

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Tecnologia, Ambiente e Sociedade

Isac Henrique Cordeiro

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Alocasia macrorrhizos* EM CULTURA DE
CÉLULAS E MODELO MURINO DE VITILIGO**

Teófilo Otoni-MG

2018

Isac Henrique Cordeiro

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Alocasia macrorrhizos* EM CULTURA DE
CÉLULAS E MODELO MURINO DE VITILIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia, Tecnologia e Gestão.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra de Paula Carli
Coorientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Teófilo Otoni-MG

2018

Ficha Catalográfica
Preparada pelo Serviço de Biblioteca/UFVJM
Bibliotecário responsável: Gilson Rodrigues Horta – CRB6 nº 3104

C794b Cordeiro, Isac Henrique.
2018 Bioatividade dos extratos de alocaisia macrorrhizos em cultura de células e modelo murino de vitiligo. / Isac Henrique Cordeiro. Teófilo Otoni, 2018.
66 p. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, 2018.

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Alessandra de Paula Carli.
Coorientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves.

1. Inibidores de proteases. 2. Alocaisia macrorrhizos. 3. Vitiligo.
I. Título.

CDD: 547

ISAC HENRIQUE CORDEIRO

BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Alocasia macrorrhizos* EM CULTURA DE CÉLULAS E MODELO MURINO DE VITILIGO.

Dissertação apresentada ao MESTRADO EM TECNOLOGIA, AMBIENTE E SOCIEDADE, nível de MESTRADO, como parte dos requisitos para obtenção do título de MAGISTER SCIENTIAE EM TECNOLOGIA, AMBIENTE E SOCIEDADE.

Orientador: Prof^a Dr^a Alessandra De Paula Carli

Coorientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Data da aprovação: 11/05/2018


Prof^a Dr^a ALESSANDRA DE PAULA CARLI- UFVJM


Prof. Dr. CAIO CESAR DE SOUZA ALVES-UFVJM


Prof. Dr. FERNANDO LEITAO ROCHA JUNIOR-UFVJM


Prof. Dr. JAIRO LISBOA RODRIGUES- UFVJM


Prof^a. Dr^a VALQUÍRIA PEREIRA DE MEDEIROS- UFJF

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu Senhor e Deus por me proporcionar tão grande benção e me ouvir nos pedidos e nos agradecimentos;

À minha família que me apoiou e me incentivou nesta caminhada do conhecimento;

À minha esposa, Gisleanne Cordeiro, por me apoiar e até dividir cargas comigo quando possível, como o fez, sempre companheira, amiga, às vezes impaciente com a ausência, porém compreensiva, com seu amor me ajuda muito.

À minha filha, Alyce Cordeiro, com entusiasmo me alegrou e também me ajudou neste processo, que serviu de exemplo para sua vida;

Aos meus atentos e comprometidos orientadores, Prof^a. Dr^a. Alessandra de Paula Carli e Prof. Dr. Caio Cesar Souza Alves, profundos conhecedores e pessoas da mais alta disposição científica, proporcionando conhecimento e me incentivando a ser como eles, pesquisadores e desbravadores. Vocês são inesquecíveis...

A todos os professores, funcionários que participaram deste projeto e que me auxiliaram de forma respeitosa e de boa vontade, como Dr^a. Sarah Auharek, Dr^a. Sandra Bertelli, Dr Jairo Lisboa, Dr. Tiago Barbosa.

Aos meus companheiros do mestrado Gracimério José Guarneire e Alcides Alves de Freitas, pelas situações de soma de esforços e divisão de trabalhos, dificuldades e alegrias... Foi tremendo, Congressos que os digam!

Enfim, agradeço nossa querida Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri que de forma tão profissional e acolhedora, não feita só de matéria, mas também de humanidade, onde muitos rascunhos se tornam permanentes conhecimentos científicos, resultando no bem comum.

RESUMO

Na medicina tradicional do Vale do Mucuri, os extratos de tubérculos de *Alocasia macrorrhizos* são amplamente utilizados no tratamento do Vitiligo. Assim, torna-se importante considerar o valor potencial desta planta em seu conjunto, para a expansão do conhecimento sobre os princípios ativos para o uso seguro pela população. O objetivo deste estudo foi analisar a bioatividade dos extratos de *A. macrorrhizos* em cultura de células e modelo murino de vitiligo. Os tubérculos de *A. macrorrhizos* foram submetidos à extração aquosa, etanólica e de inibidores de proteases (IP). Os IP foram caracterizados utilizando SDS-PAGE, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e Espectrometria de Massas MALDI-ToF. Foi analisada a estequiometria de inibição de tripsina, atividade antioxidante e hemaglutinante dos IP. Para realização dos ensaios *in vitro* utilizou-se de células RAW 264.7 foram cultivadas, na presença e ausência de IP e de extrato aquoso. A viabilidade das células foi avaliada pelo método de MTT. O óxido nítrico (NO), pelo método de Griess, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), pelo método de ELISA, foram mensurados nos sobrenadantes da cultura. O modelo murino de vitiligo foi induzido com hidroquinona 5% em camundongos C57BL/6 machos, que foram tratados ou não com 100mg/kg de extrato de tubérculo torrado. Os resultados mostraram a presença de duas bandas com aproximadamente 11 e 24 kDa. A HPLC mostrou dois picos nos tempos de retenção de 12 e 13 minutos e a análise de Espectrometria de Massas detectou um íon mais intenso de m/z (4213.484) e (8435.185) no tubérculo cru. O valor médio de inibição da tripsina foi de 0,423mg/L no tubérculo cru. A porção crua mostrou 40% de atividade antioxidante sem apresentar atividade hemaglutinante. Apenas na concentração de 100 μ g/ml no IP de tubérculo torrado houve redução expressiva da viabilidade das células RAW 264.7. Além disso, a maior concentração dos extratos aquosos e etanólicos apresentaram 50% de citotoxicidade. O IP do tubérculo cru obteve os melhores resultados de redução da produção de NO e TNF- α , assim como o extrato etanólico do tubérculo cru, sem apresentar citotoxicidade. Os dados obtidos das análises das amostras biológicas mostraram que ocorreu a repigmentação dos folículos pilosos e redução do espessamento da camada epidérmica observados a nível histopatológico. Conclui-se, portanto, que os resultados *in vitro* e *in vivo* sugerem uma possibilidade do uso de extratos da espécie vegetal *Alocasia macrorrhizos* para a terapêutica do vitiligo.

Palavras-chaves: Inibidores de proteases; *Alocasia macrorrhizos*; Vitiligo.

ABSTRACT

In the traditional medicine of the Mucuri Valley, the extracts of tubers of *Alocasia macrorrhizos* are widely used in the treatment of Vitiligo. Thus, it is important to consider the potential value of this plant as a whole, for the expansion of knowledge about the active principles for safe use by the population. The objective of this study was to analyze the bioactivity of extracts of *A. macrorrhizos* in cell culture and murine model of vitiligo. The tubers of *A. macrorrhizos* were submitted to aqueous extraction, ethanol extraction and protease inhibitors (PI). IPs were characterized using SDS-PAGE, high performance liquid chromatography (HPLC) and MALDI-ToF Mass Spectrometry. The trypsin inhibition stoichiometry, antioxidant and hemagglutinating activity of PIs were analyzed. RAW 264.7 cells were cultured in the presence and absence of IP and aqueous extract. Cell viability was assessed by the MTT method. Nitric oxide (NO) by the Griess method and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by the ELISA method were measured in culture supernatants. The murine model of vitiligo was induced with 5% hydroquinone in male C57BL / 6 mice, which were treated or not with 100mg / kg roasted tuber extract. The results showed the presence of two bands with approximately 11 and 24 kDa. HPLC showed two peaks at retention times of 12 and 13 minutes and mass spectrometry analysis detected a stronger ion of m / z (4213.484) and (8435.185) in the raw tuber. The mean value of trypsin inhibition was 0.423 mg / L in the raw tuber. The raw portion showed 40% antioxidant activity without haemagglutinating activity. Only at the concentration of 100 μ g / ml in roasted tubers PI there was an expressive reduction of viability of RAW 264.7 cells. In addition, the highest concentration of aqueous and ethanolic extracts presented 50% cytotoxicity. The CP of the raw tuber obtained the best results of reduction of the production of NO and TNF- α , as well as the ethanolic extract of the raw tuber, without presenting cytotoxicity. The data obtained from the analyzes of the biological samples showed that the repigmentation of the hair follicles and reduction of the thickening of the epidermal layer observed at the histopathological level occurred. It is concluded, therefore, that the in vitro and in vivo results suggest a possibility of the use of extracts of the *Alocasia macrorrhizos* plant species for the treatment of vitiligo.

Key-words: Protease inhibitors; *Alocasia macrorrhizos*; Vitiligo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 A	<i>Alocasia macrorrhizos</i>	14
Figura 1 B	Localização de coleta da <i>Alocasia macrorrhizos</i>	14
Figura 2	Molécula de Inibidor de Proteases da família Bowman-Birk (BBI).....	16
Figura 3	Molécula de Inibidor de Proteases da família Kunitz (KTI).....	17
Figura 4 A	Tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i> , torradas.....	19
Figura 4 B	Lâminas de <i>A. macrorrhizos</i>	19
Figura 4 C	Lâminas torradas de <i>A. macrorrhizos</i>	19
Figura 4 D	Farinha torrada de <i>A. macrorrhizos</i>	19
Figura 5	Organograma de produção de extratos e ensaios “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”.....	20
Figura 6	Organograma de produção de extratos isolados e purificados de inibidores de proteases para ensaio “ <i>in vitro</i> ”.....	21
Figura 5	Exsicata de <i>A. macrorrhizos</i>	29
Figura 6	Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos inibidores de proteases a base de tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i>	31
Figura 7	Organograma ilustrativo de ensaio “ <i>in vitro</i> ”.....	26
Figura 8	Grupos de camundongos submetidos a indução de Vitiligo e tratamento com extratos.....	28
Figura 9	Metodologia de tratamento dos animais com extrato via gavagem.....	29
Figura 10	Metodologia de tratamento dos animais com extrato via gavagem.....	30
Figura 11	Exsicata de <i>A. macrorrhizos</i>	32
Figura 12	Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos extratos a base de tubérculos crus e torrados de <i>Alocasia macrorrhizos</i>	34
Figura 13	Espectro de massas MALDI-ToF do extrato enriquecido de inibidores de proteases de tubérculo crua de <i>A. macrorrhizos</i>	37
Figura 14	Espectro de massas MALDI-ToF do extrato enriquecido de inibidores de proteases de tubérculo torrado de <i>A. macrorrhizos</i>	38
Figura 15	Indução do modelo Murino de vitiligo (controle negativo).....	46
Figura 16	Indução do modelo Murino de vitiligo (controle positivo).....	47
Figura 17	Lâminas do Modelo Murino de Vitiligo espessura da epiderme.....	48
Figura 12	Lâminas Folículos Pilosos com presença e ausência de melanina.....	49

Gráfico 1	Gráfico de análise de proteínas de inibidores de proteases de Soja e de <i>A. macrorrhizos</i>	30
Gráfico 2	Espectro de absorção molecular de inibidores de proteases do extrato a base de tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i> em espectrofotômetro.....	32
Gráfico 3	Cromatograma de inibidores de proteases de <i>A. macrorrhizos</i> e grãos de <i>Glycine max</i>	33
Gráfico 4	A - O gráfico de atividade inibitória a base de Soja; B - Tubérculos torrados a 80°C de <i>Alocasia macrorrhizos</i> ; D - Tubérculos crus de <i>Alocasia macrorrhizos</i>	36
Gráfico 5	Viabilidade celular (RAW 264-7) de inibidores de proteases de tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i> e do padrão de soja.....	39
Gráfico 6	Viabilidade celular (RAW 264-7) de extratos de tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i>	39
Gráfico 7	Determinação da produção de NO de inibidores de proteases de tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i> e do padrão de soja.....	41
Gráfico 8	Determinação da produção de NO de extratos de tubérculos de <i>A. macrorrhizos</i> e do padrão de soja.....	41
Gráfico 9	Gráfico da cultura de células aferindo liberação de citocinas através dos PI a base de tubérculos crus e torrados de <i>Alocasia macrorrhizos</i> e de grãos de <i>G. max</i>	42
Gráfico 10	Gráfico da cultura de células aferindo liberação de citocinas através dos extratos a base de tubérculos crus e torrados de <i>Alocasia macrorrhizos</i> e de grãos de <i>G. max</i>	43
Gráfico 11	Histopatologia, espessamento da epiderme comparada entre os grupos	45
Quadro 1	Sinonímia <i>Alocasia macrorrhizos</i>	12
Quadro 2	Árvore filogenética da <i>A. macrorrhizos</i>	18
Mapa 1	Localização do Vale do Mucuri em Minas Gerais, Brasil.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade hemaglutinante de extratos de <i>A. macrorrhizos</i> e <i>G. max</i>	37
Tabela 2	Atividade antioxidante de extratos e inibidores de proteases de <i>A. macrorrhizos</i>	38

SIGLAS E ABREVIATURAS

RAW 264.7 linhagem de células de macrófagos murinos.

A549 linhagem de células de carcinoma alveolar de pulmão humano.

IP Inibidores de proteases.

A. macrorrhizos *Alocasia macrorrhizos*.

G. max *Glycine max*.

NO Óxido Nítrico.

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida em detergente.

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

MTT Metil Tiazol Tetrazólio.

RM Raiz mansa ou tubérculo manso, não tóxica.

RT Raiz torrada ou tubérculo torrado a 80°C.

C57BL/6 Camundongo da linhagem 57 preto macho.

LPS Lipopolissacarídeos.

DNA Ácido Desoxirribonucleico.

mRNA Ácido Ribonucleico Mensageiro.

BBI Bowman-Birk.

Xg Força gravitacional.

U.H. Hemaglutinação.

ELISA Ensaio Imunoadsorvente ligado à Enzima.

PBS Tampão de Bloqueio.

KTI Kunitz.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
2.1 Geral	8
2.2 Específicos	8
3. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1. Vitiligo	9
3.1.2 Terapêutica do Vitiligo.....	10
3.2. <i>Alocasia macrorrhizos</i>	12
3.3 Inibidores de Proteases	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Levantamentos Etnobotânico e Fitobotânico.....	18
4.2. Preparo da Farinha à base de <i>A. macrorrhizos</i>	18
4.3. Obtenção de Extrato Aquoso.....	19
4.4. Extrações de inibidores de proteases	20
4.5. Análise proteína	21
4.6. Eletroforese 12% SDS-PAGE.....	22
4.7. Varredura UV/VISÍVEL	22
4.8. Detecção de inibidores de proteases por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	22
4.9. Atividade inibitória anti-tripsina	23
4.10. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH).....	24
4.11. Atividade hemaglutinante.....	24
4.12. Caracterização de Inibidores de Proteases por Espectrometria de Massas MALDI-TOF	25
4.13. Cultura de células e Linhagem celular RAW 264.7	25
4.13.1. Viabilidade Celular	25
4.13.2. Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	26
4.13.3. Determinação da produção citocinas TNF- α	27
4.14. Animais	27

4.14.1. Indução do modelo Murino de Vitiligo com Hidroquinona e tratamento com extrato de <i>Alocasia macrorrhizos</i>	28
4.14.2. Determinação do escore e disseminação de vitiligo	29
5. Estudos Histopatológicos	29
5.1. Determinação da despigmentação da derme	30
5.2. Coloração de Fontana-Masson.....	31
6. Análise Estatística.....	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Levantamento etnobotânico	32
7.2. Quantificação de Proteínas	33
7.3. Detecção de inibidores de proteases por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 12% SDS-PAGE	34
7.4. Análise ultravioleta – UV/vis	35
7.5. Detecção de inibidores de proteases por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).	36
7.6. Identificação dos inibidores de proteases por Espectrometria de Massas LCMS-IT-TOF do tipo electrospray.....	37
7.7. Atividade Enzimática	39
7.8. Atividade hemaglutinante.....	40
7.9. Atividade antioxidante – DPPH	41
7.10. Viabilidade Celular com macrófagos RAW 264.7.....	42
7.10.1. Determinação da produção de NO.....	43
7.10.2. Ensaio de Citocinas TNF- α	45
8. Indução do modelo Murino de vitiligo.....	46
8.1. Estudos Histopatológicos	47
9. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde desenvolveu resoluções que consideram o valor das plantas medicinais para a expansão dos serviços regionais de saúde, uma vez que a natureza é fonte de recursos naturais para manutenção da vida humana (OPAS, 2000). Diante deste contexto inúmeras espécies de plantas no Brasil são utilizadas em forma de extratos e emplastos, porém muitas vezes sem comprovação científica que ateste sua eficácia (HOLETZ et al., 2010).

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido promovida através de práticas de culturas populares e pesquisas científicas a partir da etnobotânica (LADIO & LOZADA 2004). Segundo Badke e colaboradores (2011) algumas plantas detêm certas propriedades (princípios ativos) que são utilizados de forma empírica no tratamento de doenças. Assim, a realização de estudos e pesquisas científicas com plantas medicinais pode contribuir para o aprimoramento do seu uso.

A *Alocasia macrorrhizos* foco deste estudo se adapta e reproduz com facilidade em terras cultivadas, quintais, jardins, regiões úmidas e florestas, também ao longo de margens de rios e córregos (MANNER, 2011). A espécie *Alocasia macrorrhizos* da família Aráceas é utilizada por populares de forma indiscriminada na região do Vale do Mucuri para a terapêutica o vitiligo.

O Vitiligo é uma doença de causa não definida, sendo que muitos estudos já foram realizados e os avanços não são conclusivos. Sendo uma doença adquirida de origem ainda desconhecida, é o resultado da morte dos melanócitos (células produtoras de melanina que por sua vez é responsável pela cor da pele), sua inativação ou degradação dos grânulos de melanina, em várias partes do corpo como na pele, bulbo capilar, mucosas (ISSA, 2003).

O presente estudo abordará a bioatividade dos extratos e inibidores de proteases isolados a partir de tubérculos de *Alocasia macrorrhizos* em ensaios *in vitro* avaliando a citotoxicidade e *in vivo* através de modelo de vitiligo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a bioatividade dos extratos e dos inibidores de proteases da *Alocasia macrorrhizos* *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Específicos

- Coletar, Identificar e Depositar o exemplar da espécie *Alocasia macrorrhizos* no herbário da UFVJM;
- Preparar extratos aquosos, etanólicos e extratos purificados de inibidores de proteases;
- Detectar os inibidores de proteases em tubérculos de *Alocasia macrorrhizos*, utilizando SDS-PAGE, HPLC e Espectrometria de Massas;
- Testar a atividade Hemaglutinante, atividade antioxidante e Estequiometria Inibitória;
- Analisar *in vitro* a bioatividade dos extratos e dos inibidores de proteases de *Alocasia macrorrhizos* em células RAW 264.7;
- Padronizar o modelo Murino de Vitiligo;
- Estudar o potencial de tubérculos de *Alocasia macrorrhizos* em modelo Murino de Vitiligo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Vitiligo

O termo vitiligo é derivado do grego vitelius (vitelo) que significa “novilho”, isso se deve a semelhança das manchas brancas de um novilho malhado com as máculas brancas da doença. Essa doença que por sua vez atinge 1,5% da população brasileira comprometendo de modo semelhante homens e mulheres, preferencialmente com idade entre 10 e 30 anos. (BELLET & PROSE, 2005).

O Vitiligo é uma doença de causa e cura não definidos, sendo que muitos estudos já foram realizados e os avanços não são conclusivos. Sendo uma doença adquirida de origem ainda desconhecida, é o resultado inativação ou morte dos melanócitos (células produtoras de melanina, pigmento que da cor a pele) ou degradação dos grânulos de melanina, na pele em várias partes do corpo como, bulbo capilar, mucosas e na órbita dos olhos. O indivíduo acometido além das manchas branco-nacaradas por todo o corpo pode sofrer problemas de ordem social e psicológica (ISSA, 2003).

A melanina (do grego melas-preto) é o principal elemento responsável pela cor da pele, cabelos e olhos. É formada pelos melanócitos, de origem nervosa, que na epiderme, se localizam entre as células da camada basal ou logo abaixo, na derme. A melanina é vista no citoplasma dos melanócitos, nas células da camada basal e, mais raramente, sobretudo em pretos, no citoplasma das demais células da epiderme, sob a forma de grânulos pardacentos ou negros. Também na derme, pouco abaixo da epiderme, há células contendo melanina denominada melanóforos. Estes são macrófagos que não formam o pigmento, mas transportam-no. Os melanócitos formam a melanina por oxidação da tirosina, da qual se origina a dioxifenilalanina ou DOPA e, desta, a melanina. A oxidação é catalisada pela enzima tirosinase, existente no citoplasma dos melanócitos. A melanina cora-se de negro pelo nitrato de prata, reação utilizada para destacar mais a melanina (e enegrecer cabelos brancos). A diminuição ou perda da pigmentação da pele é vista em dermatites (lepra), cicatrizes, manchas senis, vitiligo, albinismo etc., em consequência da formação deficitária de melanina pelos melanócitos (FARIA, 2003).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia (2015), alguns fatores participam do desencadeamento da doença: estresse físico e emocional, traumas mecânicos, substâncias químicas e doenças autoimunes.

A gênese do Vitiligo pode ser explicada por teorias propostas por pesquisadores de diferentes seguimentos das ciências biomédicas, podendo-se citar: Teoria Genética onde uma desordem poligênica por meio multifatorial causaria a expressão nos indivíduos que por sua vez manifestam o vitiligo (RIAD *et al.*, 2013; MAJUMDER *et al.*, 1993).

A teoria autoimune demonstra o ponto de vista onde ocorre a presença de auto anticorpos contra os melanócitos, que são encontrados na circulação sanguínea de 50% a 93% dos portadores dessa patologia (FISHMAN *et al.*, 1993; ALKHATEEB *et al.*, 2003).

A teoria auto tóxica dos melanócitos baseando-se no fato da observação de substâncias como o fenol, que são capazes de provocar lesão, principalmente em células produtoras de melanina (melanócitos) responsáveis pelo pigmento da pele, levando-as a morte e por consequência ocorre o vitiligo (LERNER, 1978; ZIEGLER, 1998).

A Teoria neural alega que os melanócitos por serem células derivadas da mesma linhagem embrionária, na qual também da origem ao sistema nervoso, pode-se propor que processos patológicos que afetem sistema nervoso central, também possam por sua vez atacar os melanócitos, causando uma reação em cadeia nas células dessa mesma linhagem (BARNES, 1988; REEDY *et al.*, 1998).

Estudos evidenciaram a ocorrência de desequilíbrios do sistema antioxidante/oxidante tecidual, além de distúrbios no sangue de pacientes com vitiligo, isso promove a morte de melanócitos por estresse oxidativo (YILDIRIM *et al.*, 2004; INES *et al.*, 2006).

3.1.2 Terapêutica do Vitiligo

A helioterapia é uma opção simples de tratamento do vitiligo, utiliza-se da luz solar para estimular a proliferação de melanócitos, o que já ocorre normalmente quando as pessoas são expostas ao sol. Praticamente todos os pacientes tem boa aceitação ao tratamento, é de baixo custo e risco (STEINER, *et al.*, 2004).

UVB estreita é um tratamento administrado duas vezes semanais com luz ultravioleta, sem adição de fotossensibilizantes, ocorrendo maior eficácia da repigmentação na face, e com menos precisão nos pés e nas mãos. As vantagens perceptíveis são um número pequeno de dermatites foto alérgico e foto tóxica, prurido e xerose. A duração das sessões é de curto tempo, não sendo necessário foto proteção pós-tratamento, não tem restrição a grávidas ou lactantes, adultos ou crianças (TANGHETTI, 2003).

Corticoterapia tópica em alguns pacientes com vitiligo ao utilizarem de potentes corticoides tópicos como valerato de betametasona a 0,1% e propionato de clobetasol a 0,05% podem induzir repigmentação da pele, porém há grande risco de provocar lesões na pele, por isto, são usados em áreas localizadas e de forma descontínua (THISSEN & WESTERHOF, 1997).

O tratamento com drogas imunossupressoras pode diminuir o número de linfócitos T cutâneos durante a terapia. Estando correlacionado com a melhora de condições envolvendo componentes autoimunes no vitiligo, esta situação ajuda na terapia (CAVANI *et al.*, 2005).

Medicamentos antioxidantes para pacientes com vitiligo tratados com 2mg de ácido fólico, 500mg de vitamina C e 100mg de vitamina B12 administradas por via intramuscular, obtêm-se resultado com repigmentação significativa, porém isso ocorre após anos de terapia (MONTES *et al.*, 1992).

Diante desta diversidade de teorias para o tratamento do Vitiligo, além de várias alternativas para a terapêutica com resultados diversos, justifica-se o estudo desta planta medicinal de fácil acesso por parte dos indivíduos acometidos. Assim, na medicina tradicional do Vale do Mucuri, os extratos de tubérculos de *Alocasia macrorrhizos* são amplamente utilizados no tratamento do Vitiligo. Torna-se importante considerar o valor potencial desta planta, para a expansão do conhecimento sobre seus princípios ativos em prol do uso seguro deste vegetal pela população.

3.2. *Alocasia macrorrhizos*

Alocasia macrorrhizos é uma planta da família Araceae, apresenta um monóico perene grosso e ereto, rizomatosa crescendo até 5 m de altura, com folhas maciças carregadas em verde, suculenta, pecíolos robustos de 0,6 a 1,8 m de comprimento, nos caules maiores os pecíolos emergem de um tronco com 25 cm de diâmetro, os tubérculos são alongados e curvos medindo 10 a 30 cm em média, suas raízes são finas e múltiplas em torno da base do tronco e ao longo do tubérculo (LIM, 2015).

Além de ser difundida pelo nome de *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don, esta planta tem muitos outros nomes científicos como mostra o quadro 1:

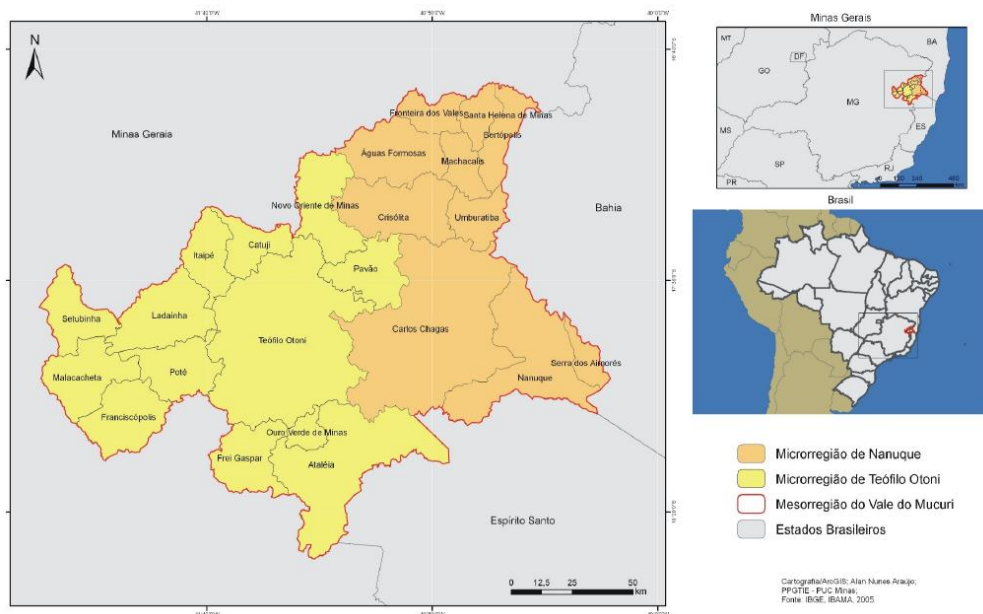
Quadro 1: Sinominia *Alocasia macrorrhizos*.

Sinominia <i>Alocasia macrorrhizos</i>	
<p><i>Alocasia cordifolia</i> (Bory) Cordem <i>A. indica</i> (Lour.) Spach <i>A. indica</i> var. <i>diversifolia</i> Engl. <i>A. indica</i> var. <i>heterophylla</i> Engl. <i>A. indica</i> var. <i>metallica</i> (Schott) Schott <i>A. indica</i> var. <i>rubra</i> (Hassk.) Engl <i>A. indica</i> var. <i>typica</i> Engl. <i>A. indica</i> var. <i>variegata</i> (K.Koch & C.D.Bouché) Engl. <i>A. macrorrhizos</i> var. <i>rubra</i> (Hassk.) Furtado <i>A. macrorrhizos</i> var. <i>variegata</i> (K.Koch & C.D.Bouché) Furtado <i>A. marginata</i> N.E.Br. <i>A. metallica</i> Schott <i>A. montana</i> (Roxb.) Schott <i>A. pallida</i> K.Koch & C.D.Bouché <i>A. rapiformis</i> (Roxb.) Schott <i>A. uhinkii</i> Engl. & K.Krause <i>A. variegata</i> K.Koch & C.D.Bouché</p>	<p><i>Arum montanum</i> Roxb. <i>A. mucronatum</i> Lam. <i>A. peregrinum</i> L. <i>A. rapiforme</i> Roxb.</p>
	<p><i>Caladium macrorrhizon</i> (L.) R.Br. <i>C. metallicum</i> Engl. <i>C. odoratum</i> Lodd. <i>Calla badian</i> Blanco <i>C. maxima</i> Blanco</p>
	<p><i>Colocasia boryi</i> Kunth <i>C. indica</i> (Lour.) Kunth <i>C. indica</i> var. <i>rubra</i> Hassk. <i>C. macrorrhizos</i> (L.) Schott <i>C. montana</i> (Roxb.) Kunth <i>C. mucronata</i> (Lam.) Kunth <i>C. peregrina</i> (L.) Raf. <i>C. rapiformis</i> (Roxb.) Kunth</p>
<p><i>Arum cordifolium</i> Bory <i>A. indicum</i> Lour <i>A. macrorrhizon</i> L.</p>	<p><i>Philodendron peregrinum</i> (L.) Kunth <i>P. punctatum</i> Kunth</p>
	<p><i>Alocasia macrorrhiza</i> (L.) Schott</p>

Alocasia macrorrhizos é uma planta oriunda da Malásia, possui ampla distribuição em várias partes do globo, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais, encontrada também na América do Norte, Central e do Sul, Índias Ocidentais, África tropical e Ilhas Indo-Pacífico (USDA-ARS, 2012).

Segundo Kay (1973) *Alocasia macrorrhizos* se adaptou muito bem no Brasil. Sendo observada em alguns estados brasileiros como Minas Gerais (FIOCURZ, 2009), na região do Vale do Mucuri pontualmente em Teófilo Otoni, onde são reproduzidas suas condições de proliferação.

O município apresentou em seu último levantamento realizado em 2010 o IDHM 0,701 refletindo assim uma população com fortes traços de subdesenvolvimento (IBGE, 2018). O mapa 1 apresenta a localização de Teófilo Otoni, Vale do Mucuri em Minas Gerais, Brasil.



Mapa 1 – Localização do Vale do Mucuri em Minas Gerais, Brasil.
Fonte: IBGE, IBAMA, 2005 – Elaborado por Alan Nunes de Araújo.

A população tem parte da sua ascendência de origens Alemã e Libanesa, mas é da cultura indígena regional que conserva até aos dias atuais os costumes, principalmente no que se refere à utilização de plantas medicinais (chás/extratos e emplastos) no tratamento de patologias, que também é meio de conservação e disseminação do conhecimento.

A *Alocasia macrorrhizos* utilizada na terapêutica do vitiligo, apresenta vários nomes populares como: taioba brava, coió, cocó, taió, tajá, etc. A figura 1 mostra a planta em estudo num ambiente comum de cultivo na periferia da cidade de Teófilo Otoni.

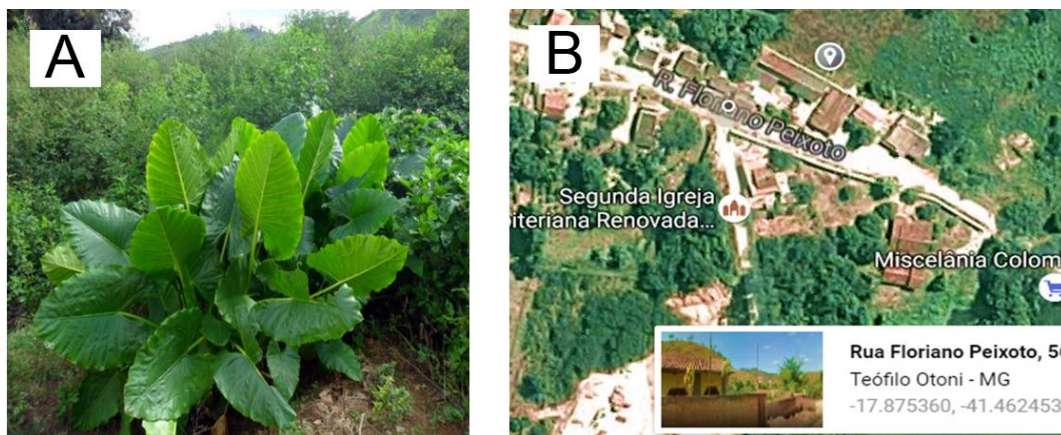


Figura 1- A- *Alocasia macrorrhizos*, B- Localização de coleta da *Alocasia macrorrhizos* Fonte: B= <https://www.google.com.br/maps/place/E.M.+Maria+Ramos/@-17.8763944,-41.4632681,788m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0xb370cab94e0ae7:0xaf200d62ec25cb24!8m2!3d-17.8756796!4d-41.4629006> adaptado.

A espécie em estudo contém flavonoides, glicosídeos citogenéticos, ácido ascórbico, ácido oxálico e Beta lectinas (RAHMAN *et al.*, 2012). Todas as partes da planta em condições *in natura* tem potencial tóxico, sua ingestão pode causar queimação, edema de lábios, boca e língua, náuseas, diarreia, salivação abundante, dificuldade de deglutição e asfixia. O contato com os olhos pode provocar irritação leve em casos graves lesão de córnea. Todas essas características são devido ao oxalato de cálcio, que são cristais abundantes em alguns tipos de Araceae, como no caso da *A. macrorrhizos* (FIOCRUZ, 2009).

Em estudos realizados com extratos aquosos de tubérculos crus de *A. Macrorrhizos* mostrou-se potencial de ação como: antioxidante, anti-hiperglicêmico, anticancer, laxante e diurético, antiinflamatório, analgésico, antimicrobiano, hepatoprotetor, antitrombocítico, antimalarial, hemaglutinante, imunomodulatório, anti-helmíntico e antiprotozoarial (FANG *et al.*, 2012). Rahman e colaboradores (2012) em seus extratos mostrou baixa atividade citotóxica quando em comparação com fármacos de referência para tratamentos de diabetes.

A. macrorrhizos apresenta efeito inibitório contra as enzimas Tripsina / Quimotripsina. Os inibidores responsáveis por esta ação se apresentam em forma de um dímero de dois

monômeros idênticos cada um com leve polimorfismo, sendo fortes candidatos para aferir sua resistência a insetos em plantas (ARGALL *et al.*, 1994).

3.3 Inibidores de Proteases

As proteases são enzimas que promovem a catálise durante a clivagem das ligações peptídicas de proteínas. Essas enzimas subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, de acordo com o sítio onde agem, elas clivam peptídeos terminais ou distais que estão contidos nos substratos, respectivamente (NEURATH, 1986; VALUEVA; MOSOLOV, 2004). Inibidores de proteases são agrupados de acordo com seus mecanismos de reação, origem ou similaridades estruturais (CRAIK, MOSOLOV; VALUEVA, 2008).

Os inibidores de proteases conforme seus mecanismos de ação enquadra-se em dois grupos, que são os inibidores sítio-específicos que tem a capacidade de modificarem de forma irreversível um aminoácido do sítio ativo, e os outros são aqueles que ocorrem naturalmente, onde estes atuam como pseudosubstratos. Os inibidores sintéticos e os inibidores naturais imitam o substrato, e competem no organismo pela mesma ligação com o sítio ativo das proteases (TRAVIS & SALVESEN, 1983; GRIEG *et al.*, 2015).

Inibidor enzimático pode ser considerado qualquer composto capaz de diminuir o efeito de hidrólise de um dado substrato. No entanto, os inibidores de proteases são proteínas com capacidade de formar complexos com enzimas proteolíticas, para promover a inibição da atividade dessas proteases, tais inibidores de proteases são encontrados em plantas, microrganismos e animais. Esses inibidores são moléculas que na sua grande parte tem sua massa molecular variando de 10 kDa a 90 kDa (NEURATH, 1990; CLEMENTE & DO MONEY, 2006).

Na soja são encontrados os inibidores de tripsina do tipo Kunitz (KTI) e os inibidores Bowman-Birk (BBI). Inibidores de serino proteinases classificados como BBI inicialmente foram isolados e caracterizados a partir de grãos de *Glycine max* (Bowman, 1946; Birk, *et al.*, 1963). Os BBI são caracterizados por apresentarem dois domínios dicotiledôneos, que são proteínas de baixo peso molecular pois variam entre 08 e 12 kDa, são caracterizados por possuírem 14 cisteínas formando sete pontes dissulfeto, que resultam na formação de uma

estrutura assimétrica com dois domínios independentes, sendo que um promove a inibição de proteinases como as tripsinas e o outro as quimotripsinas ou elastases, situados nas extremidades da molécula (GARIANI & LEATHERBARROW, 1997).

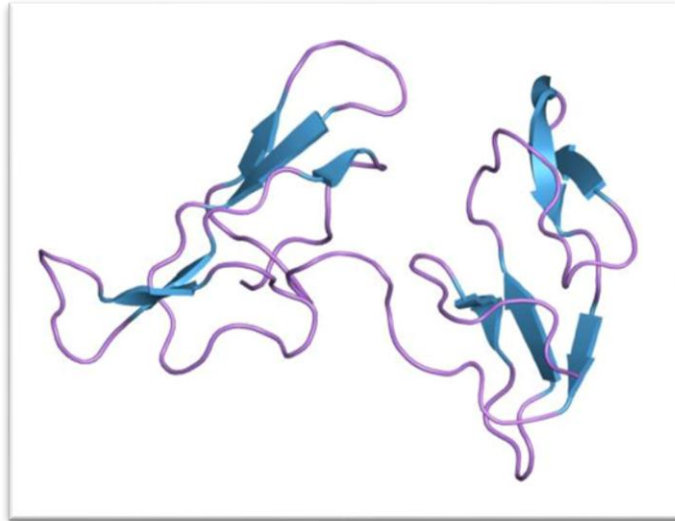


Figura 2: Molécula de Inibidor de Protease da família Bowman-Birk (BBI)
Fonte: <https://goo.gl/images/Azc164>

Segundo Losso (2008) os BBI originários da soja são em geral são compostos por 71 resíduos de aminoácidos, apresentando massa molecular aproximada de 8 kDa. Os inibidores de proteases BBI são caracterizados pela presença de 7 pontes dissulfeto que fazem com que a formação de uma estrutura de forma assimétrica de dois domínios independentes, sendo um deles capaz de promover a inibição da tripsina e o outro domínio promove a atividade inibitória sobre tripsina e também sobre a quimotripsina (Deshimaru et al. 2004).

Dentre os efeitos fisiológicos positivos promovidos pelos BBI, está a supressão de carcinogênese. Os inibidores foram também associados à presença de produtos derivados da soja, apontando para os inibidores de proteases do tipo BBI como sendo importantes participantes neste efeito proteolítico (KENNEDY,1995). Os inibidores BBI demonstram estabilidade e maior resistência, porém os inibidores de proteases do tipo KTI tem a característica de não resistirem ativados quando do contato com o suco gástrico humano. Abaixo ilustração de sua molécula na figura 3.



Figura 3: Molécula de Inibidor de Protease da família tipo Kunitz (KTI)

Fonte: <https://goo.gl/images/vWYDeP>

Os inibidores de proteases representam em torno de 60% do total de proteínas presentes nos grãos de soja (BRANDON et al., 1993), os inibidores de proteases encontrados em seus grãos são Kunitz (KTI) e Bowman-Birk (BBI) inibidores de tripsina (STAHLHUT & HYMOWITZ, 1983). O KTI é responsável por aproximadamente 80% da ação de inibição da atividade trípica (BRANDON et al., 1987).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Levantamentos Etnobotânico e Fitobotânico

Exemplares da planta foram coletados na cidade de Teófilo Otoni – MG e encontra-se depositado no Herbário da UFVJM Campus JK em Diamantina – MG, sua Árvore filogenética está representada - quadro 2.

Quadro 2: Árvore filogenética da *A. macrorrhizos*.

Domínio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Spermatophyta
Subfilo	Angiospermae
Classe	Monocotyledonea
Ordem	Arales
Família	Araceae
Gênero	<i>Alocasia</i>
Espécie	<i>Alocasia macrorrhizos</i>

4.2. Preparo da Farinha à base de *A. macrorrhizos*

Para o preparo da farinha coletou-se o tubérculo da *A. macrorrhizos*, o qual foi cortado em fatias de aproximadamente dois cm de espessura, submetidas a temperatura de 80°C em estufa, e moídos em moinho caseiro. O material processado foi armazenado à - 20° C para posterior análise e produção de extratos (Figura 2).

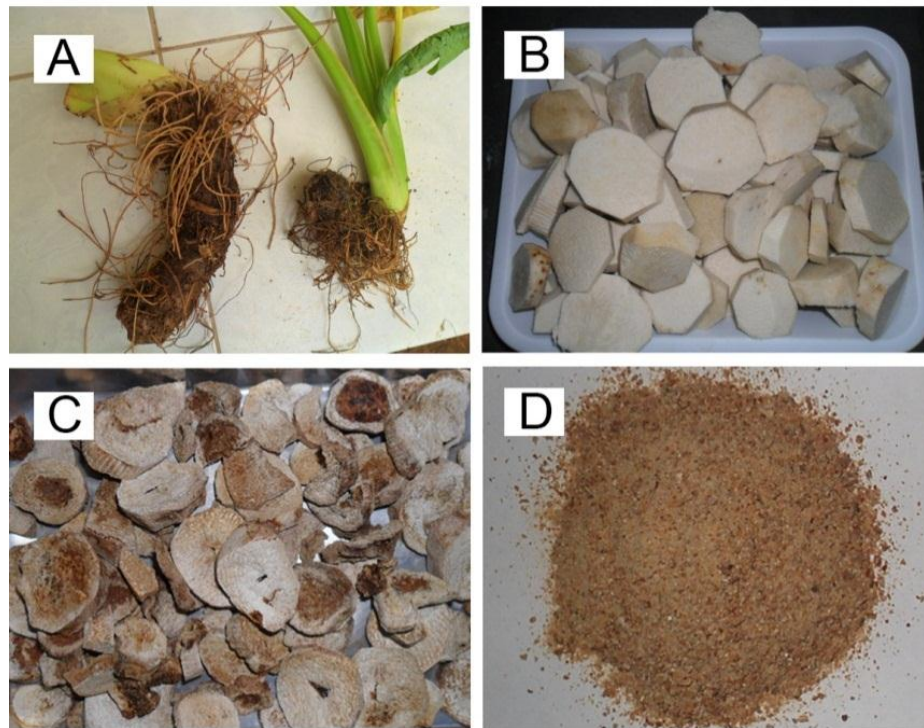


Figura 4 - A - Tubérculos de *A. macrorrhizos*. B Lâminas de Tubérculos de *A. macrorrhizos* com 2cm de espessura crus. C - Lâminas de Tubérculos de *A. macrorrhizos* com 2cm de espessura, torradas a 80° C. D - Farinha a partir da torrefação e moagem dos tubérculos de *A. macrorrhizos*.

4.3. Obtenção de Extrato Aquoso

Para o preparo de extrato aquoso adotou-se o método descrito por Ferris e Zeng (1999), com adaptações para este trabalho. Para cada uma das amostras da planta foi realizado dois tipos de extratos aquosos, um de tubérculos torrados (RT) e outro cru (RC). O extrato foi preparado usando 800 mL de água destilada/200 g de amostra triturada em liquidificador (tubérculo cru) e moído (tubérculo torrado) ambos foram homogeneizados e deixados em “over night” (por 24h) refrigerados à -20° C ao abrigo da luz. Após 24 horas, foram filtrados com gaze, papel de filtro e realizou-se a filtração dos extratos a vácuo.

A figura 5 apresenta um organograma com a sequência dos procedimentos de produção de extratos e análises a serem realizadas.

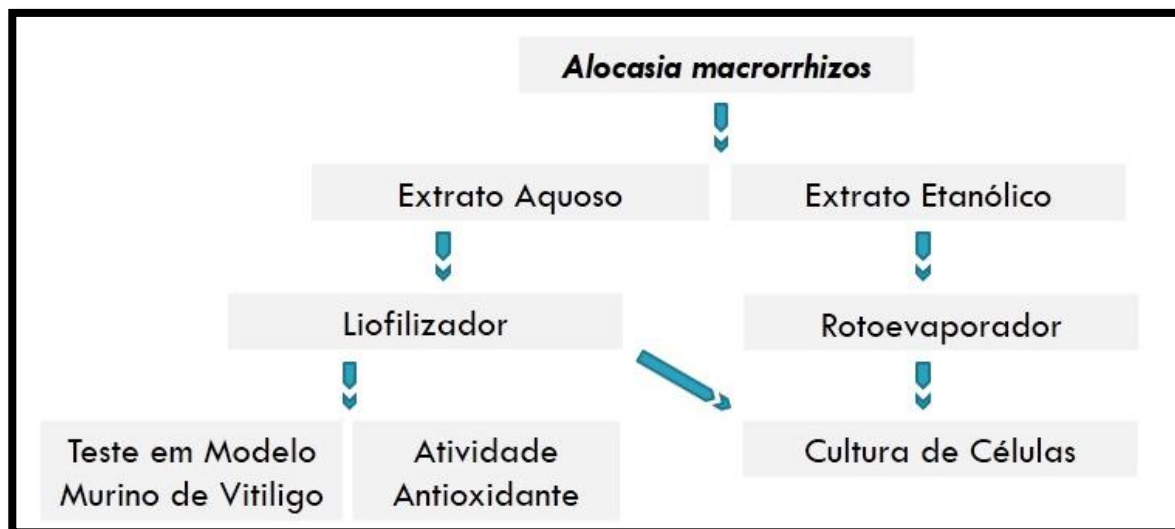


Figura 5 – Organograma de produção de extratos e ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*”.

4.4. Extrações de inibidores de proteases

Para realizar a detecção e extração de inibidores de proteases, baseou-se no trabalho de Yavelow *et al.* (1985) onde a extração de concentrados inibidores de proteases do tipo BBI (Bowman-Birk) da soja estavam descritos. Os tubérculos da planta foram selecionadas e trituradas em um liquidificador, e delipidadas com 10 volumes de acetona P.A., as proteínas foram extraídas acrescentando-se 10% p/v de etanol a 60%, aquecidos à 55°C com agitação constante por 1 hora. Após este período, o material foi filtrado em gaze, e acidificado, pH 5,3. O filtrado foi precipitado por dois volumes de acetona, em seguida centrifugou-se a 4.724 x g por 30 minutos, desprezou-se toda a porção líquida e o precipitado resultante foi ressuscitado em água destilada p/v e armazenado à - 80°C.

A figura 6 apresenta um organograma com a sequência dos procedimentos de produção de extratos isolados e purificados de inibidores de proteases e análises a serem realizadas.

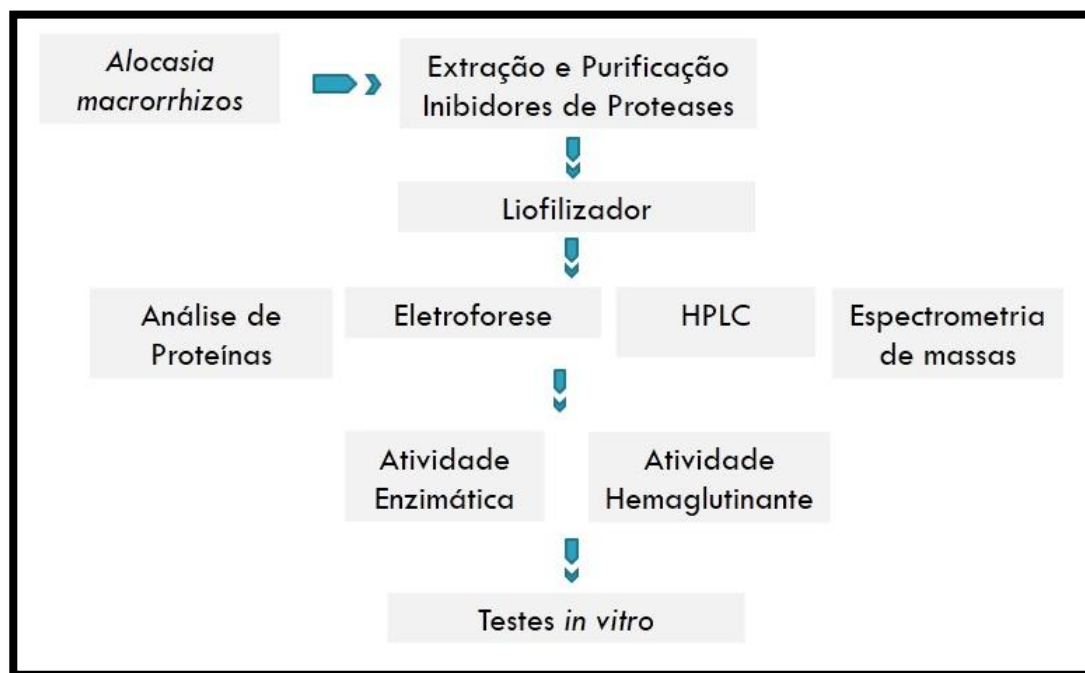


Figura 6 – Organograma de produção de extratos isolados e purificados de inibidores de proteases para ensaio “*in vitro*”.

4.5. Análise proteína

As dosagens de proteínas foram determinadas pelos métodos colorimétricos utilizando os reagentes de Bradford (1976) na adsorção do reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250*, utilizando soro albumina bovina (BSA) (BSA: *Merck*), em soluções de 20 a 160 mg/mL para obtenção da curva-padrão, como padrão analítico na concentração de 1 mg/mL. As amostras foram centrifugadas a 4.724 x g por 30 segundos, e foram utilizados 30 µL do sobrenadante transferidos para um eppendorf, adicionou-se 100 µL de água destilada e 1 mL de solução de Bradford, homogeneizou-se, deixando em repouso por 30 minutos e na sequência procedeu-se a leitura de quantificação proteica, realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 485 nanômetros.

4.6. Eletroforese 12% SDS-PAGE

As amostras provenientes dos procedimentos utilizados para realizar a purificação dos inibidores de protease foram identificadas e caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os suportes eletroforéticos foram géis de poliacrilamida de separação a 12%, preparados em condições desnaturantes (com duodecilsulfato de sódio ou SDS), segundo método de Laemmli (1970) também adaptado.

Utilizou-se Tris-(hidroximetilamino)-metano, 1,5M pH 8,8 no gel de separação e o mesmo agente tamponante a 0,5M pH 6,8 no gel de concentração. Os volumes da mistura acrilamida e bis-acrilamida 30:1.

As partes da planta foram selecionadas e trituradas em um liquidificador, e delipidadas com 10 volumes de acetona P.A. As proteínas foram extraídas acrescentando-se 10% p/v de etanol a 60% à 55°C com agitação constante por 1 hora. Após o período de extração, o material foi filtrado em gaze, e acidificado com HCl (pH 5,3). O filtrado será precipitado por 2 volumes de acetona e centrifugar-se-á a 4724 x g por 30 minutos, o mesmo precipitado resultante será ressuspendido em água destilada e armazenado à - 80° C.

4.7. Varredura UV/VISÍVEL

Os sobrenadantes dos extratos proteicos foram diluídos (10x, 100x, 1000x) em água destilada para realização de uma varredura de comprimento de onda em espectrofotômetro (UV-Vis Cary 50), para a identificação do melhor comprimento de onda para absorção. Os dados foram gerados pelo *software Scan* versão 3.0 (Interscience).

4.8. Detecção de inibidores de proteases por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As diferentes diluições das amostras foram submetidas a varredura de comprimento de onda em espectrofotômetro de 200 a 700 nm e na sequência foi realizada a cromatografia de fase reversa em coluna LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) (Supelcosil, Sigma-Aldrich), em sistema de

HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) modelo ProStar (Varian) utilizando o *software* Galaxie e os dados foram analisados no programa Prisma 6.0.

A coluna foi previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,08% em água (H₂O) (solvente A) e eluída em um gradiente de 0 a 100% do solvente acetonitrila (ACN) + TFA 0,08% (solvente B), sob um fluxo de 0,8 mL/min durante 45 minutos. A eluição foi monitorada entre 190 e 300 nm.

Após a coluna ter sido equilibrada as amostras diluídas e filtradas foram submetidas a corrida no HPLC com a injeção de 20 µL sob a condição cromatográfica para análise da pureza com a Fase móvel de A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%; eluição por gradiente: 0 a 100% de B em 45 minutos.

4.9. Atividade inibitória anti-tripsina

A determinação da atividade anti-tripsina foi realizada de acordo com Kumar et al. (2002). O substrato utilizado foi o cloridrato de N- α -benzoil-DL-arginil-pnitroanilida (DL-BApNA), preparado dissolvendo 196 mg do composto em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) para uma concentração final de 9×10^{-2} M. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1M contendo CaCl₂ 20 mM pH 8,1 para a concentração de 9×10^{-4} M.

Para obter um título que inibe entre 40 e 60% da atividade da tripsina, foram realizadas diluições seriadas do inibidor. A cada tubo de ensaio se adicionou 200 µL de DL-BApNA, 20 µL de tripsina a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20 µL do inibidor. Nos tubos brancos foram adicionados 200 µL de substrato e 40 µL de água, enquanto que os tubos controles de atividade enzimática continuaram com 200 µL de substrato, 20 µL de enzima e 20 µL de água.

Os tubos de reação passaram por agitação em vórtex e foram posteriormente incubados em banho-maria a 37°C por aproximadamente 40 minutos. A reação foi interrompida com 40 µL de ácido acético 60% v/v e adicionado 250 µL de água destilada. A quantificação da atividade inibitória foi realizada pela medida da absorbância a 450 nm (EZ Read 200, Biochrom) em espectrofotômetro.

4.10. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 20 mg/mL, de forma a apresentar absorvância em 517 nm. As determinações foram realizadas adicionando-se em cada cavidade da microplaca 250 µL da solução de DPPH e 40 µL de metanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções padrão (BHA, BHT, ácido ascórbico, ácido clorogênico e quercetina) e extratos das amostras. As leituras das absorvâncias foram realizadas após 25 min de reação em espectrofotômetro de microplaca com incubação a 25°C. As análises foram realizadas em triplicatas. O decaimento da absorvância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorvância do controle (Ac) resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL).

4.11. Atividade hemaglutinante

Para o ensaio de hemaglutinação foram utilizados 2 ml de sangue “A+” diluídos em 8 ml de PBS, logo após foram centrifugados durante 5 minutos a 924 xg, repetiu-se este processo por 4 vezes lavando os eritrócitos e restando após a retirada do soro uma massa de eritrócitos íntegros e livres de material hemolizado. Em seguida os testes foram realizados por meio de diluição seriada das amostras teste (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) em placa de ELISA. No primeiro poço foram adicionados 100 µL da amostra, e nos demais além de 100 µL de PBS, foram diluídos 100 µL de amostra dando início à diluição seriada. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora, O grau de aglutinação foi observado visualmente e o título expresso em Unidades de Hemaglutinação (U.H.), que foi definido como inverso da maior diluição da amostra que tenha apresentado nítida aglutinação (MOREIRA & PERRONE, 1977).

4.12. Caracterização de Inibidores de Proteases por Espectrometria de Massas MALDI-TOF

A massa molecular dos componentes proteicos do extrato de *A.macrorrhizos* foi analisada utilizando o espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF AutoFlex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) operando no modo refletido com polaridade positiva, utilizando calibração externa e controlado pelo software FlexControl™. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra diluída em H₂O deionizada/TFA 0,1% e 0,5 µL de solução saturada de matriz αCHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) em uma placa do tipo AnchorChip™ 600/384 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Os resultados da espectrometria foram obtidos na forma da razão massa/carga (m/z) para cada amostra e a análise do conjunto de dados adquirido, foi feita com o auxílio do programa FlexAnalysis 3.3. O aparelho foi calibrado com padrões externos (Peptide Calibration Standard - Bruker Daltonics).

4.13. Cultura de células e Linhagem celular RAW 264.7

As células RAW264.7 (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100 µg/mL de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino, mantido a 37 °C em 5% de CO₂. Os macrófagos foram cultivados por 48 horas na presença ou ausência dos inibidores ou dos extratos nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml e 10, 50 e 200 µg/ml respectivamente. Para a dosagem de óxido nítrico as células RAW264.7, tratadas ou não, foram estimuladas com LPS (1µg/mL) e IFN-γ (0,9 ng/mL). Para controle, as seguintes culturas foram realizadas: células estimuladas sem os tratamentos, células não estimuladas na presença dos tratamentos e células não estimuladas na presença de DMSO 1%.

4.13.1. Viabilidade Celular

A viabilidade celular dos extratos foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante Metil Tiazol Tetrazólio - Sigma, St. Louis, MO, USA). Após 48 horas de cultura os

sobrenadantes foram retirados e adicionados 100 μ L de RPMI e 10 μ L de MTT (5mg/mL) em todos os poços. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 4 horas o sobrenadante foi retirado acrescentando 100 μ L de DMSO em cada poço. A absorbância foi lida a 560 nm e a viabilidade (%) obtida pela fórmula $((X1/X2)*100)$, considerando X1 e X2 a média da OD (560nm em EZ Read 200, Biochrom) nos poços de células tratadas e células não tratadas, respectivamente. A figura 7 ilustra a metodologia de cultura de células.

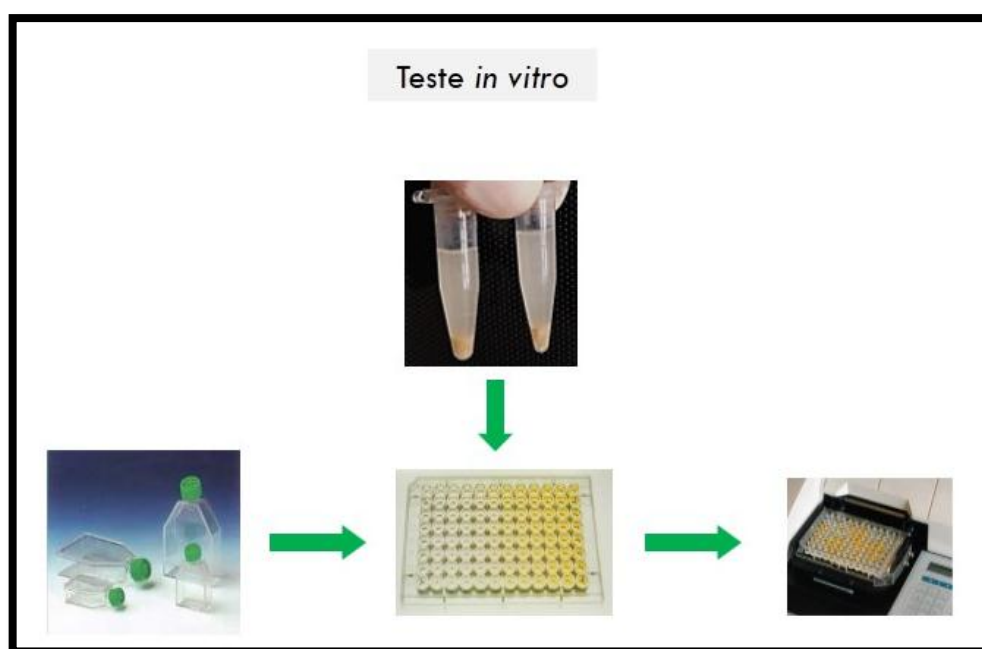


Figura 7 – Organograma ilustrativo de ensaio “*in vitro*”.

4.13.2. Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO)

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess, no sobrenadante de 48 horas de cultura. Para realização do teste 100 μ L de sobrenadante de cada poço da cultura estimulada foram transferidos para placas de 96 poços, acrescentando igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 5% H₃PO₄, Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração de NO foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. A absorbância medida a 540nm (EZ Read 200, Biochrom).

4.13.3. Determinação da produção citocinas TNF- α

A determinação dos níveis de citocinas foi realizada através de kit de ensaio de imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (Ready-Set-Go®, eBioscience). Os anticorpos de captura respectivos para TNF- α foi diluídos para a concentração de uso de acordo com o fabricante do Kit, adicionados 100 μ L/poço em placa de 96 poços e incubados *overnight*. Após incubação, os poços foram lavados (o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados três vezes com 400 μ L/poço de tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween) e a placa esgotada sobre papel toalha, adicionado 300 μ L de tampão de bloqueio (PBS, 1% BSA, 5% Sacarose, 0,05 mM NaNO₃) e incubado por 1 h. A placa foi lavada (como descrito anteriormente) e as amostras (100 μ L) foram incubadas. Após 2 h, a placa foi lavada e adicionada 100 μ L de streptavidina diluída (1:200) em PBS + 1% de BSA em cada poço e incubado por 20 min no escuro. A placa foi lavada, incubada por 20 min no escuro com 100 μ L/poço de solução substrato (TMB + H₂O₂). A reação foi encerrada com a adição de 50 μ L da solução de parada (H₂SO₄ 2 N). A densidade óptica foi determinada a 450 nm e a quantificação de citocinas foi determinada em relação a curva padrão.

4.14. Animais

Para a indução do vitiligo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos, com 4-6 semanas provenientes do Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais-UFGM. OS animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina do Campus Mucuri- UFVJM em estantes ventiladas (25°C) e dieta *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido a avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFVJM-Mucuri. O projeto só foi realizado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Amais (protocolo nº 02/2016).

4.14.1. Indução do modelo Murino de Vitiligo com Hidroquinona e tratamento com extrato de *Alocasia macrorrhizos*

Para a indução do vitiligo foi utilizado hidroquinona na concentração de 2,5% durante 30 dias e do 31º até ao final do experimento, induziu-se por mais 60 dias na concentração de 5%, fazendo assim uma adaptação à técnica utilizada por HUO e colaboradores (2014). Os animais foram induzidos ao vitiligo por administração tópica, em uma área de 2x2 cm do dorso dos animais previamente raspada. A diluição de hidroquinona foi aplicada, uma vez ao dia durante 90 dias. A partir do 61º dia os animais receberam tratamento pelo extrato aquoso a partir de tubérculos torrados que contém em seu composto natural inibidores de protease, a partir de tubérculos de *Alocasia macrorrhizos*, por gavagem, uma vez ao dia durante 30 dias, numa dosagem de 100 mg/kg. O tratamento iniciou-se no 61º dia, onde foi necessária a confirmação da doença nos animais, e esta foi observada pela despigmentação dos pelos do dorso dos mesmos. No 90º dia os animais foram eutanasiados e foram então coletados os materiais biológicos para análise.

Os 26 animais utilizados para este experimento, estavam divididos em 3 grupos, sendo controle negativo, grupo de induzidos com hidroquinona e grupo induzidos com hidroquinona e tratados com extrato aquoso a partir de tubérculos torrados de *A. macrorrhizos* (Figura 8).

Para controle negativo foi utilizado um grupo de animais não induzidos e que não recebeu nenhum tratamento, dois grupos induzidos com Hidroquinona, e após 60 dias de indução um grupo induzido foi tratado. Este grupo controle é necessário para a análise dos parâmetros imunológicos e acompanhamento da evolução do modelo.



Figura 8 - Grupos de camundongos submetidos a indução de Vitiligo e tratamento com extratos.

Após a indução do modelo murino de vitiligo os animais foram tratados com extrato de *Alocasia macrorrhizos*, como apresenta a figura 9.



Figura 9 – Metodologia de tratamento dos animais com extrato via gavagem.

4.14.2. Determinação do escore e disseminação de vitiligo

A extensão da despigmentação para o tratamento dos grupos foi quantificada de maneira “cega” por avaliadores. Foram examinados os locais de aplicação e a extensão da despigmentação (estimada como porcentagem de locais anatômicos, nos quais surgiu despigmentação). O escore de despigmentação (0 = não despigmentado, 1 = manchas de despigmentação com menos de 1mm de diâmetro de despigmentação, 2 = manchas com mais 1mm de diâmetro e 3 = manchas acima de 5 mm) foi definido como a soma dos escores de cada animal/avaliador

5. Estudos Histopatológicos

A análise histopatológica da pele foi realizada com amostras removidas das porções torácica e lombar, foram fixadas por imersão em solução de formol tamponado a 10%.

Para a inclusão do tecido em parafina as amostras do tecido passaram por desidratação, onde o mesmo foi imerso em álcool nas concentrações de 50%, 70%, 85%, 95% por uma hora e em 100% por três vezes em vasilhames diferentes bem como seus álcoois, na sequência o mesmo em três banhos de Xilol uma hora para cada banho. Após esse procedimento procedeu-se três banhos em parafina derretida a uma temperatura de 56° a 58°C

de onde se retirou a amostra e transferiu-a para o molde deixando esfriar em temperatura ambiente.

Para a obtenção dos cortes histológicos e confecção da lâminas foi utilizado o micrótomo, onde as amostras inclusas em blocos de parafina foram cortados em uma espessura de 5 μm , após o corte a amostra foi levada ao banho-maria a uma temperatura de 37°C, em seguida a amostra foi transferida para lâminas e levadas a estufa onde permanência por 30 minutos a 37°C.

A coloração das Lâminas foi feita pela técnica de Hematoxilina Eosina (HE) kit rápido Panótipo e também por Fantona Masson Kit Easy Path.

Após a coloração foi realizado o exame microscópico detalhado das amostras de pele em lâminas dos 3 grupos, sendo duas lâminas por animal, uma de amostra de pele lombar e a outra com amostra de pele torácica. A qualificação da lesão foi quantificada pela espessura da camada celular epidérmica dos animais, nas porções lombar e torácicas, e a produção de melanina mensurada pela presença de melanina nos cortes histológicos, como ilustrado no organograma da figura 10.



Figura 10 – Metodologia de tratamento dos animais com extrato via gavagem.

5.1. Determinação da despigmentação da derme

No primeiro e no último dia de indução e tratamento, foram feitas fotografias para se comparar externamente a despigmentação. Áreas predeterminadas foram analisadas para cada animal. Os resultados foram expressos como despigmentação da derme.

5.2. Coloração de Fontana-Masson.

Secções histológicas da pele do dorso foram desparafinizadas e hidratadas em banhos sucessivos de xileno e etanol e corados com Fontana-Masson. As amostras foram embebidas em solução de nitrato de prata por 1 h a 56 °C e lavadas com água destilada. Na sequência os cortes foram submetidos à solução de cloreto de ouro por 10 minutos e lavados em água destilada, depois reduzidos em solução de tiosulfato de sódio 5% por 5 minutos e lavado com água destilada. Por fim, os cortes foram mergulhados em solução de *fast red* por 5 minutos, enxaguados com água destilada e então desidratados. Os cortes foram montados com Bálsamo do Canadá e cobertos com lamínula. Vários campos foram *scaneados* e a marcação específica para melanina avaliada.

6. Análise Estatística

Os resultados apresentados serão representativos da média \pm erro-padrão de três experimentos independentes. As significâncias entre os grupos de resultados foram analisadas utilizando Student's t-test, teste não paramétrico de Mann-Whitney ou Twoway ANOVA (GraphPad Prism 6.00). As diferenças serão consideradas significantes para $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Levantamento etnobotânico

Após o levantamento etnobotânico a planta foi identificada como *Alocasia macrorrhizos*, e depositada no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili da UFVJM Campus JK em Diamantina-MG sob o registro de nº HDJF3335 (Figura 11).



Figura 11 - Exsicata de *A. macrorrhizos*

A espécie estudada apresentou rizomas, folhas com mais de 50 cm, cor verde, peciolo com aproximadamente 80 cm de comprimento, troncos eretos medindo 1 metro, 20 cm de diâmetro, tubérculos alongados e curvos medindo 30 cm, com raízes finas e múltiplas. Estudos de Lim (2015) mostram resultados similares para a mesma espécie. A planta é encontrada em vários ambientes da zona urbana e rural de Teófilo Otoni. Kay (1973) mostra em seus relatos a ocorrência da mesma espécie no Brasil, em Minas Gerais, devido à replicação das condições climáticas semelhantes às de suas origens da Malásia (USDA-ARS, 2012).

7.2. Quantificação de Proteínas

O gráfico 1 apresenta a quantificação de proteínas nos extratos de inibidores de proteases dos grãos de *Glycine max* e extratos de inibidores purificados de tubérculos de *A. macrorrhizos* cru e torrado.

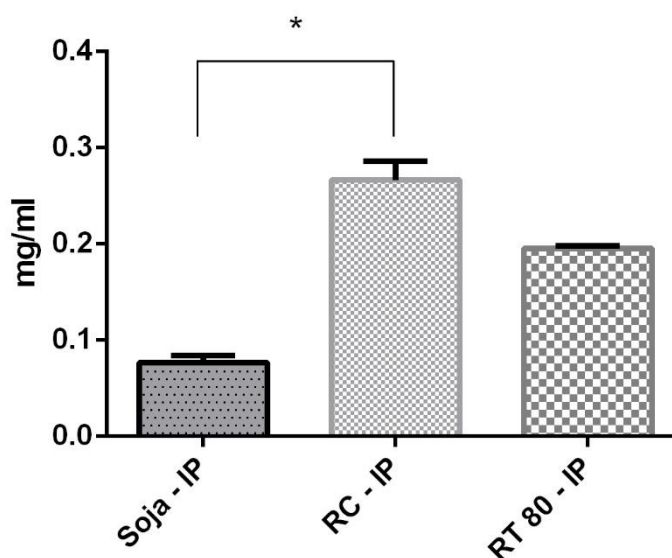


Gráfico 1 - Gráfico de análise de proteínas a partir de inibidores de proteases isolados e purificados, onde: Soja - IP = Inibidores de protease de grãos da *Glycine max*; RC - IP = Inibidores de proteases de tubérculo cru; RT80 - IP = Inibidores de proteases de tubérculo torrado a 80°C. * $p < 0,05$.

Os extratos purificados de inibidores de proteases de *A. macrorrhizos* de tubérculo cru – RC-IP é significativamente superior em comparação com a *Glycine max* – Soja-IP, o mesmo, não se observa quando compara-se com os inibidores do tubérculo torrado - RT80 – IP. A diferença encontrada entre as amostras crua e torrada de *A. macrorrhizos* pode ser explicada pelo aquecimento, quando a amostra vegetal é submetida a temperatura acima de 60°C as proteínas iniciam processo de desnaturação (ARAÚJO, 1999). A eficácia da metodologia adaptada de Carli e colaboradores (2012) para a extração de proteínas pode ser comprovada pela quantidade de proteínas obtidas. Os resultados obtidos por Nayak e colaboradores (2002) nos tubérculos de *A. macrorrhizos* demonstra o isolamento rápido de proteína vegetal em sua forma purificada. Colares e colaboradores (2017) também utilizaram a *Glycine max* como padrão de comparação proteica em seus estudos.

7.3. Detecção de inibidores de proteases por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 12% SDS-PAGE

A partir dos dados de análise de proteínas contidos nos extratos purificados de inibidores de proteases presentes nos tubérculos de *A. macrorrhizos*, as amostras foram submetidas à detecção em Gel de Poliacrilamida a 12%. Observou-se bandas com massas moleculares de 11 e 24 kDa. Na análise do extrato a base de *Glycine max* grão foram encontradas as bandas de massa molecular de 11, 24 e 53 kDa (Figura 12).

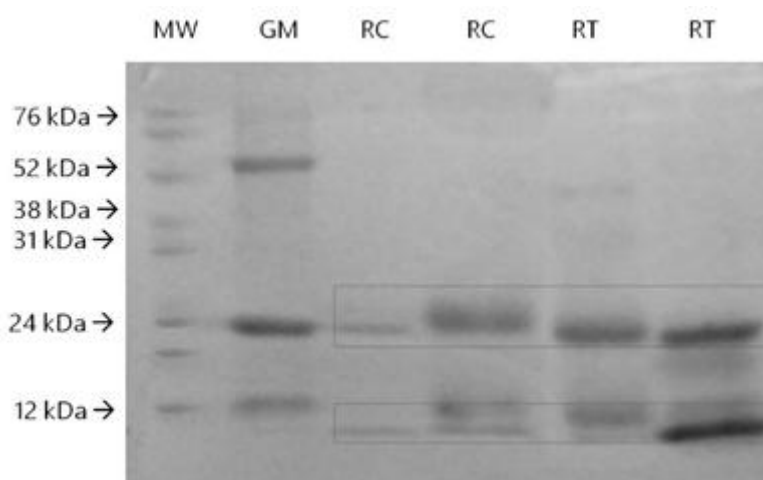


Figura 12 - Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) dos extratos a base de tubérculos crus e torrados de *Alocasia macrorrhizos*. Legenda: MW: Peso Molecular de 10 a 250 kDa; GM: extrato a base de *G. max* grão; RC: extrato a base de tubérculos crus de *A. macrorrhizos*; RT: extrato a base de tubérculos torrados de *A. macrorrhizos*. Foram aplicados em cada poço, 20 µl de amostra. O Gel foi corado com *Coomassie Blue*.

Segundo Backes (2011) e Lim (2015) as bandas de 8 a 11 kDa observadas em extratos de inibidores purificados de soja são da família Bowman-Birk (BBI), que apresenta especificidade para inibir tripsina e quimotripsina. A *Glycine max* possui ampla distribuição de inibidores de proteases do tipo Kunitz e lectinas em suas sementes, as mesmas são resistentes ao tratamento térmico, não sendo a temperatura de aquecimento suficiente para desnaturá-las o que torna sua presença esperada no gel de poliacrilamida (LEAL, 2010).

Os resultados obtidos para *A. macrorrhizos* podem sugerir que a banda de 11 kDa encontrada poderia ser de inibidor de tripsina e quimotripsina, este corrobora com Wang e NG (2002) que demonstra em seus estudos anti-fúngicos da espécie *A. macrorrhizos* uma banda de massa molecular de 11 kDa em gel de poliacrilamida e gel de filtração. Além disso, as bandas com massa molecular 21 kDa, estudados por Bijina e colaboradores (2010), Oliveira

(2007) e Chevreui e colaboradores (2014) indicam a presença de inibidores de proteases compatíveis com inibidores do tipo kunitz. Palayam e colaboradores (2018) purificaram e caracterizaram em tubérculos de *A. macrorrhizos* o inibidor multifuncional kunitz utilizado em suas pesquisas no tratamento do vírus da dengue, visto que este inibidor apresenta notável estabilidade estrutural e funcional mesmo em alta temperatura.

7.4. Análise ultravioleta – UV/vis

A partir do resultado satisfatório para a detecção de inibidores de proteases os mesmos foram submetidos a uma varredura de comprimento de onda, a fim de identificar a melhor absorção dos inibidores de proteases presentes nos extratos, para posteriormente ser realizada a purificação em cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de HPLC.

A varredura detectou o valor de 262 nm para o extrato de *A. macrorrhizos*. (gráfico 2).

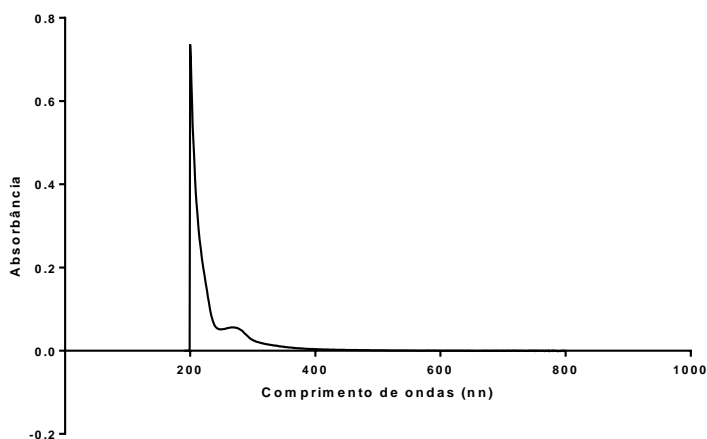


Gráfico 2 - Espectro de absorção molecular de inibidores de proteases do extrato a base de tubérculos de *A. macrorrhizos* em espectrofotômetro. A amostra apresentou uma curva analítica de absorção em 262 nm.

O extrato enriquecido de *Glycine max* também passou pela varredura de comprimento de onda e posteriormente por purificação em sistema de HPLC, por estar sendo utilizado como padrão de comparação para inibidores de proteases, uma vez que já se tem conhecimento da presença dos mesmos em soja (LEAL, 2010; CLEMENTE *et al.*, 2010). O pico do espectro de absorção identificado é característico da absorção de inibidores de proteases (DONATO, 2010). Tendo em vista que a interação da luz com a matéria depende da

estrutura química dos compostos, esse resultado permite verificar qual a faixa de comprimento de onda apresenta maior afinidade de absorção. A sensibilidade desse método auxilia na escolha do melhor comprimento de onda para detectar compostos mesmo em menores concentrações em equipamento HPLC (ROCHA, 2004).

7.5. Detecção de inibidores de proteases por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

A cromatografia realizada com inibidores de proteases isolados e purificados a base de tubérculos torrados de *A. macrorrhizos* representada no cromatograma, detectou dois picos assimétricos e destacados (*) com tempos de retenção em 12 e 13 minutos (Gráfico 3).

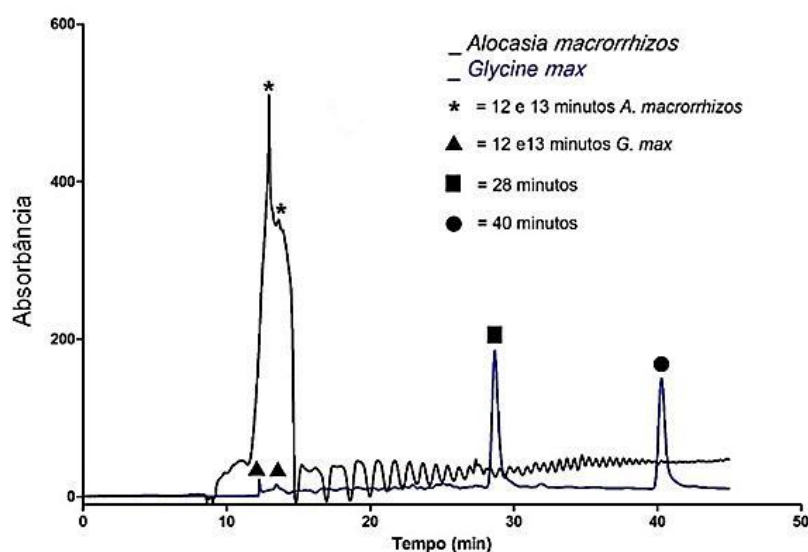


Gráfico 3 - Cromatograma de inibidores de protease isolados e purificados a base de tubérculos torrados de *Alocasia macrorrhizos* e grãos de *Glycine max*. Condições cromatográficas: Coluna utilizada C18 (25 cm x 4,6 mm) Vydac 218TP. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 30 minutos; fluxo: 0,8 mL min⁻¹ em uma absorbância de 260 a 500 nm.

O perfil cromatográfico do extrato de inibidores de proteases de grãos de *G. max* como padrão de comparação, mostra tempos de retenção de 12 e 13 minutos e outros dois picos em 28 e 40 minutos, assim como descrito para as leguminosas (MACEDO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2002). O pico em torno de 28 minutos possivelmente representa lectinas como já caracterizado por Leal (2010) em sementes de soja.

WANG e NG, (2005) visando analisar a atividade antifúngica com inibidores de proteases de *A. macrorrhizos* mostra em coluna de filtração SP1 a presença de picos com tempo de retenção corroborando com o presente estudo.

Kim e colaboradores (2005) isolaram e purificaram inibidores de tripsina e quimotripsina de tubérculos de batata por HPLC, avaliando a atividade antimicrobiana.

7.6. Identificação dos inibidores de proteases por Espectrometria de Massas LCMS-IT-TOF do tipo electrospray.

O extrato enriquecido à base de tubérculos de *A. macrorrhizos* foi submetido à Espectrometria de Massas do tipo MALDI-ToF. (Figuras 13 e 14).

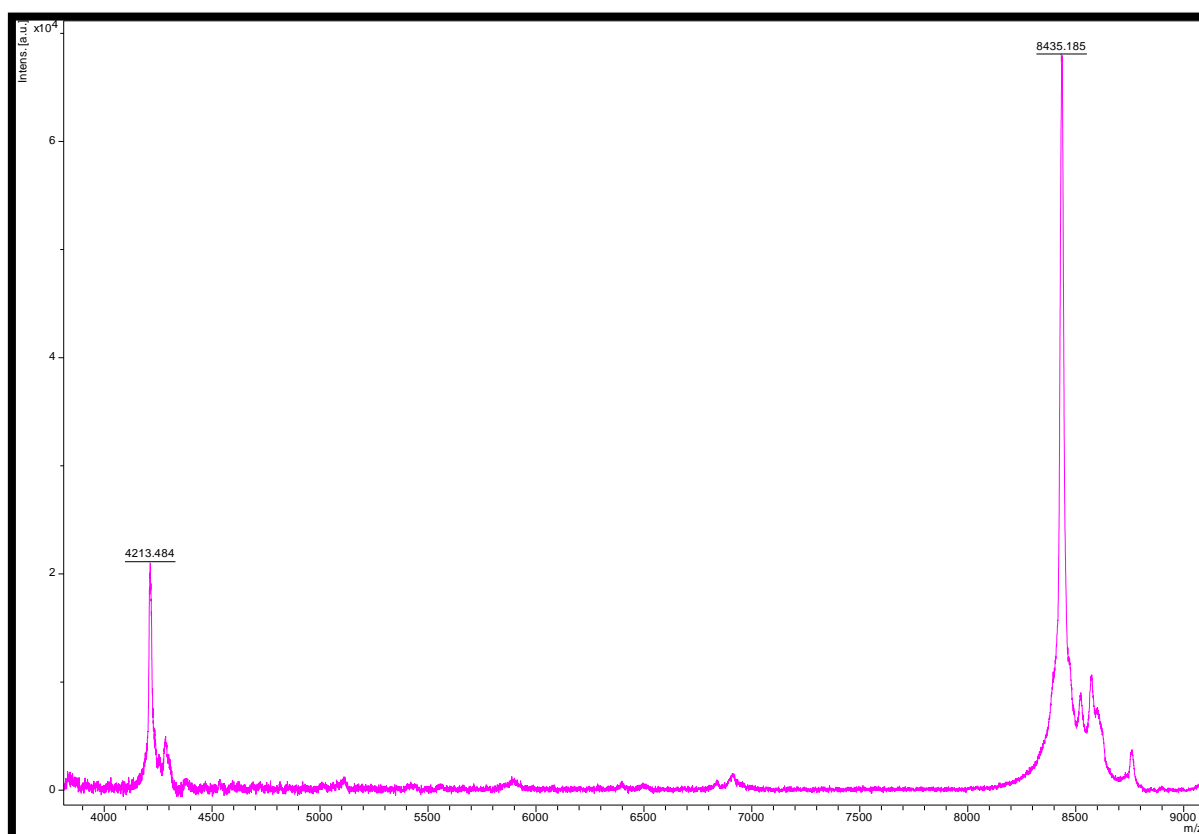


Figura 13 - Espectro de massas MALDI-ToF do extrato enriquecido de inibidores de proteases de tubérculo cru de *A. macrorrhizos*. Os dois picos principais mostrados no espectro (4213.484) e (8435.185) apresentam carga 2+ e 6+.

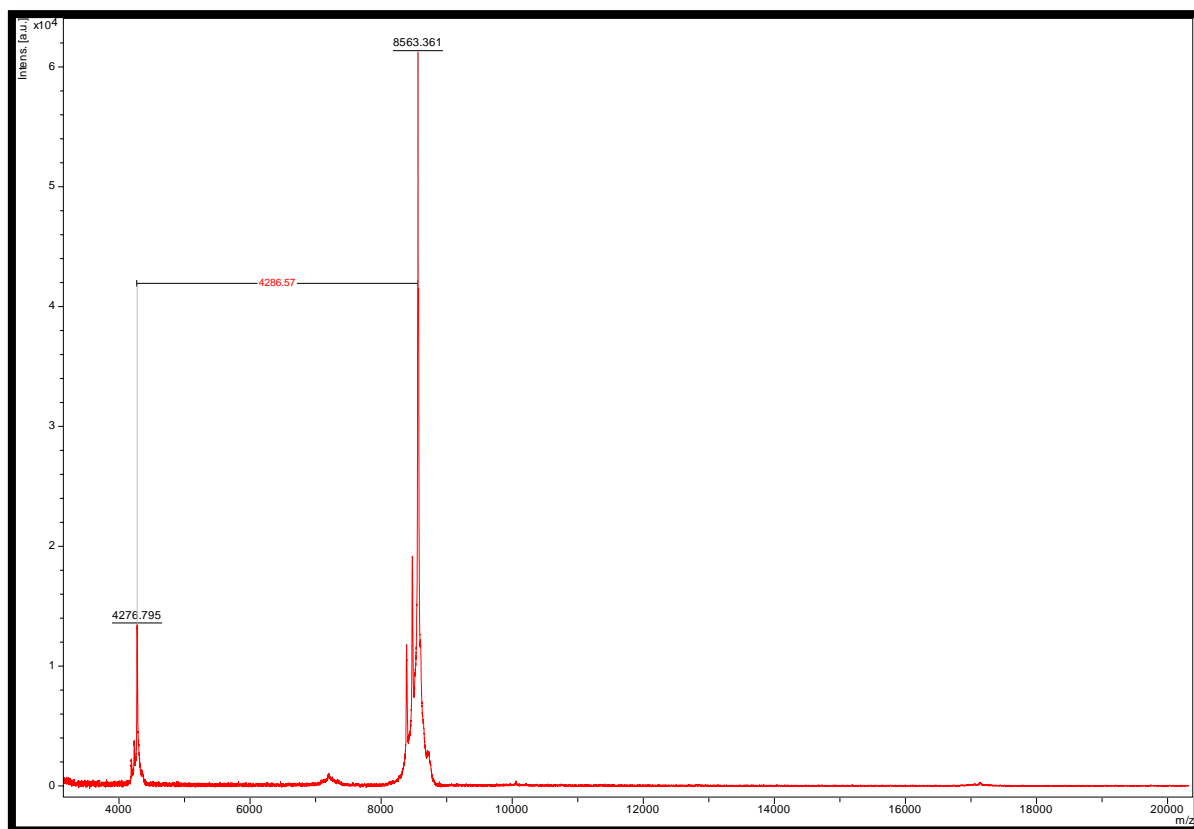


Figura 14: Espectro de massas MALDI-ToF do extrato enriquecido de inibidores de proteases de tubérculo torrado de *A. macrorrhizos*. Os dois picos principais mostrados no espectro (4276.795) e (8563.361) apresentam carga 2+ e 6+.

A análise de espectrometria de massas do material purificado detectou um íon mais intenso de m/z (4213.484) e (8435.185) no tubérculo cru figura 7. Puderam ser observados também íons com m/z 4276.795 e 8563.361 no tubérculo torrado figura 8. Resultado este condizente para inibidores de tripsina (Mukherjee et. *al.*, 2014), os resultados mostrados acima sugerem que os procedimentos utilizados para purificação dos inibidores de proteases foram bem sucedidos.

7.7. Atividade Enzimática

O potencial de atividade inibitória de tripsina foi testado com inibidores de proteases de *G. max*, e tubérculos cru e torrado de *A. macrorrhizos* que estão dispostos no Gráfico 4 “A”, “B” e “C”. Os resultados obtidos mostraram uma inibição significativa na atividade de tripsina para os inibidores de protease de *G. max*, e tubérculos cru e torrado de *A. macrorrhizos*.

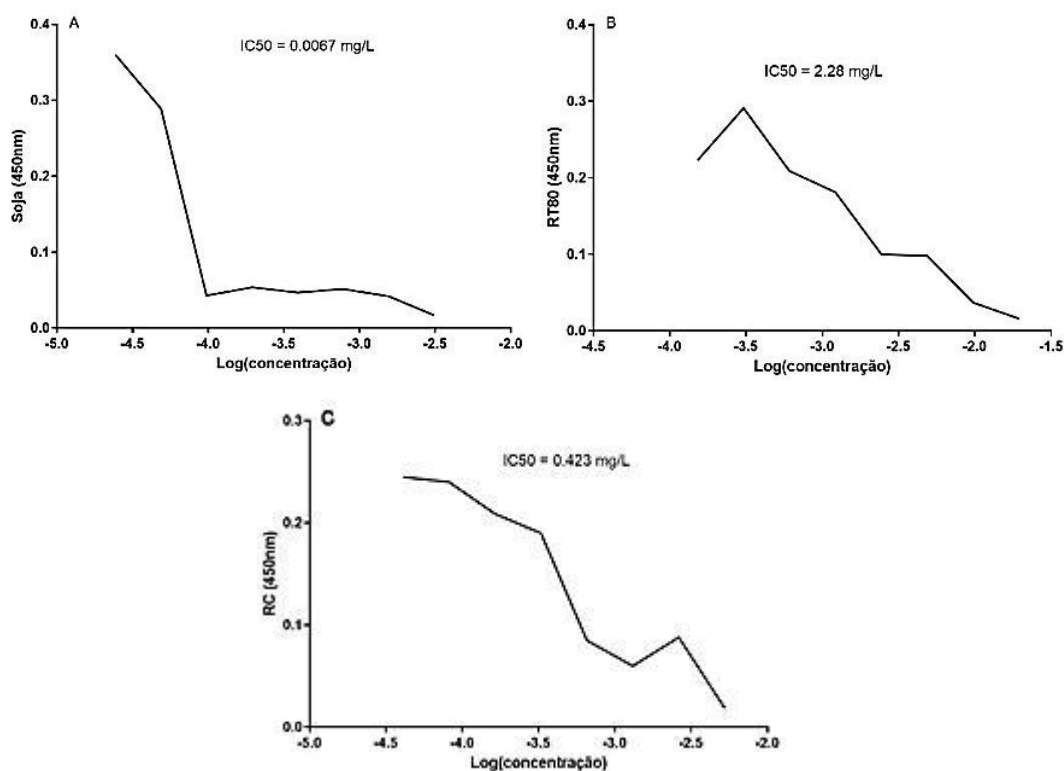


Gráfico 4 - **A** - O gráfico mostra atividade inibitória a base de soja (*Glycine max*); **B** - Atividade inibitória a base de tubérculos torrados a 80°C de *Alocasia macrorrhizos*; **C** - Atividade inibitória a base de tubérculos crus de *Alocasia macrorrhizos*.

A atividade inibitória de tripsina testada com inibidores de proteases a partir de amostras de *G. max*, e tubérculos de *A. macrorrhizos* obtiveram resultados positivos para ambos vegetais. A soja inibiu com menor concentração, tendo maior eficiência. Quando comparado com os tubérculos de raiz torrado, esses resultados corroboram com Touil (2004). As amostras dos tubérculos de *A. macrorrhizos*, provenientes de tubérculo cru demonstraram potencial de inibição, sendo que ao se comparar entre torrado e cru o segundo demonstrou

melhor inibição (Gráfico 4 “C” e “B”), esse efeito deve-se a interferência da temperatura, mesmo as moléculas sendo de uma mesma amostra e tendo resistência, ocorre degradação gradativa das proteínas com o aumento da temperatura (GOBBO-NETO, 2007; LOPES, 2006).

7.8. Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante referente a *Alocasia macrorrhizos*, apresenta baixos resultado de hemaglutinação de eritrócitos humanos, conforme tabela 1.

Tabela 1 - Atividade hemaglutinante de extratos de *Alocasia macrorrhizos* e *G. max*.

Composto - 1,25 mg/ml	Atividade Hemaglutinante (UH)
<i>A. macrorrhizos</i> Cru	2
<i>A. macrorrhizos</i> Torrado	1
<i>Glycine max</i>	10

Segundo WANG e NG (2005) mostra em seus estudos que a *Alocasia macrorrhizos* apresenta baixo potencial hemaglutinante corroborando com os resultados. A diminuição da quantidade de UH encontrada na amostra do tubérculo torrado é menor em relação ao tubérculo cru devido ao seu aquecimento e conseqüente degradação de aglutininas. Entretanto, o resultado obtido para as sementes de soja mostra uma atividade hemaglutinante de 10 = UH/100 µl em 1,25 mg/ml, resultado semelhante encontrado em outros estudos segundo Cardoso e colaboradores (2007). Rocha (2014) descreve potencial de atividade hemaglutinante da soja, corroborando com Leal, 2010.

7.9. Atividade antioxidante – DPPH

Os resultados mostraram que as amostras a partir de tubérculos *A. macrorrhizos* obtiveram atividade antioxidante, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antioxidante de extratos e inibidores de proteases de *Alocasia macrorrhizos*.

Composto - 200 µg/mL	Atividade Antioxidante (%)
IP <i>A. macrorrhizos</i> Cru	4
IP <i>A. macrorrhizos</i> Torrado	2,5
Extrato <i>A. macrorrhizos</i> Cru	40
Extrato <i>A. macrorrhizos</i> Torrado	12

Os resultados mostraram que a amostra a partir de tubérculo cru *A. macrorrhizos* obteve 40,5% de atividade antioxidante na concentração de 200 µg/mL, sendo que esta obteve a maior atividade antioxidante em relação a amostra torrada que apresentou 12% de atividade.

Extratos etanólicos obtidos de folhas de várias espécies de *A. macrorrhizos*, possui atividade antioxidante e anti-inflamatória potente, quando testado em ensaio de edema de pata induzido por carragenina segundo Mulla e colaboradores (2010).

Islam e colaboradores (2013) realizando ensaio de eliminação de radicais DPPH em extrato etanólico de tubérculos de *A. macrorrhizos* verificou forte atividade antioxidante com o valor da concentração inibitória de 50%. O extrato também diminuiu a motilidade gastrointestinal em camundongos.

Nunes e colaboradores (2008) em seus estudos utilizando este método em *Mimosa paraibana*, observaram resultados similares, diferindo apenas no percentual de antioxidação.

7.10. Viabilidade Celular com macrófagos RAW 264.7

A viabilidade celular dos inibidores de proteases isolados e dos extratos foi testada em macrófagos RAW 264.7. Os gráficos abaixo (Gráficos 5 e 6) mostram o percentual de viabilidade celular obtida nas amostras a base de inibidores de proteases e extratos aquosos e etanólicos de *A. macrorrhizos*, *G. max*, e *Xanthosoma sagittifolium*.

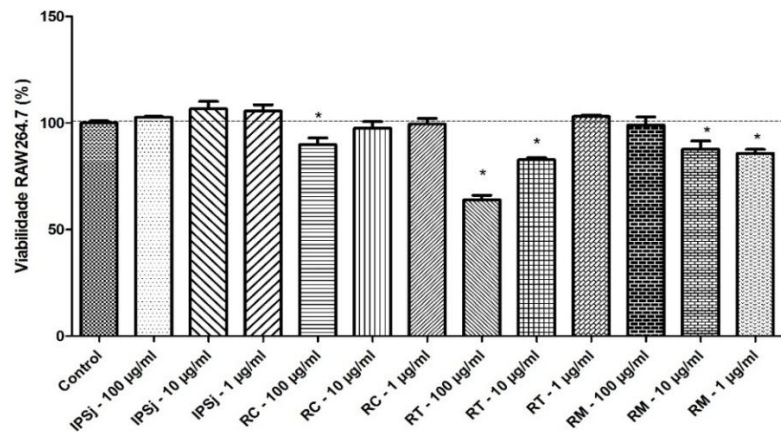


Gráfico 5 - Gráfico de viabilidade celular dos inibidores de proteases. Onde: Control = Células RAW 264.7 não tratadas; IPSj-100, IPSj-10 e IPSj-1 = Inibidor de Proteases a base de grãos de *G. max* concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml; RC-100, RC-10 e RC-1= Inibidor de Protease a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml; RT 100, RT 10 e RT 1 = Inibidor de Proteases a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml e RM-100, RM-10 e RM-1= Inibidor de Protease a base de tubérculos crus *Xanthosoma sagittifolium* nas respectivas concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml. * p<0,05 em relação ao controle.

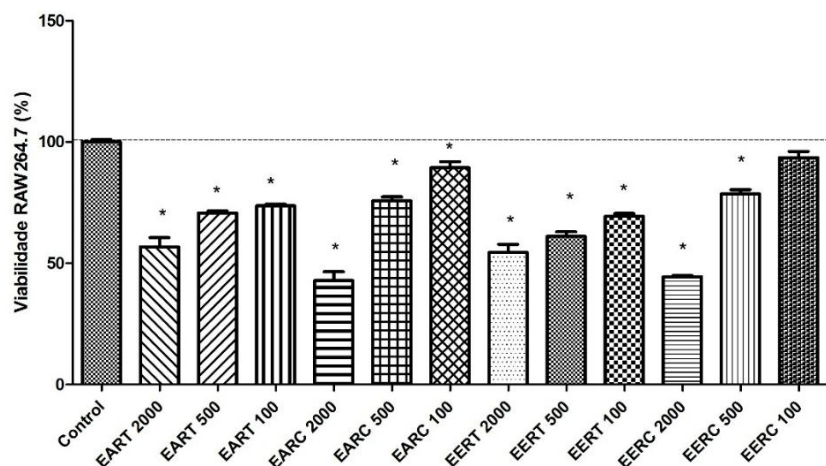


Gráfico 6 - Gráfico de viabilidade celular dos extratos aquosos e etanólicos a base de tubérculos crus e torrados de *Alocasia macrorrhizos*. Onde: Control = Célula RAW 264.7 não tratadas; EART 2000, EART 500 e EART 100 = Extrato aquoso a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml; EARC 2000, EARC 500 e EARC 100 = Extrato aquoso a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml; EERT 2000, EERT 500 e EERT 100 = Extrato Etanólico a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml; EERC 2000, EERC 500 e EERC 100 = Extrato Etanólico a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml. * p<0,05 em relação ao controle.

Quando comparado o controle de viabilidade celular com as amostras de inibidores de proteases de *G. max* não foi observado alteração na viabilidade das células, resultado este que esta de acordo com os achados de Hyung e colaboradores (2014) que demonstraram manutenção da viabilidade celular após tratamento com extrato de semente de soja. Apenas na amostra de IP de tubérculo torrado, na concentração de 100 µg/ml, foi observada redução de 40% na viabilidade das células RAW 264.7. Amostra de *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) foi utilizada para efeito de comparação de espécies da mesma família. O tratamento com IPs de *X. sagittifolium* apresentou viabilidade de 80%. Nas demais concentrações das amostras de IP não foram observadas citotoxicidade pronunciada (Gráfico 5). Os resultados sugerem que os IP de *A. macrorrhizos* não são citotóxicos nas concentrações abaixo de 100 µg/ml.

Na maioria dos extratos foi observada citotoxicidade. Nas concentrações 200 µg/ml dos extratos aquosos e etanólicos a partir dos tubérculos de *A. macrorrhizos* foi encontrado valores próximos, e até superiores, a 50% de redução da viabilidade (Gráfico 6). Rahman e colaboradores (2012) demonstram que o valor de toxicidade de 50% foi encontrado na concentração de 188,14 µg/ml. Desta forma, concentrações menores que 50µg/ml podem ser consideradas com baixo poder de toxicidade.

7.10.1. Determinação da produção de NO

A ação dos extratos e dos inibidores de proteases sobre a produção de óxido nítrico pode ser observada nos Gráficos 7 e 8.

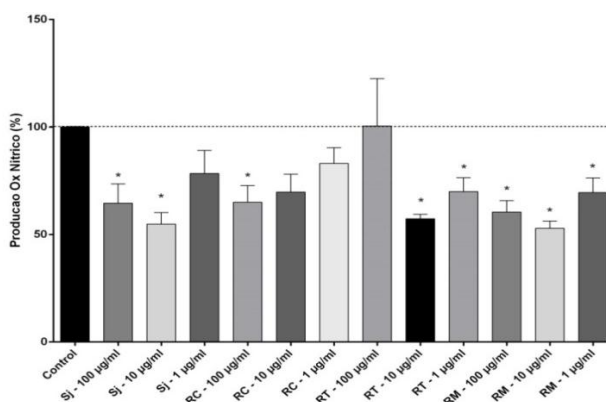


Gráfico 7 - Gráfico aferindo produção de NO. As células foram estimuladas com LPS e IFN- γ para a análise da produção de NO. Control = RAW 264.7 não tratadas; IPSj-100, IPSj-10 e IPSj-1 = Inibidor de Proteases de *G. max* nas concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml (essas concentrações se repetiram para todas as amostras); RC-100, RC-10 e RC-1= Inibidor de Proteases de tubérculos crus; RT 100, RT 10 e RT = Inibidor de Proteases de tubérculos torrados e RM-100, RM-10 e RM-1= Inibidor de Proteases de tubérculos crus *Xanthosoma sagittifolium*. * p<0,05 em relação ao controle.

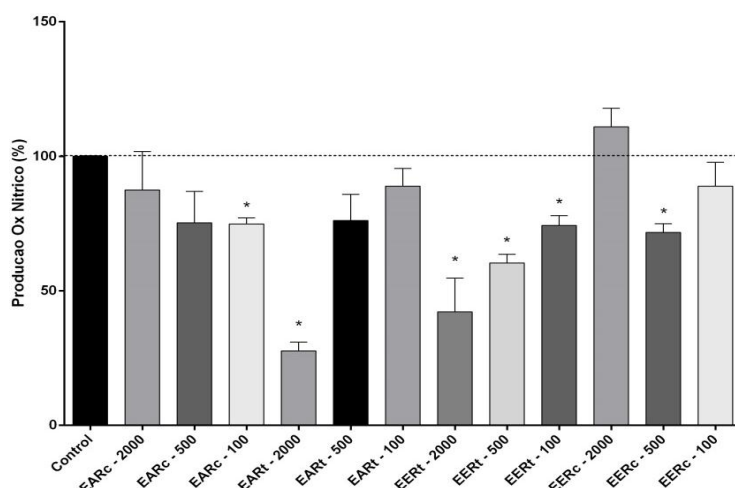


Gráfico 8 - Gráfico da cultura de células aferindo produção de óxido nítrico (NO) Todas as células foram estimuladas com LPS e IFN- γ para a análise da produção de NO. Control = RAW 264.7 não tratadas; EART 2000, EART 500 e EART 100 = Extrato aquoso a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 200 μ g/ml, 50 μ g/ml e 10 μ g/ml; EARC 2000, EARC 500 e EARC 100 = Extrato aquoso a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 200 μ g/ml, 50 μ g/ml e 10 μ g/ml; EERT 2000, EERT 500 e EERT 100 = Extrato Etanólico a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 200 μ g/ml, 50 μ g/ml e 10 μ g/ml; EERC 2000, EERC 500 e EERC 100 = Extrato Etanólico a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 200 μ g/ml, 50 μ g/ml e 10 μ g/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Diferentes estudos apontam importância do óxido nítrico durante os processos inflamatórios (ALVES, 2012; LEVINE, 2012; REYES, 2012). A síntese de óxido nítrico é um importante indicador do estado de agressão ou stress imposto às células, é um radical livre e a sua produção em excesso causa danos celulares relacionados a processos inflamatórios (PACHER *et al.*, 2007).

No presente estudo, os resultados expressados nos gráficos revelaram que entre os inibidores de proteases de *A. macrorrhizos*, o IP das amostras RM e RT apresentaram redução acentuada da produção de NO na concentração de 10 μ g/ml (Gráfico 7). Entre os extratos etanólico e aquoso (Gráfico 8), apenas o extrato etanólico 50 μ g/ml de tubérculo cru apresentou inibição da produção de NO, nos outros compostos a inibição ocorrida é relativa a toxicidade dos mesmos (Gráfico 6). Alguns trabalhos relatam resultados positivos na redução de atividade inflamatória com proteínas de origem vegetal, apresentando também redução de até 50% na produção de óxido nítrico por macrófagos tratados com proteína hidrolisada de *Lupinus angustifolius* (MILLÁN-LINARES *et al.*, 2014).

7.10.2. Ensaio de Citocinas TNF- α

Determinação dos níveis de liberação de citocinas TNF- α durante a exposição das células às amostras dos extratos e IP de tubérculos de *A. macrorrhizos* (gráfico 9 e 10).

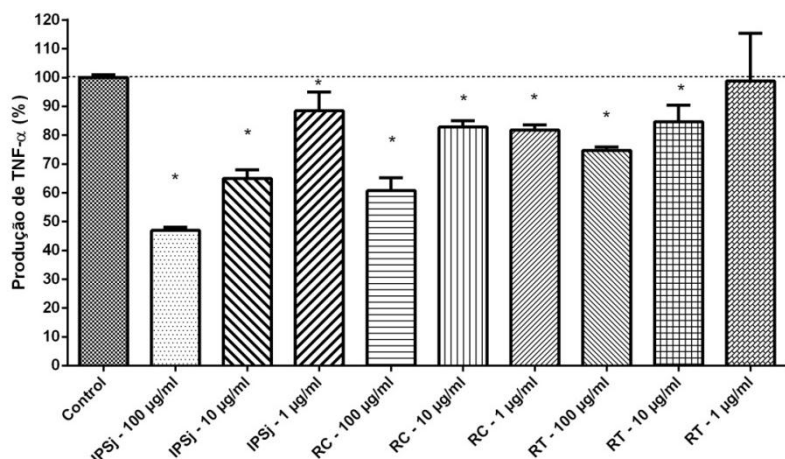


Gráfico 9 - Gráfico da cultura de células aferindo liberação de TNF- α . Todas as células foram estimuladas com LPS e IFN- γ para a análise da produção de TNF- α . Control = RAW 264.7 não tratadas; IPSj-100, IPSj-10 e IPSj-1 = Inibidor de Proteases a base de grãos de *G. max* concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml; RC-100, RC-10 e RC-1= Inibidor de Protease a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml; RT 100, RT 10 e RT = Inibidor de Proteases a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

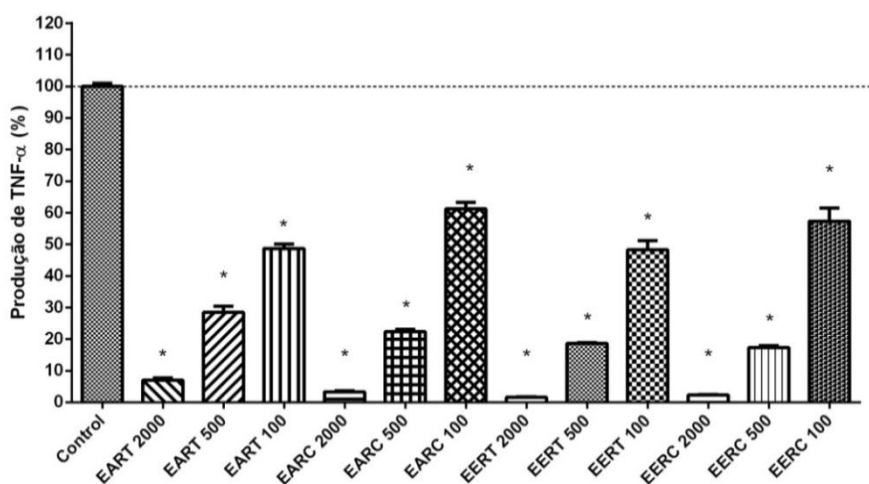


Gráfico 10 - Gráfico da cultura de células aferindo liberação de TNF- α . Todas as células foram estimuladas com LPS e IFN- γ para a análise da produção de TNF- α . Control = RAW 264.7 não tratadas; EART 2000, EART 500 e EART 100 = Extrato aquoso a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml; EARC 2000, EARC 500 e EARC 100 = Extrato aquoso a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml; EERT 2000, EERT 500 e EERT 100 = Extrato Etanólico a base de tubérculos torrados nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml; EERC 2000, EERC 500 e EERC 100 = Extrato Etanólico a base de tubérculos crus nas respectivas concentrações de 200µg/ml, 50µg/ml e 10µg/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Pesquisas demonstram que várias proteases estão ligadas a patogênese de doenças inflamatórias e imunes, com correlação nos comportamentos celulares como a ativação e migração de células do sistema imune, ativação e/ou inativação de citocinas e quimiocinas, bem como no papel da função do complemento. Desta maneira as enzimas ou proteases participam de diversas reações de respostas do sistema imune às inflamações em organismo animal (SAFAVI & ROSTAMI, 2012).

Na presença dos inibidores de proteases isolados e purificados de soja nas concentrações de 100, 10 e 1µg/ml houve uma redução da liberação de citocinas TNF-α, sendo a mais expressiva de média de 50% na sua maior concentração que é de 100µg/ml, e nos IP de *A. macrorrhizos* a reação foi similar, porém com uma redução na liberação de citocinas de 40% na maior concentração do IP de tubérculo cru 100µg/ml. A redução de TNF-α na concentração de 200µg/ml não pode ser considerada baseado nas análises de viabilidade celular. Dentre os extratos que apresentaram baixa citotoxicidade, os derivados da raiz crua foram os que apresentaram melhor relação na inibição dos marcadores inflamatórios.

8. Indução do modelo Murino de vitiligo

Após o ensaio *in vivo* com a indução do modelo murino de vitiligo através de aplicação tópica diária de hidroquinona a 5% nos animais (C57BL/6 macho) durante 30 dias nesta concentração, obteve-se a despigmentação nos animais dos grupos induzidos, como mostram as figuras para a comparação 15”A” e 16”A”.



Figura 15 – A = Controle negativo animal de corpo inteiro, imagens à esquerda e direita são ampliações mostrando as porções torácica e lombar respectivamente dos animais que não foram induzidos a nenhum tratamento.



Figura 16 – A = Controle positivo, animal de corpo inteiro, imagens à esquerda e direita são ampliações mostrando as porções torácica e lombar respectivamente dos animais que foram induzidos através de hidroquinona.

Como mostra a figura 15 “A” no animal do grupo controle negativo não ocorreu a despigmentação dos pelos, podendo ser observado nas ampliações da foto, com destaque para as áreas torácica e lombar sem nenhum folículo despigmentado. Já na figura 16 “A” é representado o animal com despigmentação, nas ampliações à esquerda e direita da foto que mostram as áreas torácica e lombar, onde notam-se folículos pilosos despigmentados. ZHU e colaboradores (2013) demonstram que o estresse oxidativo ocasionado pela hidroquinona promove danos nos melanócitos ocasionando a não produção de melanina e consequente despigmentação.

8.1. Estudos Histopatológicos

Com a análise histopatológica da pele através de amostras obtidas dos animais, foi mensurada a lesão através da quantificação da espessura da camada celular epidérmica, devido ao processo inflamatório causado na epiderme pela aplicação de hidroquinona de forma tópica. O gráfico 11 apresenta a efetividade e a comparação do potencial anti-inflamatório do extrato no experimento.

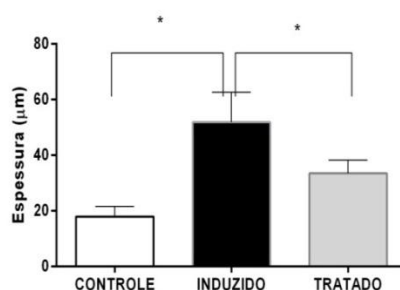


Gráfico 11 - Gráfico da análise histopatológica da indução e tratamento do modelo Murino de Vitiligo em camundongos C57BL/6. Controle = Animais que não receberam nenhum tipo de tratamento, é controle negativo; INDUZIDO = Animais que foram induzidos com Hidroquinona 5% e não tratados; TRATADO = Animais induzidos com Hidroquinona 5% e tratados com 100mg/kg de extrato aquoso a base de tubérculos torrados de *A. macrorrhizos*.

As imagens abaixo demonstram cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, nas amostras biológicas obtidas do dorço dos camundongos estão representadas em três imagens nas figuras 17 “A”, ”B” e ”C” (aumento de 100 vezes) mostrando tecido epidermico sadio, induzido o vitiligo e tratado.

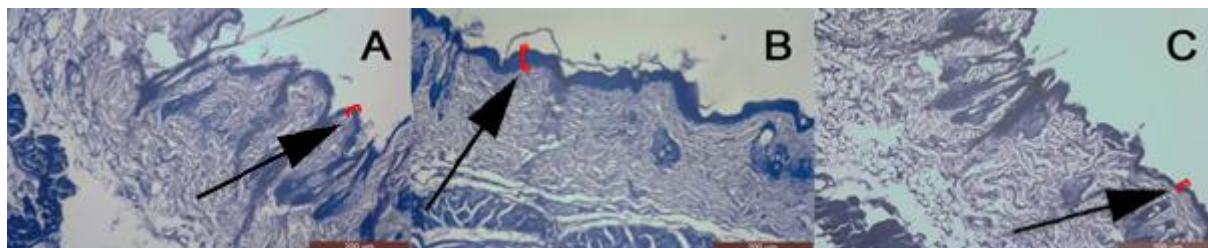


Figura 17 – Análise histopatológica da indução e tratamento do modelo Murino de Vitiligo em camundongos C57BL/6. A = Animais que não receberam nenhum tipo de tratamento, é controle negativo; B = Animais que foram induzidos com Hidroquinona 5% e não tratados; C = Animais induzidos com Hidroquinona 5% e tratados com 100mg/kg de extrato aquoso a base de tubérculos torrados de *A. macrorrhizos*.

A epiderme é formada por células epiteliais estratificadas estão que sobre a camada de tecido conectivo que é a derme (KOSTER e ROOP, 2004). Onde a epiderme e a derme estão fixadas em uma terceira camada composta de tecido adiposo que é a hipoderme (KUPPER e FUHLBRIGGE, 2004).

Com indução do modelo murino de vitiligo nos camundongos através do uso de hidroquinona a 5%, observa-se um acúmulo de células na porção epidérmica coletadas dos animais. O gráfico 10 representa estatisticamente na coluna “INDUZIDO” uma espessura 120% maior da epiderme nos animais tratados com hidroquinona em relação ao “CONTROLE”, resultado este também obtido com a indução do modelo murino de vitiligo por outros pesquisadores (ZHU *et al.*, 2014). Na comparação entre os animais do grupo induzido e os animais do grupo tratado foi observado redução de aproximadamente 40% da espessura da camada epidérmica. Até o presente momento, este é o primeiro estudo que demonstra a redução do espessamento epidérmico após tratamento com extrato de *A. macrorrhizos*.

Estudos sobre patologias cutâneas objetivando o desenvolvimento de novos fármacos vêm sendo desenvolvidos, em destaque processos cicatrização e função de fatores de regeneração tecidual, cultura de células *in vitro*, modelos artificiais com animais transgênicos entre outros (FALANGA, 2004). A injúria na epiderme promove um processo de reparo tecidual para proteção do organismo, assim ocorre a instalação de processo inflamatório

agudo, ocorrendo um processo onde o organismo trabalha em prol da produção de células para compensar as perdas, por isso ocorre o espessamento da camada epidérmica (CASTAÑON, 1997).

A comparação da espessura da camada epidérmica apresentada na figura 17 A com a figura 17 B, demonstra espessamento da camada epidérmica na figura 17 B, que por sua vez está representado no gráfico 10 na coluna “INDUZIDO” que apresenta a maior espessura do experimento. Já na figura 17C pode ser observada diminuição do espessamento, bem como no resultado do gráfico 10 na coluna “TRATADO” onde houve a diminuição do espessamento da camada epidérmica. Desta forma, sugere-se um efeito benéfico do tratamento com os extratos de tubérculo torrado de *A. macrorrhizos*.

A figura 18 (aumento de 100 vezes) mostra cortes histológicos onde é possível observar folículos pilosos com grânulos de melanina no seu interior e folículos vazios.

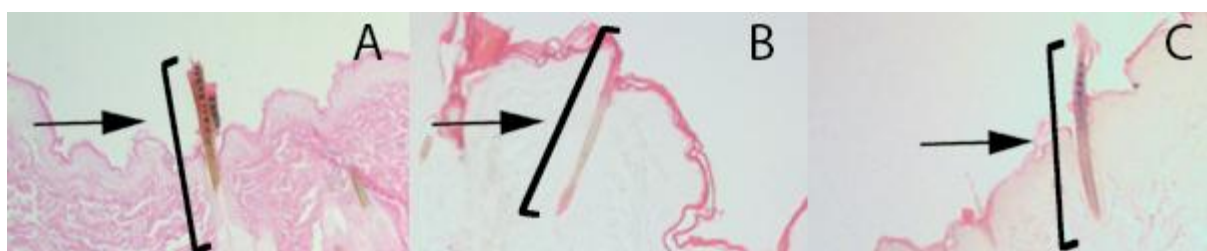


Figura 18 – Análise histopatológica da presença de melanina em folículos pilosos de camundongos C57BL/6. A = Animais que não receberam nenhum tipo de tratamento, é controle negativo; B = Animais que foram induzidos com Hidroquinona 5% e não tratados; C = Animais induzidos com Hidroquinona 5% e tratados com 100mg/kg de extrato aquoso a base de tubérculos torrados de *A. macrorrhizos*.

Na figura 18 “A” foi demonstrado nos cortes histológicos os folículos pilosos com grânulos de melanina no seu interior. A figura 18 “B” apresenta os folículos vazios desde a base, bulbo capilar. A figura 18 “C” é possível identificar grânulos de melanina presentes dentro do folículo, comprovando assim a efetividade da ação protetiva e regenerativa da função celular epidermal melanocítica. O controle da pigmentação pilosa fica a cargo dos melanócitos, que em condições normais, produzem grânulos de melanina que pigmentam o folículo piloso (BAXTER *et al.*, 2004),

9. CONCLUSÃO

Aquisição de informações científicas sobre uma planta que é utilizada pela população de forma indiscriminada é imprescindível e também uma necessidade de saúde pública. Diante dos resultados deste trabalho foi possível identificar a espécie como sendo *Alocasia macrorrhizos*; detectar inibidores de proteases BBI e KTI, mensurarem seus potenciais: inibitório de tripsina, hemaglutinante e antioxidante; aferir a viabilidade celular, produção de NO e liberação de citocinas TNF-a nos extratos e nos IP. Conclui-se que o extrato obtido a partir dos tubérculos torrados de *Alocasia macrorrhizos* demonstrou ser uma promissora opção no tratamento do vitiligo, uma patologia que atinge 1% da população mundial e 1,5% da população brasileira, desde que sejam positivados os próximos passos investigatórios científicos para esta conclusão, com ensaios em humanos em futuros trabalhos.

REFERÊNCIAS

ALKHATEEB A., FAIN P.R., THODY A., et al. **Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their husbands.** *Pigment Cell Res*, v.16(3):208-214, 2003.

ALVES, C. C.S. **Efeito de derivados antraquinônicos análogos da mitoxantrona na modulação da resposta imune: modelo de encefalomielite autoimune experimental e de alergia pulmonar.** 2012. Disponível em <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/1671> (acesso 10-02-2018).

ARAÚJO, J. M. A *Química de Alimentos – Teoria e Prática*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2ª ed. 1999.

ARGALL ME, Bradbury JH, Shaw DC (1994) **Amino-acid sequence of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from giant taro (*Alocasia macrorrhiza*).** *Biochim Biophys Acta* 1204(2):189–194.

BIJINA B.; SREEJA CHELLAPPANA; SOOREJ M. BASHEER; K.K. ELYAS; ALI H. BAHKALI; M. CHANDRASEKARAN. **Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization.** *Process Biochemistry Journal*. India, v.46, n.12, , p.2291-230, 2011.

BACKES, S. **Análise proteômica de variedades convencionais e geneticamente modificadas de soja(*Glycinemax*) visando proteínas bioativas.**2011. 8 f. Dissertação para obtenção do grau de Mestre – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Área de Bromatologia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BADKE, M.R. et al. **Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular.** *Escola Anna Nery*, v. 15, n. 1, p. 132-9, 2011.

BARNES L. **Vitiligo and the Vogt-Koyanagi- Harada syndrome.** *Dermatol Clin* 1988; 6: 229- 239.).

BAXTER, L. L., HOU, L., LOFTUS, S. K. AND PAVAN, W. J. (2004). **Spotlight on spotted mice: a review of white spotting mouse mutants and associated human pigmentation disorders.** *Pigment Cell Res.* 17, 215-224

BELLET, Jane S. PROSE, Neil S. **Vitiligo em crianças: uma revisão de classificação, hipóteses sobre patogênese e tratamento.** *Anais Brasileiros de Dermatologia.* Carolina do Norte, v. 80, n.6, p.631-636, Set.2005. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n6/v80n06a09.pdf>> Acesso em: 21 março 2016.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. **A pure trypsin inhibitor from soya beans.** *Biochemical Journal,* v.87, n.2, p.281-284, 1963.

BOWMAN, D.E. **Differentiation of soy bean anti-tryptic factors.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,* v.63, n.3, p.547-550, 1946.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. **Antigenicity of soybean protease inhibitors.** In: TROLL, W.; KENNEDY, A. R. (Eds.). *Proteinase inhibitors as cancer chemopreventive agents.* New York: Plenum, 1993. p. 107-129.

BRANDON, D. L.; HAQUE, S.; FRIEDMAN, M. **Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors.** *Journal Agricultural and Food Chemistry,* Easton, v. 35, p. 195-200, 1987.

BRASIL, 2017 – **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos.** Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf acesso em 18-07-2017 às 09:29h.

CARDOSO, L.R.; *et al.* **Inhibitors protease activity in soybean lineages improvement.** *Alim.Nutr., Araraquara,* v.18 , n.1, jan./mar., p. , 2007. Disponível em < <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/127/135>> 30/03/2018.

CARLI, ALESSANDRA DE PAULA; VIEIRA, PAULA MELO DE ABREU; SILVA, KARINA TACIANA SANTOS; COTA, RENATA GUERRA DE SÁ; CARNEIRO, CLÁUDIA MARTINS; CASTRO-BORGES, WILLIAM; ANDRADE, MILTON HÉRCULES GUERRA. **Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and colorectal pre neoplasias induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss mice.** Food and Chemical Toxicology. 2012,1405–1412.

CASTAÑON, M. C. M. N. **Expressão das citoceratinas epidérmicas em dermatoses infecto-parasitárias.** 1997. 159f. Curso de Pós-Graduação em Medicina, Doutorado em Dermatologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

CAVANI A., DI NUZZO S., GIROLOMONI G., et al. **Lymphocyte subpopulations of the skin.** In: BOS J.D. Skin Immune System. Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology. 3ª Ed. By Jan D.Bos. Boca Raton/New York, CRC Press, 2005. P. 101-122.

CHEVREUI, L. et al. **Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de Parkia (Fabaceae).** Hoehnea 41(2), p.181-186, 2014.

CLEMENTE, A.; DOMONEY, C. **Biological significance polymorphism in legume protease inhibitor the Bowman-Birk family.** Current Protein Peptide Science, v.7, p.201-216, 2006.

COLARES, L.F.; NETO A. R. S.; CORDEIRO I. H.; CASTRO, S. B. R.; VERLY, R. M. ; ALVES, C. C.S.; CARLI, A.P. **Detection of protease inhibitors in seeds of Punica granatum** 2017

DONATO, E.M. 2010. **Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos.** Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2010;31(2):125-130 ISSN 1808-4532 disponível em < http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/1049/944> 31/03/2018.

DESHIMARU, M., YOSHIMI, S., SHIOI, S., AND TERADA, S. (2004). **Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitors of wild soja and soybean: the presence of two BBI-A genes and pseudogenes.** Biosci Biotechnol Biochem 68, 1279-1286.

FALANGA, V. **The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation.** Blood Cell Mol Dis, v. 32, p. 88– 94, 2004.

FANG, S. *et al.* 2012. **Anticancer potential of aqueous extract of alocasia macrorrhiza against hepatic cancer in vitro and in vivo.** 2012. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472110>, acesso em 18/07/2017 10:00h.

FARIA, J. L. de. **Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

FERRIS, H.; ZHENG, L. **Plant sources of chinese herbal remedies: Effects on Pratylenchus vulnus and Meloidogyne javanica.** Journal of Nematology, College Park, v. 31, n. 3, p. 241-263, 1999.

FIOCRUZ. **Sistema Nacional de Informações Tóxico - SINITOX: Plantas tóxicas no Brasil.** [2009]. Disponível em: <http://sbirt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwNg==>. Acesso em: 24 Maio 2016.

FISHMAN P *et al.* **Vitiligo antibodies are effective against melanoma.** Cancer 1993; 72: 2365-2369.

GARIANI T., LEATHERBARROW R.J. **Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases.** 1997.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.- **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Quim. Nova, vol. 30, no. 2, 374-381, 2007.

GRIEG, C.R e STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna com aplicações clínicas.** 6a ed. cap.36. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

HYUNG L. W. *et al.* **Specific Oligopeptides in Fermented Soybean Extract Inhibit NF- κ B-Dependent iNOS and Cytokine Induction by Toll-Like Receptor Ligands.** 10 Nov 2014 disponível em <<https://doi.org/10.1089/jmf.2013.3070> > 25/04/2018.

HOLETZ FB, PESSONI GL, SANCHES NR, CORTEZ DAG, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP. **Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97(7): 1027-1031, 2010.

IBGE 2018. Disponível em:

<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=316860&search=minas-gerais|teofilo-otoni|infograficos:-informacoes-completas>.

IBGE 2018. Disponível em:

<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=316860&idtema=118&search=minas-gerais|teofilo-otoni|C3%8Dndice-de-desenvolvimento-humano-municipal-idhm->

INES D., BOUDAYA S., RIADH B.M., et al. **A comparative study of oxidant antioxidant status in stable and active vitiligo patients.** Arch Dermatol Res, v. 298:147-152, 2006.

ISLAM MK, MAHMUD I, SAHA S, SARKER AB, MONDAL H, MONJUR-AL-HOSSAIN AS, ANISUZZMAN M. **Preliminary pharmacological evaluation of Alocasia indica Schott tuber.** 2013

ISSA, C. M.B.M. **Transplantes de melanócitos no tratamento do vitiligo: um processo terapêutico?** Campinas, 2003. (Tese de Doutorado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, 2003. Disponível em:

<<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000296357&fd=y>> Acesso em: 21 março. 2016.

KAY DE **Root crops, vol 2, Crops and products digest.** Tropical Products Institute, London, (1973) 245 pp.

KENNEDY, A. R. **The evidence for soybean products as cancer preventive agents.** J. Nutrition, 125: 733S-743S, 1995.

KIM, J-Y.; PARK, S-C.; KIM, M-H.; LIM, H-T.; PARK, Y.; HAHM, K-S. **Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 330, p. 921–927, 2005.

KOSTER, M.I., ROOP, D.R. **Genetic pathways required for epidermal morphogenesis.** Eur. J. Cell Biol., 83: 625-629, 2004.

KUPPER, T.S., FUHLBRIGGE, R.C. **Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences.** Nat. Rev. Immunol., 4: 211-222, 2004.

LADIO, A.H. & LOZADA, M. 2004. *Patterns of use and knowledge of wild edible plants in distinct ecological environments: a case study of a Mapuche community from Northwestern Patagonia.* Biodiversity and Conservation 13: 1153-1173.

LEAL, S. C. **Purificação preparativa de inibidores Bowman-Birk, quantificação em alimentos e características imunogênicas dos inibidores de *Glycine max* e da *Macrotyloma axillare*.** 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

LERNER AB, Nordlund JJ. Vitiligo: **What is it? Is it important?.** J Am Med Assoc 1978; 239:1183-1187.

LEVINE, A. B.; PUNIHAOLE, D.; LEVINE, T. B. **Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications.** Cardiology, Amsterdam, v. 122, p. 55-68, 2012.

LOPES, J. L. S. - **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de Acacia plumosa lowe** – USP – São Carlos – 2006.

LOSSO, J. N. (2008). **The biochemical and functional food properties of the bowmanbirk inhibitor.** Crit Rev Food Sci Nutr 48, 94-118.

MACEDO, M.L.R.; MATOS, D.G.; MACHADO, O.L.T.; NOVELLO, J.C. **Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties.** Phytochemistry. v. 54. p. 553-558. (2000).

MAJUMDER PP, Nordlund JJ, Li CC. *Pattern of familial aggregation of vitiligo.* Arch Dermatol. 1993;129:994-998.

MANNER HI, 2011. **Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Giant Taro (*Alocasia macrorrhiza*)**. Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry [ed. by Elevitch, C. R.]. Holualoa, Hawaii, USA: Permanent Agriculture Resources (PAR). <http://agroforestry.net/scps> Acesso em: 10 Junho 2017.

MELLO, G.C.; OLIVA, M.L.V.; SUMIKAWAW, J.T.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L.R. **Purification and characterization of new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds**. Journal of Protein Chemistry. v. 20. p. 625-632. (2002).

MILLÁN-LINARES, M. DEL C.; BERMÚDEZ, B.; YUST, M. DEL M.; MILLÁN, F.; PEDROCHE, J. **Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1- derived macrophages**. J. Funct. Foods, v. 8, n. 1, p. 224– 233, 2014.

MONTES LF *et al.* **Folic acid and vitamin B 12 in vitiligo: a nutritional approach**. Cutis 1992;50:39-42.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J.C. **Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris***. Plant Physiology, 59: 783-787, 1977.

MOSOLOV, W.; VALUEVA, T. A. **Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review**. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 44, n. 3, p. 233-240, May, 2008.

MUKHERJEE, Ashis K.; MACKESSY, Stephen P.; DUTTA, Sumita. **Characterization of a Kunitztype protease inhibitor peptide (Rusvikunin) purified from *Daboia russelii russelii* venom**. International journal of biological macromolecules, v. 67, p. 154-162, 2014.

MULLA, W.A. *et al.* **Antioxidant, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Extract of Leaves of *Alocasia indica* (Schott.)** 2010

NAYAK BS, ULLOOR NJ, SHIVARAJ B. **Selective precipitation of haptoglobin and alpha2-macroglobulin from human serum using *Alocasia macrorrhiza* tuber protein**. 2002

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). **Proteolytic enzymes - a practical approach**. Oxford: JRL Press, 1990. 259 p.

NEURATH, H. **The versatility of proteolytic enzymes**. Journal of Cellular Biochemistry, v. 32, n. 1, p. 35-49, 1986.

NUNES XP, MESQUITA RF, SILVA DA, LIRA DP, COSTA VCO, SILVA MVB, XAVIER AL, DINIZ MFFM, AGRA MF. **Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxicae antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae)**. Rev. Bras. Farmacogn., 18: 718-723, 2008.

OLIVEIRA, A. **Purificação e Caracterização de Inibidores de Tripsina da Família de Sementes de *Pithecellobium dumosum* e Seus Efeitos In Vitro Sobre Insetos e Pragas**. 2007. 222f. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2007.

OMS Organización Mundial de La Salud. **Situación regulamentaria de los medicamentos: uma resena mundial**. Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, 2000. 62p.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease**. Physiol. Rev., v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

Palayam, M.: Ganapathy J.: Balu KE, Pennathur G.: Krishnasamy G. **Structural insights into a multifunctional inhibitor, 'AMTIN' from tubers of *Alocasia macrorrhizos* and its possible role in dengue protease (NS2B-NS3) inhibition**. 2018

PREFEITURA DE TEÓFILO OTONI DISPONÍVEL EM:
<http://www.teofilootoni.mg.gov.br/site/turista/>.15-01-2018

RAHMAN, M. *et al.* **Antihyperglycemic, antioxidant, and cytotoxic activities of *Alocasia macrorrhizos* (L.) rhizome extract**. 2012 Disponível em: <
<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tbtkbiology/article/viewFile/5000021354/5000021595>>
Acesso em: 23 março 2016.

REEDY MV et al. **Regulation of melanoblast migration and differentiation. In: The Pigmentary System Physiology And Pathophysiology.** New York: Oxford University Press, 1998:75-95.

REYES, T.M. **Signal in the NO ise: The role of nitric oxide in inflammation anorexia.** Brain, Behavior, and Immunity, Orlando, 2012, doi:10.1016/j.bbi.2012.05.013.

RIAD H, MANNAI HA, MANSOUR K, et al. **Diphenylcyclopropenone-induced vitiligo in a patient with alopecia universalis.** *Case Rep Dermatol* 2013;5(2):225-31.

ROCHA, R. O. **Exsudatos de sementes de soja [Glycine max (L.) Merrill]: caracterização proteômica e efeitos contra o nematoide das galhas Meloidogyne incognita.** 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014. Disponível em < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/14448>>30/03/2018.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. **Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases.** *Experimental and Molecular Pathology*, v.93, n.3, p.428-433, 2012.

HUO SHI-XIA, *et al.* **The Effects of Galangin on a Mouse Model of Vitiligo Induced by Hydroquinone.** *PHYTOTHERAPY RESEARCH* *Phytother. Res.* 28: 1533–1538 (2014).

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/doenca/vitiligo/>> Acessado em: 15 de novembro, 2016.

STAHLHUT, R. W.; HYMOWITZ, T. **Variation in the low molecular weight proteinase inhibitors of soybeans.** *Crop Science*, Madison, v. 23, p. 766-769, 1983.

STEINER. D; BEDIN. V; MORAIS. M. B; VILLAS. R. T; STEINER. T; **Vitiligo An bras Dermatol**, Artigo de revisão, Recebido em 03.10.2002, Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 24.04.2003, Rio de Janeiro, maio/jun. 2004.

LIM T.K., **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**, Volume 9, Modifi ed Stems, Roots, Bulbs 2015, pg 432.

TANGHETTI E.A. **Tacrolimus ointment 0.1% produces repigmentation in patients with vitiligo: results of a prospective patients series.** *Cutis*, v. 71(2): 158-62, 2003.

THISSEN M., WESTERHOF W. **Laser treatment for further depigmentation in vitiligo.** *Int J Dermatol* 1997; 36: 386-8.

TOUIL, T.; CIRIC, B; VENTUR, E; SHINDLER, K., S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. **Bowman–Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis.** *Journal of the Neurological Sciences* v.271, p.191–202, 2008.

TOUIL, T.; CIRIC, B; VENTUR, E; SHINDLER, K.; S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A.; *J. NEUROL. SCI.* 2008, 271, 191; CLARDY, J.; WALSH, C.; *Nature* 2004, 432, 829.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. **Human-plasma proteinase inhibitors.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 52, p. 655-709, 1983.

USDA-ARS, 2012. **Germplasm Resources Information Network (GRIN).** Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx> Acesso em: 24 Maio 2016.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. **Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms.** *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, Nov. 2004.

WANG, H.X. AND NG, T.B. **Alocasin, an anti-fungal protein from rhizomes of the giant taro *Alocasia macrorrhiza*** 2002

YAVELOW J, COLLINS M, Birk Y, Troll W, Kennedy AR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Aug;82(16):5395-9.

YILDIRIM M.; BAYSAL V.; INALUZ H.S; et al. **The role of oxidants and antioxidants in generalized vitiligo at tissue level.** *JEADV*, v.18(6):683-6, nov. 2004.

ZHU, Y. *et al.* **A mouse model of vitiligo induced by monobenzene.** Exp Dermatol, v.22, n.7, Jul, p.499-501. 2013.v.

ZIEGLER, I. **Production of pteridines during hematopoiesis and T-lymphocyte proliferation - potencial participation in the control of cytokine signal transmission.** Medicinal Research Reviews 1998; 10:95-114.