atividade metabólica nas células, os extratos modificaram alguns fatores intracelulares.

Através da quantificação das ROS, especificamente, do anião superóxido e dos peróxidos, em particular, o peróxido de hidrogénio, foi perceptível que as células tratadas com os extratos vegetais apresentaram concentrações mais elevadas destes ROS do que as células não tratadas. Consequentemente o aumento de ROS pode provocar alterações nas células nomeadamente lesões nas membranas celulares, peroxidação lipídica entre outras.

A exposição das células a infusão e ao extrato hidroalcoólico aumentou a razão monómeros/agregados de JC-1, ou seja, o potencial de membrana diminuiu, sendo esta diminuição um indício de que os extratos poderão induzir algum efeito citotóxico.

As alterações intracelulares referidas anteriormente, também podem ser observadas na morfologia celular, onde as células HuH7 e Hep3B apresentaram morfologia associada a apoptose, como a diminuição do tamanho celular provocado pela contração do citoplasma e os núcleos mais condensados.

4.1 Caraterização dos extratos

A caraterização dos extratos foi exclusiva para os compostos fenólicos pois estes são antioxidantes naturais, sendo assim moléculas importantes para a alteração do estados das espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células. Dentro dos compostos fenólicos, os flavonóides são os que se encontram em maior quantidade nos extratos de *R. induratus*. Os flavonóides no interior das células podem interagem com as ATPases mitocondrial e da membrana plasmática, proteínas cinases A e C e topoisomerase ao ligarem-se ao local ativo do ATP (Bonfili et al., 2008).

O composto fenólico mais representado em todos os extratos de *R. induratus* é a luteolina (Figura 19). A luteolina é um flavonóide com um elevado potencial antioxidante que apresenta atividade tóxica em diversas neoplasias, como no cancro da mama, colón, pâncreas, próstata, cérebro (glioblastoma), pulmões, rins, ovários, pele e fígado (Imran et al., 2019). No fígado, a combinação de luteolina (20 µM)

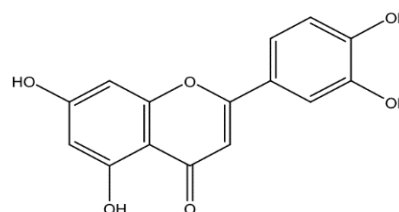


Figura 19: Estrutura química da luteolina (adaptada de Imran et al., 2019).

com 5-fluorouracilo (5-FU) testada nas células HepG2, aumentou a razão BAX/BCL₂ e a expressão da P53 induzindo apoptose por via intrínseca (Xu et al., 2016). Isolada, a luteolina, também induz apoptose nestas células por ativação das vias PI3K-AKT, NF-κB e MAPK/ERKs. A ativação da BAX e da P53 e a inibição da BCL-XL levam ao aumento de ROS, bloqueando o ciclo celular na fase G₁. Este sequestro ativa a caspase 8, aumentando os níveis de apoptose e reduzindo a angiogénese e a metastização (Imran et al., 2019), sendo o IC₅₀ da luteolina isolada às 24h igual a 89,7 μM e às 48h igual a 58,4 μM (Xu et al., 2016).

O ácido cafeico (Figura 20) é o segundo composto mais representado nos extratos de *R. induratus*. É um composto fenólico presente em muitas plantas que apresentam propriedades anti-inflamatória, antiviral e anticancerígenas (Yang et al., 2019).

O ácido cafeico induz a perda de integridade da membrana mitocondrial e posteriormente a apoptose, conduzindo a redução do tamanho dos tumores de carcinoma hepatocelular (HCC) em ratos. A interação do ácido cafeico com as células induz lesões na membrana mitocondrial e posteriormente apoptose. O ácido cafeico, isolado, está associado a diminuição da inflamação do tumor, através do controlo da produção de citocinas (Brautigan et al., 2018). Além das propriedades antitumorais, o AC também possui propriedades hepatoprotetora, protegendo o fígado da exposição alargada de tóxicos (Janbaz et al., 2004).

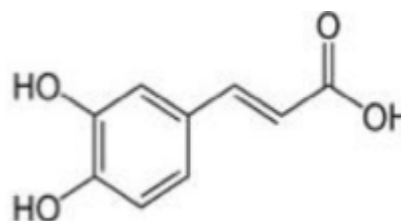


Figura 20: Estrutura química do ácido cafeico (adaptada de Brautigan et al., 2018).

A quercetina (Figura 21) é um flavonóide presente em muitas plantas, frutas e vegetais incluindo o *R. induratus*. Este flavonóide inibe o crescimento de diferentes cancros como: o hepático, o colorretal, o mamário e o gástrico, através da redução da expressão de oncogenes (Tang et al., 2020).

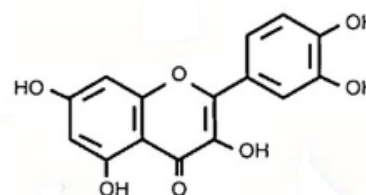


Figura 21: Estrutura química da quercetina (adaptada de Tang et al., 2020).

A quercetina promove a apoptose, inibe a angiogénese e a metastização no HCC *in vitro*. Nas células HepG2, a quercetina reduz a expressão da ciclina D1, esta é um proto-oncogene que promove a proliferação celular (J. Zhou et al., 2017). Além da atividade citotóxica demonstrada para diversos cancros, a quercetina também apresenta atividade hepatoprotetora, através dos canais de cálcio. Esta bloqueia os canais impedindo a entrada de tóxicos (Janbaz et al., 2004).

A apigenina (Figura 22) é outro dos compostos identificados nos extratos de *R. induratus*, esta promove a apoptose nas células tumorais, através da regulação da expressão de RNA mensageiros (mRNA) da caspase 3, 8 e da TNF- α . A ativação de vias de sinalização como NF-kB, P105/P50, PI3K e AKT induz alterações da atividade das cinases e a ativação de proteassomas (Imran et al., 2020).

No HCC, a apigenina combinada com 5-FU aumenta os níveis de ROS intracelulares, reduz o potencial de membrana mitocondrial, ativando a apoptose por via mitocondrial. A ativação da apoptose é comprovada pela perda de potencial de membrana mitocondrial e a menor expressão de BCL-2, a ativação de caspase 3 e da poly-ADP ribose polymerase (PARP) (Hu et al., 2015).

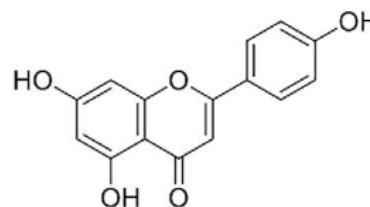


Figura 22: Estrutura química da apigenina (adaptada de Imran et al., 2020).

A apigenina nas células HepG2 está diretamente ligada a NADPH oxidase. Quando esta enzima está ativa e as células são expostas a apigenina existe formação de ROS que posteriormente ativam a apoptose. A apigenina através da via PLC/PRF/WAF1 leva ao aumento de P21/WAF1 e P53 causando o bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M e por sua vez a inibição do tumor (Imran et al., 2020).

Os compostos fenólicos presentes nos extratos de *R. induratus* e identificados previamente, levam ao aumento de ROS nas células (luteolina e apigenina) e a alteração do potencial de membrana (AC), todos provocam a diminuição da atividade metabólica celular em células HCC, porém as concentrações não são as replicadas no presente estudo e em alguns casos foi utilizado o composto natural conjugado com outro composto ou fármaco.

Nem todos os efeitos descritos para cada composto, são verificados neste estudos, porém os efeitos referenciados foram em muitos casos, realizados com os compostos isolados, onde a concentração dos composto é superior a encontrada numa extração, existindo assim um acréscimo na ação do composto.

4.2 Ensaio biológicos

Os resultados da cisplatina demonstram concordância com estudos anteriores (Zhang et al., 2010), sendo verificado que o aumento da concentração de cisplatina reduziu a atividade metabólica. Através da cisplatina, o controlo positivo do estudo, foi verificado que as células estão sensíveis, validando assim os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados mostram que as 24h foi o tempo onde os extratos foram mais tóxicos, diminuindo a toxicidade nos tempos seguintes. Este resultado pode indicar que o extrato vegetal de *R. induratus* se degrada ao longo do tempo por estar em contacto com outros componentes ou ser degradados por enzimas intracelulares.

Os diferentes extratos provocaram toxicidades diferentes nas células. O extrato que levou a um maior decréscimo de atividade metabólica foi a infusão. A maior toxicidade provocada pela infusão não está relacionada com os compostos fenólicos extraídos uma vez que esta extração apresentou os mesmos compostos que as extrações com etanol. A concentração dos compostos fenólicos também não estará relacionada com a maior toxicidade induzida pela infusão uma vez que a infusão apresentou o valor mais baixo de compostos fenólicos totais.

Tukappa et al, realizou estudos em que usou extrato metanólico de *R. vesicarius*, em células de hepatocarcinoma. Esta extração apresenta compostos como 8-C-glucosil-luteolina, 6-C-hexosil-quercetina, 3-O-rutinosil-quercetina (El-Hawary et al., 2011) que são compostos fenólicos muito semelhantes ao encontrados no extrato de *R.induratus*. O extrato de *R. vesicarius* induziu em células HepG2 um IC₅₀ de 563,88±0,80 µg/ml (Asha Tukappa et al., 2015), ou seja uma concentração bastante elevada em comparação ao estudo realizado neste trabalho, onde a concentração mais elevada foi de 400 µg/ml. Assim um estudo com concentrações mais elevadas dos extratos pode levar a obtenção de resultados com toxicidade celular superior.

A atividade metabólica foi diferente nas três linhas celulares, perante os resultados e atendendo que a linha HepG2 apresenta uma expressão normal da P53, as células HuH7 apresentam uma sobre expressão da proteína e a linha Hep3B não apresenta expressão da P53 (Rodríguez-Hernández et al., 2020), a infusão parece apresentar um efeito mais tóxico quando a expressão da P53 é mais baixa e os tempos de exposição são baixos. Conforme o tempo de exposição aumenta, o efeito tóxico da infusão é mais notado em células onde existe uma sobreexpressão da P53 (às 72h, a linha celular HuH7 induziu a menor atividade metabólica).

A P53 regula o equilíbrio entre BAX/BCL2, estando assim associada a regulação da apoptose por via intrínseca. Quando o equilíbrio BAX/BCL2 deixa de existir o potencial de membrana é desregulado, existindo a libertação do citocromo C das mitocôndrias para o citoplasma. O citocromo c ativa a caspase 3, provocando a divisão do PARP em P89 e P24, estas duas proteínas fragmentam o DNA e induzem a apoptose. Esta via pode ser ativada pela alteração do potencial de membrana que pode ser induzido pelas ROS (Xu et al., 2016).

As ROS existem naturalmente nas células, sendo produtos de diversos mecanismos celulares como a respiração mitocondrial, em associação com a NADPH oxidase nas membranas celulares, em comunicação com enzimas nos peroxissomas e no enrolamento de proteínas no retículo endoplasmático (Srinivas et al., 2019).

As ROS são essenciais para as células realizarem diferentes funções. Em concentrações baixas, os ROS possuem funções de sinalização de vias, o aumento da sua concentração intracelular provoca efeitos citotóxicos celulares como a lesão de macromoléculas e lesões no DNA (Mittler, 2017; Srinivas et al., 2019). Porém quando as concentrações são muito elevadas, despontam a ativação de apoptose ou necrose.

Concentrações elevadas das ROS, que variam de célula para célula, podem desencadear vias intrínsecas de apoptose. O aumento de ROS intrínsecas leva a abertura de poros na membrana mitocondrial externa, levando à libertação do citocromo c de dentro da mitocôndria para o citoplasma. No citoplasma, este, contacta com a APAF-1 levando ao desencadeamento de uma cascata de reações que ativam diversas caspases, incluindo a 3 e 9 (Figura 23). Quando as caspases são ativadas, são desencadeadas reações proteolíticas que conduzem à morte celular. A perda de citocromo c nas mitocôndrias leva a um aumento do anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pois diminui a velocidade da cadeia respiratória, diminuindo o consumo de $O_2^{\cdot-}$ (Turrens, 2003).

As ROS através de enzimas antioxidantes são mantidas em concentrações estáveis para permitirem a execução das suas funções como segundos mensageiros, mas sem que provoquem lesões nas células. Assim, enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase tem como funções manterem as concentrações de ROS baixas nas células. Assim estas metabolizam as ROS em espécies menos reativas, como o superóxido que é transformado em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) através da superóxido dismutase. O H_2O_2 , por sua vez, é metabolizado pela catalase ou decomposto pela glutathione peroxidase de forma a não ser tóxico para as células. $O^{\cdot}OH$ acaba por ser utilizado em outros processos de redução do citocromo c (Miwa & Brand, 2003; Turrens, 2003).

Mediante os resultados obtidos, existe um aumento parcial do anião superóxido conforme o aumento da concentração dos extratos, sendo estes dados corroborados pelo aumento da permeabilidade da membrana. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, onde o aumento de ROS, provoca uma maior despolarização da membrana mitocondrial o que leva ao desencadeamento da apoptose das células, e consequentemente diminuindo a viabilidade celular (Kiraz et al., 2016).

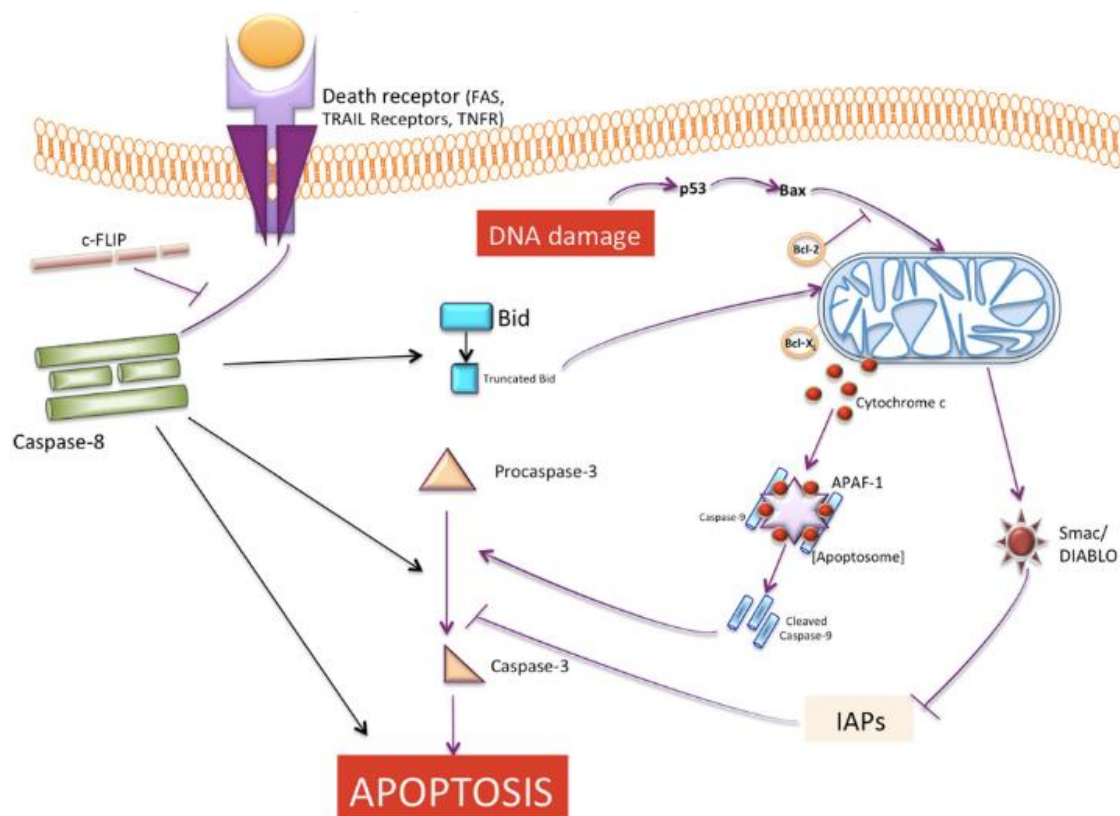


Figura 23: Vias de apoptose. A imagem representa a via extrínseca e intrínseca da apoptose (adaptada de Kiraz et al., 2016).

O aumento de $O_2^{\cdot-}$, não está diretamente ligado a diminuição do potencial de membrana, como foi demonstrado, em 2003, por Turrens, uma vez que não existe relação direta de todas as concentrações entre o potencial e a quantidade do $O_2^{\cdot-}$ (Turrens, 2003), tal como a diminuição da quantidade de peróxidos também não era esperada. Perante estas observações pode ser questionado se as atividades das enzimas antioxidantes foram potenciada ou inibidas pelos extratos de *R. induratus*, especialmente a superóxido dismutase e a catalase que metabolizam estas duas espécies de oxigénio.

O aumento das ROS intracelulares levam a modificações tanto no potencial de membrana mitocondrial como na morfologia celular uma vez que através das mitocôndria podem ser ativadas vias de apoptose.

As alterações do potencial de membrana induzidas pelos extratos de *R. induratus* foi verificado neste estudo. O JC-1 ao ser integrado nas células e dado o potencial de membrana mitocondrial, existe a agregação do JC-1 e o seu enclausuramento no interior da mitocôndria. No citoplasma como o potencial é mais baixo o JC-1 não forma agregados. Um estado viável das mitocôndrias reflete um

estado de proliferação celular. Quando existe uma perda do potencial de membrana mitocondrial é desencadeada a apoptose. Assim uma diminuição do potencial, ou seja uma aumento da relação monómeros/agregados está associada a indução da apoptose (Perelman et al., 2012).

Os resultados obtidos revelam um aumento da razão monómeros /agregados em todas as linhas, ou seja, um aumento da despolarização da membrana mitocondrial. Os resultados não são significativos, mas a existência de uma tendência de aumento da despolarização pode revelar que as células iniciaram processos de apoptose quando expostas ao extrato de *R. induratus*, este aumento está possivelmente relacionado com o aumento de $O_2^{\cdot-}$.

Quanto à morfologia celular, esta também pode ser influenciada pelos níveis de ROS intracelulares. Entre os diferentes tratamentos foi possível observar que as linhas HuH7 e Hep3B apresentaram condensação dos núcleos e contração celular. A condensação dos núcleos e a contração celular são alterações morfológicas associadas a apoptose, assim o extrato hidroalcoólico provocou a morte celular nas células Hep3B, porém como o ensaio só possui uma réplica, os resultados necessitam de ser confirmados realizando mais réplicas.

Em ensaios onde extratos vegetais foram testados em animais e a morfologia foi analisada, existindo diferenças, são estudos que analisam uma secção de tecido do fígado (Asha Tukappa et al., 2015; Shahat et al., 2015). Através da observação morfológica do tecido é verificado a existência de áreas em necrose, incorporação de células inflamatórias, o aumento da vascularização, entre outros aspetos. Estes não são possíveis de ser verificados na observação celular, visto serem processos que envolvem todo o tecido.

A exposição da linha HepG2 à infusão não alterou os níveis de ROS significativamente, porém existiu uma diminuição do potencial de membrana. A mesma linha celular exposta ao extrato hidroalcoólico apresentou um aumento do nível de anião superóxido, mas uma diminuição dos peróxidos, esta alteração das ROS pode ter provocado o aumento da despolarização da membrana celular verificado. Assim na linha HepG2 pode estar a ocorrer a indução da apoptose através da via intrínseca controlada pela P53.

Nas células HuH7, foi verificado o aumento dos níveis do anião superóxido e a diminuição dos peróxidos quando expostas a infusão e ao extrato hidroalcoólico, revelando posteriormente o aumento da despolarização da membrana mitocondrial. Esta linha celular apresenta tendências muito concretas, estando estas possivelmente associadas a sobre-expressão da P53 e a indução de apoptose através desta. Sendo

que a infusão apresentou níveis superiores de despolarização da membrana, ou seja, aumento da apoptose, algo verificado na morfologia celular.

A linha celular Hep3B foi a linha que apresentou níveis superiores de anião superóxido, sendo este aumento possivelmente a causa da redução da atividade metabólica destas células. Contudo esta redução não está associada ao potencial de membrana, sendo esta linha a que apresentou um potencial de membrana mais elevado. Assim a diminuição da atividade metabólica celular estará associada ao aumento dos ROS, mas não através da despolarização da membrana. Uma vez que a apoptose através da despolarização da membrana é ativada pela P53 e visto que esta proteína não é expressa nas células Hep3B, os resultados parecem ser congruentes com os existentes na literatura.

A infusão revelou uma diminuição do potencial de membrana superior ao extrato hidroalcoólico, em todas as linhas celulares, estes resultados corroboram os resultados da atividade metabólica, onde a infusão apresentou uma atividade menor do que o extrato hidroalcoólico. Assim a infusão de *R. induratus* reduz a atividade metabólica das linhas celulares, possivelmente pela degradação da membrana mitocondrial e induzida pelo aumento de ROS associada a luteolina e a apigenina.

V. Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo não são conclusivos, porém foi demonstrado que o extrato de *R. induratus* influencia a atividade celular e a quantidade de ROS intracelulares das linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Estas atividades biológicas estão diretamente associadas aos compostos fenólicos existentes nos extratos. A luteolina, o ácido cafeico e a quercetina, são flavonoides que por sua vez apresentam potencial antioxidante, levando a alteração das ROS no interior das células.

O aumento das ROS levou a um aumento do potencial de membrana mitocondrial que por sua vez levou a indução de vias de apoptose, além de não ser representativo na atividade metabólica celular.

Futuramente, o aprofundamento dos resultados obtidos neste estudo, através de novos ensaios, pode ajudar a perceber os mecanismos de ação dos extratos de *R. induratus* no carcinoma hepatocelular e como estes podem ser potenciados. Ensaios que permitam verificar o efeito dos extrato *R.induratus* na inflamação, na angiogênese e na metastização e verificar se os extratos têm influência no ciclo celular das células pode possibilitar a descoberta de novas metodologias de ação. O potenciamento dos resultados pode ser obtido através do isolamento dos flavonóides presentes no *R.induratus*, de forma a potenciar os efeitos ou o uso dos extratos em terapêuticas conjuntas são exemplos de trabalhos futuros que podem originar a descoberta de novas terapias com base em produtos naturais.

VI. Referências bibliográficas

- Adamu, B. A., Emiru, Y. K., Sintayehu, B., Araya, E. M., Periasamy, G., & Hiben, M. G. (2020). In vivo hepatoprotective and *in vitro* radical scavenging activities of extracts of *Rumex abyssinicus* jacq. Rhizome. *Journal of Experimental Pharmacology*, 12, 221–231. <https://doi.org/10.2147/JEP.S258566>
- Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Emma, M. R., Augello, G., Cusimano, A., Azzolina, A., Montalto, G., Cervello, M., & McCubrey, J. A. (2019). RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(11), 915–929. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1685501>
- Al-malki, A. L., Abo-golayel, M. K., & Abo-elnaga, G. (2013). Hepatoprotective effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) against induced chronic liver cirrhosis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(20), 1494–1505. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.1116>
- Al-Sheddi, E. S., Farshori, N. N., Al-Oqail, M. M., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A., & Siddiqui, M. A. (2015). *Portulaca oleracea* seed oil exerts cytotoxic effects on human liver cancer (HepG2) and human lung cancer (A-549) cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(8), 3383–3387. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.8.3383>
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>
- Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2018). Triglyceride metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Alves, R. C., Fernandes, R. P., Eloy, J. O., Salgado, H. R. N., & Chorilli, M. (2018). Characteristics, Properties and Analytical Methods of Paclitaxel: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(2), 110–118. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1416283>
- Amat, N., Upur, H., & Blažeković, B. (2010). In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.023>
- Asha Tukappa, N. K., Londonkar, R. L., Nayaka, H. B., & Sanjeev Kumar, C. B. (2015). Cytotoxicity and hepatoprotective attributes of methanolic extract of *Rumex vesicarius* L. *Biological Research*, 48, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0009-8>

- Au, J. S., & Frenette, C. T. (2015). Management of hepatocellular carcinoma: Current status and future directions. *Gut and Liver*, 9(4), 437–448. <https://doi.org/10.5009/gnl15022>
- Aubry, T., Luís, L., & Dimuccio, L. A. (2012). Nature vs. Culture: Present-day spatial distribution and preservation of open-air rock art in the Côa and Douro River Valleys (Portugal). *Journal of Archaeological Science*, 39(4), 848–866. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.10.011>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>
- Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., & Pires, I. M. (2018). Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>
- Bonfili, L., Cecarini, V., Amici, M., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Keller, J. N., & Eleuteri, A. M. (2008). Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. *FEBS Journal*, 275(22), 5512–5526. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06696.x>
- Braillon, A. (2012). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 380(9840), 469. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61282-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61282-3)
- Brautigam, D. L., Gielata, M., Heo, J., Kubicka, E., & Wilkins, L. R. (2018). Selective toxicity of caffeic acid in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(2), 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.155>
- Chandra, S., Lata, H., & Varma, A. (2012). Biotechnology for medicinal plants: Micropropagation and improvement. In *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement* (Vol. 9783642299). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2>
- Colle, D., Arantes, L. P., Rauber, R., De Mattos, S. E. C., Rocha, J. B. T. Da, Nogueira, C. W., & Soares, F. A. A. (2012). Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* fruit extract are involved in the protective effect against cellular death induced by sodium nitroprusside in brain of rats. *Pharmaceutical Biology*, 50(7), 883–891. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.641981>
- Eidi, A., Mortazavi, P., Bazargan, M., & Zaringhalam, J. (2012). Hepatoprotective activity of cinnamon ethanolic extract against CCL 4-induced liver injury in rats.

- EXCLI Journal*, 11, 495–507. <https://doi.org/10.17877/DE290R-4957>
- El-Hawary, S. A., Sokkar, N. M., Ali, Z. Y., & Yehia, M. M. (2011). A Profile of Bioactive Compounds of *Rumex vesicarius* L. *Journal of Food Science*, 76(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02370.x>
- Elgengaihi, S., Mossa, A. T. H., Refaie, A. A., & Aboubaker, D. (2016). Hepatoprotective efficacy of *Cichorium intybus* L. extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Journal of Dietary Supplements*, 13(5), 570–584. <https://doi.org/10.3109/19390211.2016.1144230>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., ... Martínez-González, M. A. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *New England Journal of Medicine*, 378(25), e34. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1800389>
- Fan, L. M., & Li, J. M. (2014). Evaluation of methods of detecting cell reactive oxygen species production for drug screening and cell cycle studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.03.173>
- Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>
- Feng, L., Liu, B., Zhong, J., Sun, L., & Yu, H. (2014). Effect of Grape Procyanidins on Tumor Angiogenesis in Liver Cancer Xenograft Models. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15, 737–741.
- Fernández-Palanca, P., Fondevila, F., Méndez-Blanco, C., Tuñón, M. J., González-Gallego, J., & Mauriz, J. L. (2019). Antitumor effects of quercetin in hepatocarcinoma in vitro and in vivo models: A systematic review. *Nutrients*, 11(12), 1–31. <https://doi.org/10.3390/nu11122875>
- Ferreres, F., Ribeiro, V., Izquierdo, A. G., Rodrigues, M. Â., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2006). *Rumex induratus* leaves: Interesting dietary source of potential bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5782–5789. <https://doi.org/10.1021/jf0613233>
- Ganaie, M. A., Khan, T. H., Siddiqui, N. A., & Ansari, M. N. (2015). Ameliorative effect of methanol extract of *Rumex vesicarius* on CCl₄-induced liver damage in Wistar albino rats. *Pharmaceutical Biology*, 53(8), 1163–1167.

<https://doi.org/10.3109/13880209.2014.967782>

- Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R., Höhne, C., Huschka, C., Schmidtke, M., Abate, A., & Neubert, R. H. H. (2003). Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia*, *74*(1–2), 139–143. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00315-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00315-5)
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, *88*(April), 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>
- Gil, V., Domínguez-Rodríguez, A., Masip, J., Peacock, W. F., & Miró, Ò. (2019). Morphine Use in the Treatment of Acute Cardiogenic Pulmonary Edema and Its Effects on Patient Outcome: A Systematic Review. *Current Heart Failure Reports*, *16*(4), 81–88. <https://doi.org/10.1007/s11897-019-00427-0>
- Guerra, L., Pereira, C., Andrade, P. B., Rodrigues, M. Â., Ferreres, F., De Pinho, P. G., Seabra, R. M., & Valentão, P. (2008). Targeted metabolite analysis and antioxidant potential of *Rumex induratus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(17), 8184–8194. <https://doi.org/10.1021/jf801385z>
- Gupta, B. D., Kapahi, K., Muthiah, S., Mondhe, D. M., Nabi, G., Kumar, V., & Mathan, G. (2006). (12) Patent Application Publication (10) Pub . No . : US 2006 / 0280817 A1. 1(19).
- Haider, S. (2020). Review of Handbook of Pharmaceutical Natural Products. *Journal of Natural Products*, *83*(7), 2311–2311. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00941>
- Howes, M. J. R. (2018). The evolution of anticancer drug discovery from plants. *The Lancet Oncology*, *19*(3), 293–294. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30136-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30136-0)
- Hu, X. Y., Liang, J. Y., Guo, X. J., Liu, L., & Guo, Y. B. (2015). 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *42*(2), 146–153. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12333>
- Imran, M., Aslam Gondal, T., Atif, M., Shahbaz, M., Batool Qaisarani, T., Hanif Mughal, M., Salehi, B., Martorell, M., & Sharifi-Rad, J. (2020). Apigenin as an anticancer agent. *Phytotherapy Research*, *34*(8), 1812–1828. <https://doi.org/10.1002/ptr.6647>
- Imran, M., Rauf, A., Abu-izneid, T., Nadeem, M., Ali, M., Ali, I., Imran, A., Erdogan, I., Rizwan, M., Atif, M., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *112*(September 2018). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>

- Janbaz, K. H., Saeed, S. A., & Gilani, A. H. (2004). Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*, *11*(5), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.05.002>
- Ji, J., Wang, H., Li, Y., Zheng, L., Yin, Y., Zou, Z., Zhou, F., Zhou, W., Shen, F., & Gao, C. (2016). Diagnostic Evaluation of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin versus α -Fetoprotein for Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in China: A Large-Scale, Multicentre Study. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153227>
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(2–3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, *37*(7), 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>
- Kumar, S. V., Sanjeev, T., Ajay, S., Kumar, S. P., Anil, S., Kumar, S. V., Bihani, S. G. L., & College, S. D. (2012). A Review on Hepatoprotective Activity of Medicinal Plants Corresponding Author: *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*, *2*(1), 31–38.
- Kuo, Z. K., Lin, M. W., Lu, I. H., Yao, H. J., Wu, H. C., Wang, C. C., Lin, S. H., Wu, S. Y., Tong, T. S., Cheng, Y. C., Yen, J. H., Ko, C. H., Chiou, S. J., Pan, I. H., & Tseng, H. W. (2016). Antiangiogenic and antihepatocellular carcinoma activities of the *Juniperus chinensis* extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1250-6>
- Lehmann, A., Späni, S., Harings-Kaim, A., Probst, C., Christ, A., & Leuppi-Taegtmeyer, A. B. (2021). A case of intoxication with tea made from *Digitalis purpurea*. *Global Cardiology Science and Practice*, *2021*(1). <https://doi.org/10.21542/gcsp.2021.2>
- Llovet, J. M. (2005). Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, *40*(3), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1566-3>
- Longo, L., Platini, F., Scardino, A., Alabiso, O., Vasapollo, G., & Tessitore, L. (2008). Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(8), 2476–2485. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0361>
- López González, G. (1990). Familia Polygonaceae. Género Rumex. *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de La Península Ibérica e Islas Baleares. Volumen II*, 591, 595–634.
- Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez,

- M. T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., Morales-González, Á., García-Luna Y González-Rubio, M., Aguilar-Faisal, J. L., & Morales-González, J. A. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14787–14804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>
- Mahesh, B. U., Shrivastava, S., Pragada, R. R., Naidu, V. G. M., & Sistla, R. (2014). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Boswellia ovalifoliolata* bark extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(9), 663–671. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60101-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60101-1)
- Mentella, M. C., Scaldaferri, F., Ricci, C., Gasbarrini, A., & Miggiano, G. A. D. (2019). Cancer and mediterranean diet: A review. *Nutrients*, 11(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu11092059>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Miwa, S., & Brand, M. D. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1300–1301. <https://doi.org/10.1042/bst0311300>
- Molla, M. D., Dessie, G., Akalu, Y., & Ayelign, B. (2020). Hepatocellular Expression of SIRT1 and Its Effect on Hepatocellular Carcinoma Progression: A Future Therapeutic Perspective. *International Journal of Hepatology*, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/2374615>
- Momeny, M., Khorramizadeh, M. R., Ghaffari, S. H., Yousefi, M., Yekaninejad, M. S., Esmaeili, R., Jahanshiri, Z., & Nooridalooii, M. R. (2008). Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*, 591(1–3), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.011>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'H, J., Siliart, B., & Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), 272–283. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>
- Özaslan, M., & Oguzkan, S. B. (2018). Use of plant extracts in alternative medicine. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 21(1), 1–7. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2018.1.7>

- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*, 3(11), 1–7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>
- Pinela, J., Barreira, J. C. M., Barros, L., Verde, S. C., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Modified atmosphere packaging and post-packaging irradiation of *Rumex induratus* leaves: a comparative study of postharvest quality changes. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7), 2943–2956. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2260-6>
- Pires, A. S., Marques, C. R., Encarnação, J. C., Abrantes, A. M., Mamede, A. C., Laranjo, M., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Botelho, M. F. (2016). Ascorbic acid and colon cancer: an oxidative stimulus to cell death depending on cell profile. *European Journal of Cell Biology*, 95(6–7), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.04.001>
- Prassas, I., & Diamandis, E. P. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(11), 926–935. <https://doi.org/10.1038/nrd2682>
- Rahman, S., & Islam, R. (2011). Mammalian Sirt1: Insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-11>
- Rodríguez-Hernández, M. A., Chapresto-Garzón, R., Cadenas, M., Navarro-Villarán, E., Negrete, M., Gómez-Bravo, M. A., Victor, V. M., Padillo, F. J., & Muntané, J. (2020). Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2D/3D culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death and Disease*, 11(5), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2558-1>
- Sagnelli, E., Macera, M., Russo, A., Coppola, N., & Sagnelli, C. (2020). Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma. *Infection*, 48(1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01345-y>
- Sen, T., & Samanta, S. K. (2014). Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 147, 59–110. https://doi.org/10.1007/10_2014_273
- Shafiq, N., Saleem, M., Kousar, S., Sahar, M., Hussain, S. M., & Jabeen, F. (2017). *Investigation of Genus Rumex for Their Biologically Active Constituents*. April, 2017. www.rjlbpcs.com
www.rjlbpcs.com
- Shahat, A. A., Alsaid, M. S., Kotob, S. E., & Ahmed, H. H. (2015). Significance of

- Rumex vesicarius* as anticancer remedy against hepatocellular carcinoma: A proposal-based on experimental animal studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(10), 4303–4310. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.10.4303>
- Sittampalam, G., Coussens, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P., Mcgee, J., Mcmanus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J. M., Riss, T., Trask, O., & Weidner, J. (2016). Assay Guidance Manual. *Assay Guidance Manual, Md*, 305–336.
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., & Vellayappan, B. A. (2019). Redox Biology ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25(October 2018), 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Szilágyi, G., Simon, L., Koska, P., Telek, G., & Nagy, Z. (2006). Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining. *Neuroscience Letters*, 399(3), 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.071>
- Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., & Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121(October 2019), 109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>
- Taveira, M., Guedes de Pinho, P., Gonçalves, R. F., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2009). Determination of eighty-one volatile organic compounds in dietary *Rumex induratus* leaves by GC/IT-MS, using different extractive techniques. *Microchemical Journal*, 93(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.04.008>
- Tellapuri, S., Sutphin, P. D., Beg, M. S., Singal, A. G., & Kalva, S. P. (2018). Staging systems of hepatocellular carcinoma: A review. *Indian Journal of Gastroenterology*, 37(6), 481–491. <https://doi.org/10.1007/s12664-018-0915-0>
- Thereof, P. P. (2006). (12) *United States Patent*. 56(1), 15–21.
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Wallace, M. C., Preen, D., Jeffrey, G. P., & Adams, L. A. (2015). The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: A global perspective. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, 9(6), 765–779. <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1028363>
- Wei, F., Liu, S. K., Liu, X. Y., Li, Z. J., Li, B., Zhou, Y. L., Zhang, H. Y., & Li, Y. W. (2013). Meta-analysis: Silymarin and its combination therapy for the treatment of

- chronic hepatitis B. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(5), 657–669. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1789-1>
- Wei, Q., Zhao, L., Jiang, L., Bi, J., Yu, Z., Zhao, L., Song, X., Sun, M., Chen, Y., & Wei, M. (2019). Prognostic relevance of miR-137 and its liver microenvironment regulatory target gene AFM in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 11888–11899. <https://doi.org/10.1002/jcp.27855>
- Xia, J., Gao, J., Inagaki, Y., Kokudo, N., Nakata, M., & Tang, W. (2013). Flavonoids as Potential Anti-Hepatocellular Carcinoma Agents: Recent Approaches Using HepG2 Cell Line. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.5582/ddt.2013.v7.1.1>
- Xu, H., Yang, T., Liu, X., Tian, Y., Chen, X., Yuan, R., Su, S., Lin, X., & Du, G. (2016). Luteolin synergizes the antitumor effects of 5-fluorouracil against human hepatocellular carcinoma cells through apoptosis induction and metabolism. *Life Sciences*, 144, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.002>
- Yang, S. Y., Pyo, M. C., Nam, M. H., & Lee, K. W. (2019). ERK/Nrf2 pathway activation by caffeic acid in HepG2 cells alleviates its hepatocellular damage caused by t-butylhydroperoxide-induced oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2551-3>
- Zhang, R., Niu, Y., & Zhou, Y. (2010). Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms. *Toxicology Letters*, 192(2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.012>
- Zhou, J., Fang, L., Liao, J., Li, L., Yao, W., Xiong, Z., & Zhou, X. (2017). Investigation of the anti-cancer effect of quercetin on HepG2 cells in vivo. *PLoS ONE*, 12(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172838>
- Zhou, Y., Li, Y., Zhou, T., Zheng, J., Li, S., & Li, H. Bin. (2016). Dietary natural products for prevention and treatment of liver cancer. *Nutrients*, 8(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu8030156>

Sites consultados:

<https://arte-coa.pt/>, consultado dia 07/01/2021 às 00.51 horas

http://www.flora-on.pt/#1endemismo_vila_nova_de_foz_coa, consultado dia 16/06/2021 às 08.54 horas

<https://arte-coa.pt/parque/>, consultado dia 17/06/2021 às 00.14 horas

F.Clamote, P.V.Araújo, A.Carapeto, M.Porto, J.D.Almeida, E.Portela-Pereira, A.J.Pereira, C.T.Gomes, et al. (2021). Concelho: pinhel - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wpinhel>. Consulta realizada em 17/06/2021

Referências de Imagens:

Figura 1: <https://arte-coa.pt/en/the-region/>

Figura 2: <https://flora-on.pt/#/1rumex+induratus>

Figura 3: F.Clamote, P.V.Araújo, A.Carapeto, J.D.Almeida, D.T.Holyoak, J.Lourenço, A.Amado, M.Porto, et al. (2021). Rumex induratus Boiss. & Reut. - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wRumex+induratus>. Consulta realizada em 13/05/2021

Figura 4: Olmos, Y., Brosens, J. J., & Lam, E. W. F. (2011). Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.12.001>

Figura 5: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=11&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D consultado dia 7/01/2021 às 16.23 horas.

