

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Paola dos Santos da Rocha

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERGLICEMIANTE DO
EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE**

***Schinus terebinthifolius* Raddi**

Dourados-MS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Paola dos Santos da Rocha

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERGLICEMIANTE DO
EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE**

***Schinus terebinthifolius* Raddi**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biologia Geral/ Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kely de Picoli Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Dourados-MS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R672a	<p>Rocha, Paola dos Santos da. Atividade antioxidante e anti-hiperglicemiante do extrato metanólico da folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi. / Paola dos Santos da Rocha. – Dourados, MS: UFGD, 2015. 86f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Kely de Picoli Souza. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Aroeira vermelha. 2. EROs. 3. Diabetes mellitus. I. Título.</p> <p>CDD – 616.462</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus.

Aos meus pais, José Alves da Rocha e Oraide dos Santos Mendes Rocha, e aos meus irmãos, Pâmela Cristina dos Santos da Rocha e Pablo Antonio Santos da Rocha, por todo o incentivo e apoio. Eu não seria a pessoa que sou hoje sem a educação e o amor de vocês. Obrigada!

Ao meu esposo, Wyllian Teixeira Wincler, por sempre acreditar em mim e por compreender as várias horas que dediquei ao mestrado. Te amo!

Ao meu avô João Mendes, que já não está mais entre nós, mas que sempre me ouviu e me incentivou. Foi um exemplo de vida para mim. Obrigada vovô!

À minha sobrinha, Carolina dos Santos da Rocha Chaga, que me fez tão bem nos momentos difíceis desta caminhada. Te amo meu bebe!

Aos meus familiares, que me apoiaram nesta caminhada de dois anos.

À minha orientadora, Kely de Picoli Souza, por ter acreditado no meu trabalho, pela dedicação, amizade e apoio. Obrigada por todos os ensinamentos!

Ao meu co-orientador, Edson Lucas dos Santos, pela contribuição e ensinamentos.

Às minhas amigas Priscilla Pereira de Toledo Espindola e Jaqueline Ferreira Campos pela amizade, companheirismo e dedicação para a realização deste trabalho.

Às alunas de iniciação científica, Fernanda de Oliveira Galvão e Laiandra Machado, pela colaboração e amizade. Aos membros do grupo de pesquisa em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo - GEBBAM.

Aos membros da banca, pela presença e apoio. À UFGD e agências de fomento CAPES, FUNDECT e CNPq.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Estresse oxidativo e antioxidantes	4
2.2. <i>Diabetes mellitus</i>	6
2.3. Plantas medicinais	8
2.4. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	9
3. OBJETIVOS	13
4. REFERÊNCIAS	14
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS	24
Artigo 1: <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi reduz estresse oxidativo induzido por doxorubicina em eritrócitos humanos	25
Artigo 2: Qualidade microbiológica, toxicidade, potencial anti-hipoglicemiante e antidiabético de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	57
ANEXOS	83
Anexo I (Revista: Qualis/Biodiversidade; escopo e o link-normas de publicação).....	83
Anexo II (Declaração Comitê de Ética em Pesquisa).....	84
Anexo III (Declaração Comissão de ética no Uso de Animais)	85

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas, tais como diabetes e doenças cardiovasculares (Dröge, 2002; Dasgupta & Klein, 2014). Evidências sugerem que a lesão celular oxidativa causada pelos radicais livres, concomitante à hiperglicemia crônica, são fatores determinantes para as complicações no diabetes e necessitam ser controlados (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Yan, 2014).

O *diabetes mellitus* é uma doença multifatorial, associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (Deckert *et al.*, 1978), considerada uma das principais epidemias do século. Estima-se que, em 2030, haverá aproximadamente 195 milhões de indivíduos diabéticos no mundo, um aumento de 114% em relação ao ano 2000 (Wild *et al.*, 2004).

A prospecção de plantas medicinais tem despertado grande interesse pela possibilidade de descoberta de novos compostos bioativos, a fim de originar, por exemplo, fitoterápicos, medicamentos semi-sintéticos e derivados de produtos naturais, com reduzidos efeitos colaterais comparados às drogas sintéticas (Bauer & Bronstrup, 2014).

O conhecimento etnofarmacológico potencializa essa busca, juntamente com estudos químicos e farmacológicos (Brandão *et al.*, 2008). A diversidade estrutural das substâncias provenientes do metabolismo das plantas é responsável por inúmeras propriedades biológicas identificadas, o que justifica o crescente interesse químico e farmacológico por esses compostos (Cordell, 2000).

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), popularmente conhecida como aroeira-vermelha, pimenta-rosa ou aroeira-pimenteira é uma espécie nativa do Brasil (Corrêa, 1974). É uma planta medicinal, inclusa na Farmacopéia Brasileira (Brandão *et al.*, 2006), cujas atividades biológicas de suas diferentes partes, inclusive antioxidante, têm sido investigadas em diversos modelos farmacológicos, e atribuídas aos seus constituintes químicos, como compostos fenólicos e terpenoides. Neste contexto foram avaliadas as atividades antioxidante e anti-hiperglicemiante do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi, e sua composição química.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse oxidativo e antioxidantes

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre em todos os sistemas biológicos em condições fisiológicas durante a respiração celular na mitocôndria, onde o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente para formação de água (H_2O). Neste processo, são gerados intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($\cdot OH$) (Halliwell & Whiteman, 2004; Nickel *et al.*, 2014).

Em concentrações adequadas estas moléculas possuem papel na sinalização e proliferação celular (Matés *et al.*, 1999; Saeidniaa & Abdollahi, 2013). No entanto, o aumento na produção de EROs ocasionam danos oxidativos, devido a indução de efeitos deletérios tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, que geram alterações na estrutura e funções

celulares, caracterizando o quadro de estresse oxidativo (Dröge, 2002; Dasgupta & Klein, 2014).

Para manter a homeostase, o organismo dispõe da ação de antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos. O mecanismo endógeno enzimático inclui a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que atuam impedindo e/ou controlando a formação de EROs (Nickel *et al.*, 2014). Dentre os antioxidantes endógenos não enzimáticos encontram-se a glutathione e proteínas do plasma, que podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos causados por EROs (Frei *et al.*, 1988). Ambos os mecanismos antioxidante atuam em associação com substâncias exógenas provenientes da alimentação, como as vitaminas A, C e E (Bahadoran, 2013).

A SOD pode ser encontrada no citoplasma, dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn) e, na mitocôndria, onde precisa do manganês como co-fator (SOD-Mn). Esta enzima transforma dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio (Green *et al.*, 2004). Já as enzimas CAT e GPx agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio formado pela atuação da SOD. A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio para seus correspondentes alcoóis através da conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG). A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 e, a ação integrada de CAT e GPx é fundamental para o organismo, uma vez que o peróxido de hidrogênio, por meio das reações de Fenton, com a participação do metal ferro, resulta na geração do radical $\cdot OH$, para o qual não há sistema enzimático de defesa especializado (Barbosa *et al.*, 2010).

As substâncias antioxidantes não enzimáticas podem atuar em diversas etapas do processo oxidativo, por diferentes mecanismos, sendo classificadas em antioxidantes primários e secundários. Os antioxidantes primários são compostos capazes de inibir a oxidação pela inativação de radicais livres, proveniente da doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando os radicais livres em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários podem atuar através da ligação de íons metálicos e inativação de EROs, pela inibição da reação de Fenton (Silva *et al.*, 2010).

A condição de desequilíbrio entre a produção de EROs e a atuação do mecanismos de defesa antioxidante no organismo pode ser ocasionada por fatores exógenos como xenobióticos, radiações ionizantes e metais pesados, dentre outros. A peroxidação lipídica é a principal causa da deterioração celular proveniente deste quadro, resultante da formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (Lykkesfeldt, 2007).

2.2. *Diabetes mellitus*

O quadro de diabetes é caracterizado pela hiperglicemia crônica, com consequente desenvolvimento de distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, em decorrência à resposta deficiente na secreção ou ação de insulina. O diabetes pode ser classificado em tipo1, quando há destruição das células β pancreáticas levando à deficiência integral de insulina e, o tipo 2, caracterizado por graus variados de resistência e deficiência na secreção de insulina (Pinget & Boullu-Sanchis, 2002).

A exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia leva a anormalidades estruturais e funcionais do endotélio (Schalkwijk & Stehouwer, 2005). Há indícios que estas alterações vasculares estejam ligadas a redução da capacidade antioxidante endógena nos indivíduos diabéticos, dificultando a neutralização de EROs (Santini *et al.*, 1997). Este quadro envolve aumento no fluxo glicose através da via de polióis (Gabbay, 1975), ativação de isoformas de proteína quinase C (Koya & King, 1998) e formação de produtos de glicação avançada (AGEs) (Bensellam *et al.*, 2012).

A hiperglicemia associada ao excesso de EROs reduz os níveis de óxido nítrico (NO) (Darley-Usmar *et al.*, 1995) ativando a aldose redutase, uma enzima da via dos polióis. O aumento do fluxo de glicose pela via dos polióis determina o aumento da conversão de glicose a sorbitol, reduzindo NADPH e glutathione. O sorbitol é convertido à frutose, aumentando a síntese diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da proteína quinase C (PKC), desencadeando diversas anormalidades estruturais e funcionais que caracterizam o diabetes.

Além disso, é possível que a ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia seja resultado de glico-oxidação, uma vez que oxidantes como o H_2O_2 , podem ativar a PKC (Brownlee, 2001). A elevação dos níveis de frutose leva a um aumento na formação de seus derivados frutose-3-fosfato e 3-deoxiglicosonas, os quais são agentes da glicação não enzimática assim como a glicose, resultando na formação de AGEs (Singh *et al.*, 2014).

Os mecanismos que têm sido descritos para o controle da hiperglicemia incluem a inibição de enzimas α -amilase e α -glicosidase (Garza *et al.*, 2013),

inibição da absorção de glicose dependente de Na⁺ por proteínas transportadoras SGLT1 e SGLT2 (Zambrowicz *et al.*, 2013; Fujita & Inagaki, 2014), translocação de GLUT4 (Gandhi *et al.*, 2013) e, aumento da secreção de insulina. Nesta perspectiva, as plantas medicinais com potencial antioxidante e regulador de mecanismos controladores da hiperglicemia, constituídas por compostos fenólicos e terpenos são utilizadas para o tratamento do diabetes (Sato *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2013; Koneri *et al.*, 2014) e novos estudos sobre a atuação destes produtos naturais na fisiopatologia do diabetes são necessários a fim de encontrar novas alternativas terapêuticas.

2.3. Plantas medicinais

As plantas são utilizadas como medicamento desde o início da civilização, sendo o método terapêutico mais antigo que se conhece. Suas propriedades medicinais são atribuídas à presença de compostos bioativos, proveniente de seu metabolismo, os quais são classificados em primários e secundários. O metabolismo primário envolve processos metabólicos que desempenham função essencial para a vida do vegetal, como a fotossíntese e a respiração, com a produção dos metabólitos primários, sendo estes carboidratos, lipídeos e proteínas (Bourgaud *et al.*, 2001).

O metabolismo secundário envolve processos metabólicos responsáveis pela manutenção da planta no ambiente, possui importante função na adaptação do vegetal e contribui para o funcionamento dos processos ecológicos (Aerts *et al.*, 1991; Taiz & Zeiger, 2013). Os metabólitos secundários são responsáveis por diversas atividades biológicas, podem atuar como

antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentam atividades tóxicas para outras plantas, além de constituir importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (Li *et al.*, 1993; Taiz & Zeiger, 2013), aumentando a probabilidade de sobrevivência de uma espécie. Os metabólitos secundários têm origem a partir do metabolismo da glicose, através das vias do ácido chiquímico, acetato e, combinação de ambas as vias, sendo classificados de acordo com sua rota biosintética em terpenoides, compostos fenólicos e alcalóides (Crozier *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos têm se destacado em estudos científicos por contribuir com a prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, devido à sua capacidade de eliminar e estabilizar radicais livres, inibir reações de peroxidação lipídica, assim como pelas propriedades de quelação ou complexação de metais, atribuídas à presença do anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (Crozier *et al.*, 2006).

2.4. *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), conhecida popularmente como aroeira-vermelha, pimenta-rosa ou aroeira-pimenteira é uma espécie arbórea pioneira, nativa do Brasil (Corrêa, 1974), tem porte médio e rápido crescimento, podendo atingir até 10 m de altura (Figura 1). É uma planta medicinal, inclusa na Farmacopéia Brasileira, utilizada popularmente no tratamento de feridas e úlceras da pele, tumores, diarreia, artrite, infecções do trato urinário e do sistema respiratório (Morton, 1978; Brandão *et al.*, 2006).

Os frutos de *S. terebinthifolius* são utilizados para fins alimentícios, o que amplia a perspectiva de exploração econômica desta espécie (Lenzi & Orth, 2004). Além disso, essa planta pode ocupar diversos tipos de ambientes e formações vegetais (Fleig & Klein, 1989), favorecendo e aumentando as chances de cultivo, o que eleva seu potencial como alternativa para a diversificação agrícola, tanto para uso alimentício, quanto farmacêutico, além de ser utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas.

A identificação dos constituintes químicos presentes nas plantas permite a sua correlação com suas atividades biológicas específicas. Estudos fitoquímicos têm relatado a presença de terpenoides e compostos fenólicos na família Anacardiaceae, no gênero *Schinus* e principalmente na espécie *S. terebinthifolius* (Correia *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 1977; Cerucks *et al.*, 2007). Todos esses compostos bioativos são produzidos pelo metabolismo secundário do vegetal e podem ter aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia. *S. terebinthifolius* possui elevado conteúdo de derivados fenólicos, tais como o ácido gálico, metil galato, taninos e flavonoides, que são responsáveis por suas atividades biológicas (Queires *et al.*, 2006; Ceruks *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2012).

As folhas de *S. terebinthifolius* Raddi são ricas em terpenos e compostos fenólicos (Johann *et al.*, 2007; El-Massry *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2012; Estevão *et al.*, 2013). Em estudos anteriores observou-se o efeito citotóxico do óleo essencial extraído das folhas sobre várias linhagens de células, principalmente em leucemia e carcinoma cervical humano (Santana *et al.*, 2012). O óleo essencial das folhas também apresentou ação no tratamento de feridas cutâneas (Estevão *et al.*, 2013).

Além disso, o potencial antioxidante e antimicrobiano de *S. terebinthifolius* Raddi (Johann *et al.*, 2007; El-Massry *et al.*, 2009) foi observado no extrato etanólico das folhas, e atribuídos à presença de compostos fenólicos e terpenoides. O extrato aquoso das folhas apresentou atividade antiproliferativa em câncer de próstata (Queires *et al.*, 2006) e, o extrato metanólico das folhas apresentou atividade antigenotóxica e antimutagênica (Fedel-Miyasato *et al.*, 2014). Três triterpenos isolados das folhas apresentaram atividade antiparasitária (Morais *et al.*, 2014).

Os frutos de *S. terebinthifolius* Raddi são ricos em óleos essenciais e triterpenos (Kaistha & Kier, 1962; Richter *et al.*, 2010). Estudos revelaram o potencial antioxidante, anticancer e anti-hiperalgésica do óleo essencial extraído dos frutos (Bendaoud *et al.*, 2010; Matsuo *et al.*, 2011; Piccinelli *et al.*, 2014). Além de propriedade antifúngica (Johann *et al.*, 2010) e inibidora da fosfolipase A2, caracterizando sua ação anti-inflamatória (Jain *et al.*, 1995), ambas atividades são atribuídas a presença de triterpenos. O extrato alcoólico dos frutos apresentou efeito antimicrobiano (Degaspari *et al.*, 2005).

Estudos com o extrato hidroalcoólico da casca do caule apresentaram efeito cicatrizante (Lucena *et al.*, 2006; Coutinho *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). Além disso, foi verificada a atividade antiulcerogênica do decocto da casca do caule (Carlini *et al.*, 2010), indicando sua eficácia como gastroprotetor. A tintura da casca do caule de *S. terebinthifolius* apresentou atividade fungistática e fungicida (Alves *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2013).

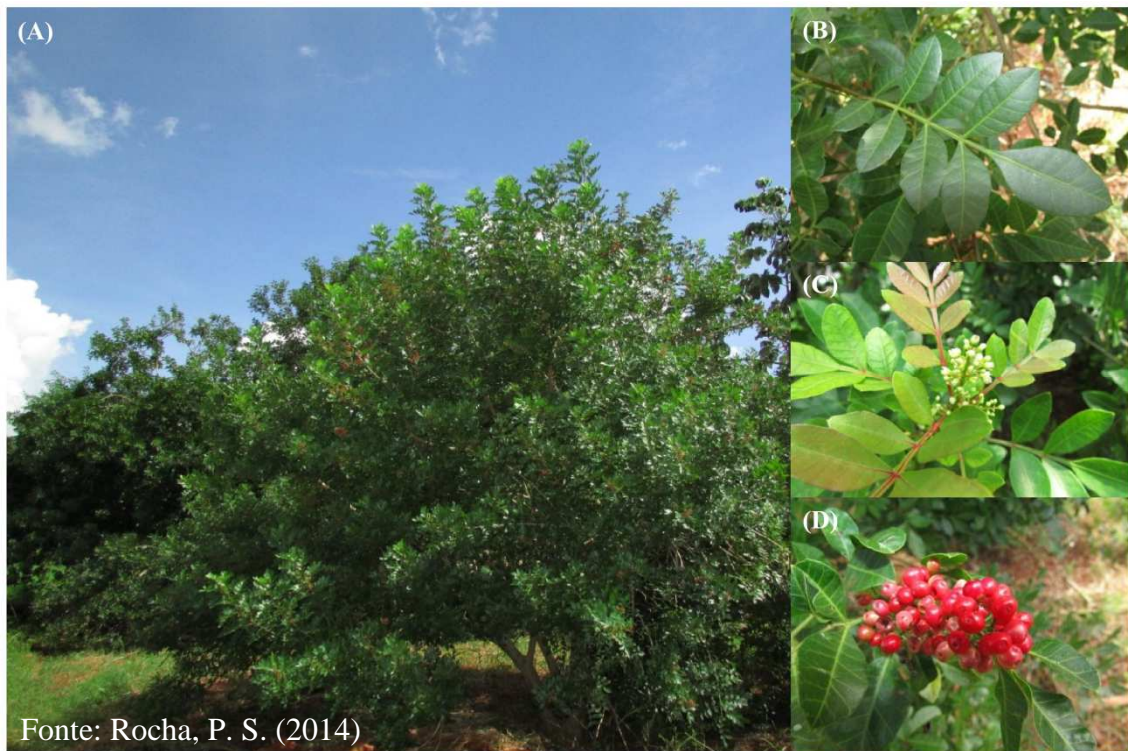


Figura 1. *S. terebinthifolius* Raddi: (A) árvore, (B) folhas, (C) flores e (D) frutos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade antioxidante e anti-hiperglicemiante do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi, bem como sua composição química.

3.2. Específicos

- Determinar a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e ácido ascórbico do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi;
- Investigar a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi;
- Avaliar a atividade anti-hiperglicemiante e antidiabética do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi em camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos e diabéticos.

4. REFERÊNCIAS

Aerts R. J., Snoeijer, W., Van der Meijden, E., Verpoorte, R. Allelopathic inhibition of seed germination by Cinchona alkaloids? *Phytochemistry*, 30: 2947-2950, 1991.

Alves, L. A., Freires, I. A., Pereira, T. M., Souza, A., Lima, E. O., Castro, R. D. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71: 965-971, 2013.

Alves, L. A., Freires, I. A., Souza, T. M. A., Castro, R. D. In vitro activity of *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree) on *Candida tropicalis* growth and cell wall formation. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 25: 287-292, 2012.

Bahadoran, Z., Mimiran, P., Azizi, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12: 1-9, 2013.

Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, 23: 629-643, 2010.

Bauer, A. & Bronstrup, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural Product Reports*, 31: 35-60, 2014.

Bendaoud, H.; Romdhane, M.; Souchard, J. P.; Cazaux, S.; Bouajila, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. *Journal of Food Science*, 75: 466-472, 2010.

Bensellam, M., Laybutt, D. R., Jonas, J. C. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 364: 1-27, 2012.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851, 2001.

Brandão, M. G. L., Consenza, G. P., Moreira, R. A., Monte-Mor, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 408-420, 2006.

Brandão, M. G. L., Naiara N. S. Zanetti, N. N. S., Oliveira, P., Grael, C. F. F., Santos, A. C. P., Monte-Mór, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19 th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 141-148, 2008.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820, 2001.

Carlini, E. A., Duarte-Almeida, J. M., Rodrigues, E., Tabach, R., Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 140-146, 2010.

Ceruks, M., Romoff, P., Fávero, O. A., Lago, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*, 30: 597-599, 2007.

Corrêa, M. P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional, 1974.

Correia, S. J.; David, J. P.; David, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, 29: 1287-1300, 2006.

Cordell, G. A. Biodiversity and drug drug discovery: a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55: 1371-1373, 2000.

Coutinho, I. H. I. L. S., Torres, O. J. M., Matias, J. E. F., Coelho, J. C. U., Stahlke-Júnior, H. J., Agulham, M. A., Bachle, E., Camargo, P. A. M., Pimentel, S. K., Freitas, A. C. T. *Schinus terebinthifolius* Raddi and its influence in the healing process of colonic anastomosis. Experimental study in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21: 49-54, 2006.

Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Editora Backwell, 2006.

Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*, 369: 131-135, 1995.

Dasgupta, A. & Klein, K. Oxidative Stress Related to Other Diseases. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*, 11: 185-207, 2014.

Deckert, T. & Poulsen, J. Prognosis of diabetes with onset before age of thirty-one. *Diabetologia*, 14: 363-377, 1978.

Degaspari, C. H.; Waszczyński, N.; Prado, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências e Agrotecnologia*, 29: 617-622, 2005.

Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95, 2002.

El-Massry, K., El-Ghorab, A., Shaaban, H., Shibamoto, T. Chemical Compositions and Antioxidant/Antimicrobial Activities of Various Samples Prepared from *Schinus terebinthifolius* Leaves Cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5265-5270, 2009.

Estevão, L. R. M., Mendonça, F. S., Baratella-Evêncio, L., Simões, R. S., Barros, M. E. G., Arantes, R. M. E., Rachid, M. A., Evêncio-Neto, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 28: 202-209, 2013.

Fedel-Miyasato, L. E. S., Formagio, A. S. N., Auharek, S. A., Kassuya, C. A. L., Navarro, S. D., Cunha-Laura, A. L., Monrea, A. C. D., Vieira, M. C., Oliveira, R. J. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: A comparative study. *Genetics and Molecular Research*, 13: 3411-3425, 2014.

Fleig, M. & Klein R. M. Anacardiáceas: flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1989.

Frei, B., Stocker, R., Ames, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 9748-9752, 1988.

Fujita, Y & Inagaki, N. Renal sodium glucose cotransporter 2 inhibitors as a novel therapeutic approach to treatment of type 2 diabetes: Clinical data and mechanism of action. *Journal of Diabetes Investigation*, 5: 265-275, 2014.

Gabbay, K. H. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annual Review of Medicine*, 26: 521-536, 1975.

Gandhi, G. R., Stalin, A., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., Paulraj, M. G., Vishal, R. Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 2243-2255, 2013.

Gao, J., Xu, P., Wang, Y., Wang, Y., Hochstetter, D. Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against α -amylase and α -glucosidase *in vitro*. *Molecules*, 18: 11614-11623, 2013.

Garza, A. L., Etxeberria, U., Lostao, M. P., San Román, B., Barrenetxe, J., Martínez, J. A., Milagro, F. I. Helichrysum and grapefruit extracts inhibit carbohydrate digestion and absorption, improving postprandial glucose levels and hyperinsulinemia in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 12012-12019, 2013.

Green, K., Brand, M. D., Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53: 110-118, 2004.

Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142: 231-255, 2004.

Jain, M. K., Yu, B. Z., Rogers, J. M., Smith, A. E., Boger, E. T. A., Ostrander, R. L., Rheingold, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, 39: 537-547, 1995.

Johann, S., Pizzolatti, M. G., Donnici, C. L., Resende, M. A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 632-637, 2007.

Johann, S.; Sá, N. P.; Lima, L. A. R. S.; Cisalpino, P. S.; Cota, B. B.; Alves, T. M. A.; Siqueira, E. P.; Zani, C. L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9: 1-6, 2010.

Kaistha, K. K. & Kier, L. B. Structural Studies on the Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51: 1136-1139, 1962.

Koneri, R. B., Samaddar, S, Ramaiah, C. T. Antidiabetic activity of a triterpenoid saponin isolated from *Momordica cymbalaria* Fenzl. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52: 46-52, 2014.

Koya, D., King, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47: 859-866, 1998.

Lenzi, M. & Orth, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26: 198-201, 2004.

Li, J., Ou-Lee, T. M., Raba, R., Amundson, R. G., Last, R. L. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell*, 5: 171-179, 1993.

Lloyd, H. A.; Jaouni, T. M.; Evans, S. L.; Morton, J. F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, 16: 1301-1302, 1977.

Lucena, P. L. H., Ribas-Filho, J. M., Mazza, M., Czczko, N. G., Dietz, U. A., Correa-Neto, M. A., Henriques, G. S., Santos, O. J., Ceschin, A. P., Thiele, E. S. Evaluation of the aroreira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rat. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21: 46-51, 2006.

Lykkesfeldt, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380: 50-58, 2007.

Nickel, A., Kohlhaas, M., Maack, C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73: 26-33, 2014.

Matés, J. M., Gomes, C. P., Castro, I. N. Antioxidant enzymes human diseases. *Chimical Biochemistry*, 32: 595-603, 1999.

Matsuo, A. L., Figueiredo, C. R., Arruda, D. C., Pereira, F. V., Scutti, J. A. B., Massaoka, M. H., Travassos, L. R., Sartorelli, P., Lago, J. H. G. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411: 449-454, 2011.

Morais, T. R., da Costa-Silva, T. A., Tempone, A. G., Borborema, S. E., Scotti, M. T., de Sousa, R. M., Araujo, A. C., de Oliveira, A., de Morais, S. A., Sartorelli, P., Lago, J. H. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (anacardiaceae): structure/activity relationships. *Molecules*, 19: 5761-5776, 2014.

Morton J. F. Brazilian pepper - its impact on people, animals and the environment. *Economic Botany*, 32: 353-359, 1978.

Piccinelli, A. C., Santos, J. A., Konkiewitz, E. C., Oesterreich, S. A., Formagio, A. S., Croda, J., Ziff, E. B., Kassuya, C. A. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience*, 0: 1-8, 2014.

Pinget, M. & Boullu-Sanchis, S. Physiological basis of insulin secretion abnormalities. *Diabetes & Metabolism*, 28: 21-32, 2002.

Queires, L. C. S., Fauvel-Lafève, F., Terry, S., Taille, A., Kouyoumdjian, J. C., Chopin, D. K., Vacherot, F., Rodrigues, L. E. A., Crépin, M. Polyphenols Purified from the Brazilian Aroeira Plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) Induce Apoptotic and Autophagic Cell Death of DU145 Cells. *Anticancer Research*, 26: 379-388, 2006.

Richter, R., Reuß, S. H., König, W. A. Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Phytochemistry*, 71: 1371-1374, 2010.

Saeidniaa, S. & Abdollahi, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273: 442-455, 2013.

Santana, J. S.; Sartorelli, P.; Guadagnin, R. C.; Matsuo, A. L.; Figueiredo, C. R.; Soares, M. G.; Silva, A. M.; Lago, J. H. G. Essential oils from *Schinus*

terebinthifolius leaves – chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. *Pharmaceutical Biology*, 50: 1248-1253, 2012.

Santini, S. A., Marra, G., Giardina, B., Cotroneo, P., Mordente, A., Martorana, G. E. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*, 46: 1853-1858, 1997.

Santos, O. J., Barros-Filho, A. K. D., Malafaia, O., Ribas-Filho, J. M., Santos, R. H. P., Santos, R. A. P. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) in the healing process of gastrorrhaphy in rats. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 25: 140-146, 2012.

Sato, S., Takeo, J., Aoyama, C., Kawahara, H. Na⁺-Glucose cotransporter (SGLT) inhibitory flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 3445-3449, 2007.

Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, 109: 143-159, 2005.

Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A. S. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18: 1-14, 2014.

Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias*, 31: 669-682, 2010.

Taiz, L. & Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Artmed, 2013.

Zambrowicz, B., Ding, Z. M., Ogbaa, I., Frazier, K., Banks, P., Turnage, A., Freiman, J., Smith, M., Ruff, D., Sands, A., Powell, D. Effects of LX4211, a dual SGLT1/SGLT2 inhibitor, plus sitagliptin on postprandial active GLP-1 and glycemic control in type 2 diabetes. *Clinical Therapeutics*, 35: 273-285, 2013.

Yan, L. J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *Journal of Diabetes Research*, 1: 1-11, 2014.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27: 1047-1053, 2004.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1: *Schinus terebinthifolius* Raddi reduz estresse oxidativo induzido por doxorubicina em eritrócitos humanos

Artigo 2: Qualidade microbiológica, toxicidade, potencial anti-hipeglicemiante e antidiabético de *Schinus terebinthifolius* Raddi

***Schinus terebinthifolius* Raddi reduz estresse oxidativo induzido por doxorubicina em eritrócitos humanos**

Paola dos Santos da Rocha^a, Priscilla Pereira de Toledo Espíndola^a, Jaqueline Ferreira Campos^a, Valéria Nunes de Souza^b, Anelise Samara Nazari Formagio^a, Maria do Carmo Vieira^a, Luiza Antas Rabelo^b, Edson Lucas dos Santos^a, Kely de Picoli Souza^{a*}

^aUniversidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804970 Dourados, MS, Brasil

^bUniversidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, CEP: 57072-900, Maceió, AL, Brasil.

^c Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE.

*Autor correspondente; e-mail: kelypicoli@gmail.com; Tel.: +00-55-67-8131-8870.

Resumo

A doxorubicina (DOX) é um antineoplásico cujos efeitos deletérios em células não cancerígenas, incluem o estresse oxidativo. Neste estudo foi investigada a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (EMFS) e seu potencial na redução do estresse oxidativo induzido por DOX em eritrócitos humanos. A atividade antioxidante do EMFS foi investigada pelos métodos de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), regulação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e, pela inibição da peroxidação lipídica observada pelo percentual de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos induzidos por 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) e DOX, seguida pela dosagem de malondialdeído (MDA) gerado. O EMFS apresentou IC₅₀ no ensaio de DPPH semelhante ao ácido ascórbico, e foi capaz de aumentar a atividade enzimática de SOD. A DOX resultou no aumento da hemólise oxidativa e níveis de MDA em eritrócitos, sendo o EMFS capaz de reduzir ambos os parâmetros (P <0,05). Não foi observada alteração da ação citotóxica de DOX em células leucêmicas K562 tratadas com o EMFS. Em conjunto, os dados mostram que o EMFS possui atividade antioxidante e que esta é capaz de reduzir o estresse oxidativo gerado pela DOX sem interferir na ação citotóxica da droga, o que indica seu potencial uso como adjuvante do antineoplásico.

Palavras-chave: aroeira-vermelha, compostos fenólicos, EROs, antineoplásico

1. Introdução

A doxorubicina (DOX) é amplamente utilizada para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo leucemias agudas, linfomas malignos, e uma variedade de tumores sólidos. No entanto, seu uso prolongado pode ocasionar efeitos tóxicos secundários como a cardiotoxicidade [1, 2]. Dentre os mecanismos de ação antitumoral da DOX está inclusa a inibição da topoisomerase II e intercalação da droga entre pares de bases de DNA, além do aumento do estresse oxidativo, considerado um fator limitante para sua utilização prolongada, em decorrência do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) [3, 4].

Tendo em vista o estresse oxidativo promovido pelo uso clínico de DOX, buscam-se compostos com propriedade antioxidante, mas que não interfiram no potencial terapêutico da droga [5-7]. Dentre os compostos antioxidantes mais utilizados e investigados contra a toxicidade da DOX, vêm se destacando os terpenoides [8, 9] e compostos fenólicos [10-12]. Nos últimos anos, tem sido crescente o interesse pelas propriedades farmacológicas das plantas medicinais, a fim de originar novos fitoterápicos, medicamentos semi-sintéticos e derivados de produtos naturais, com menores efeitos colaterais e que possam auxiliar e/ou atuar no tratamento de diversas doenças [13, 14].

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), é uma planta medicinal, popularmente conhecida como aroeira-vermelha, pimenta-rosa ou aroeira-pimenteira, é uma espécie arbórea, pioneira, nativa do Brasil. Esta planta esta inclusa na Farmacopeia Brasileira, é utilizada popularmente no tratamento de feridas e úlceras da pele, tumores, diarreia, artrite, infecções do trato urinário e

do sistema respiratório [15, 16]. As atividades antiinflamatória [17], antimicrobiana [18] e antitumoral [19, 20] das suas folhas e frutos desta planta têm sido investigadas e descritas em diferentes modelos farmacológicos, e são atribuídas aos seus constituintes químicos, tais como terpenoides e compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos e alguns terpenoides, como carotenoides, se destacam por apresentarem propriedades antioxidantes, provenientes da capacidade de se complexarem com macromoléculas e íons metálicos, inativar reações radicalares e prevenir a conversão de hidroperóxido em oxirradicais reativos [21, 22]. Além destes, o organismo dispõe de antioxidantes endógenos enzimáticos que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), que atuam impedindo e/ou controlando a formação de EROs [23]. Os antioxidantes mantêm o equilíbrio entre a formação e eliminação de compostos oxidantes, inibindo a formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como malondialdeído (MDA), o qual tem sido associado ao desenvolvimento e complicações de várias doenças [24, 25].

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos, saponinas e ácido ascórbico do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* (EMFS), seu potencial antioxidante e efeito sobre a citotoxicidade da DOX em células leucêmicas K562.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e preparação do EMFS

Folhas de *S. terebinthifolius* Raddi foram coletadas sob as coordenadas S 22°11'43.7568" W 54°56'8.0916". Folhas secas (2,128 g) foram mantidas em maceração exaustiva em metanol. O filtrado foi concentrado sob vácuo a 45 °C e liofilizado para se obter o extrato bruto. O rendimento foi de aproximadamente 13 %. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil DDMS (n°4889).

2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais do EMFS foi investigado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Meda et al. [26] sendo lido em absorvância de 760 nm e expresso em mg equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG.g⁻¹ de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3. Conteúdo de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado de acordo com método descrito por Liberio et al. [27], sendo lido em absorvância de 415 nm e expresso em mg equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ.g⁻¹ de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4. Quantificação de taninos

O conteúdo de taninos foi avaliado utilizando o método descrito por Agostini-Costa et al. [28], sendo lido em absorvância de 500 nm e expresso em mg equivalentes de catequina por g de extrato (mg EC.g^{-1} de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi investigado utilizando o método de titulação descrito por Benassi et al. [29], sendo expresso em mg equivalentes de ácido ascórbico por g de extrato (mg EAA.g^{-1} de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6. Presença de saponinas

A presença de saponinas foi determinada utilizando o método descrito por Tirloni et al. [30]. Para este ensaio 10 mg do EMFS foram solubilizados em 2 mL de etanol 80 % e, em seguida, adicionados 5 mL de água fervente. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 20 min. Nesse ensaio a presença de espuma indica resultado positivo para saponinas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.7. Determinação da atividade antioxidante

2.7.1. Ensaio de captura do radical livre DPPH

O ensaio de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi realizado de acordo como o método descrito por Campos et al. [31]. Diferentes concentrações de EMFS (0,1-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram misturadas à solução de DPPH (0,11 mM) em etanol 80 %. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente no escuro durante 30 min, e lida a 517 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle. A porcentagem de inibição do DPPH nas amostras foi calculada pela equação descrita a seguir. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

$$\% \text{ Inibição DPPH} = (1 - \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (1)$$

2.8. Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes

Para avaliar os efeitos do EMFS no equilíbrio redox, a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx foi avaliada em lisados de eritrócitos humanos. Em todos os ensaios, a diluição de eritrócitos foi utilizada na proporção de 1:200 (25 mmol.L^{-1} tampão fosfato de potássio, pH 7,5, suplementado com 0,1 % de albumina sérica bovina e 1 mmol.L^{-1} de EDTA). Todos os ensaios foram realizados em microplacas (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer; Thermo Scientific[®], Vantaa, Finlândia). O EMFS foi testado nas concentrações de 50-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

2.8.1. Atividade de SOD

Eritrócitos foram incubados com diferentes concentrações do EMFS durante 20 min a 37 °C. A SOD foi determinada utilizando o kit comercial Fluka® (Sigma-Aldrich®, Seelze, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são expressos como unidade internacional total (UI) normalizados para a concentração de hemoglobina em mg.mL^{-1} (UI.Hb, mmol.L^{-1}).

2.8.2. Atividade de CAT

Eritrócitos foram incubados com diferentes concentrações de EMFS durante 20 min a 37 °C. A atividade de CAT foi determinada espectrofotometricamente pela taxa de decomposição de H_2O_2 , de acordo com o método descrito por Xu et al. [32], com modificações para microplacas. Os dados foram normalizados para níveis de hemoglobina, e a atividade é expressa como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL.mM Hb}^{-1}$.

2.8.3. Atividade de GPx

Eritrócitos foram incubados com diferentes concentrações de EMFS durante 20 min a 37 °C. Atividade de GPx foi determinada usando método colorimétrico, conforme descrito por Paglia & Valentine [33], com adaptações para microplacas. Os dados foram normalizados pelos níveis de hemoglobina e a atividade enzimática é expressa em $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL.Hb}$, mmol.L^{-1} .

2.9. Ensaio antioxidante utilizando modelo de eritrócitos humanos

2.9.1. Preparação de suspensões de eritrócitos

Foram coletados 15 mL de sangue periférico de doadores saudáveis (procedimento aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Centro Universitário da Grande Dourados-UNIGRAN sob no 123/12). O sangue foi centrifugado a 2000 g, o plasma e a camada leucocitária foram descartados. Os eritrócitos foram lavados três vezes em NaCl 0,9 % e, após as lavagens, foram preparadas duas suspensões de eritrócitos, a 10 e 20 %, em NaCl 0,9 %.

2.9.2. Ensaio de hemólise e inibição da hemólise oxidativa

A capacidade hemolítica e inibição da hemólise oxidativa do EMFS foi determinada seguindo método descrito por Campos et al. [31], com modificações. Os ensaios foram realizados com suspensões de eritrócitos 10 %. Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C, durante 30 min em tubos de ensaio na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico ou EMFS (50-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Posteriormente foi adicionado NaCl 0,9 % ou 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 50 mM, para avaliar a capacidade hemolítica e inibição da hemólise oxidativa, respectivamente. As amostras permaneceram a 37 °C durante 240 min, com agitação periódica. O etanol foi utilizado como controle do solvente na concentração final de 0,8 %. A porcentagem de hemólise foi determinada através da mensuração da absorbância a 540 nm, pela equação descrita a seguir. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

$$\% \text{ Hemólise} = \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{hemólise total}} \times 100 \quad (2)$$

2.9.3. Efeito da inibição da peroxidação lipídica

Os ensaios foram realizados com suspensões de eritrócitos a 20 %. Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C durante 30 min na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico ou EMFS (50-500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Em seguida, AAPH 50 mM foi adicionado à solução de eritrócitos, sendo incubado a 37 °C durante 4 h, com agitação periódica. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 2000 g e, alíquotas de 500 μL do sobrenadante foram transferidas para tubos com 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 10 nmol. Como padrão, 500 μL de solução de MDA 20 mM foram adicionados a 1 mL de TBA. As amostras foram incubadas a 96 °C durante 45 min. Em seguida, foram adicionados 4 mL de álcool n-butílico e centrifugadas a 2000 g. A absorbância dos sobrenadantes foi mensurada a 532 nm. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. A concentração de MDA nas amostras foi expressa em $\text{nmol}.\text{mL}^{-1}$, obtida com a equação descrita a seguir.

$$\text{MDA} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \times (20 \times 220,32 / \text{Abs}_{\text{MDA}}) \quad (3)$$

2.10. Ensaio de hemólise oxidativa e peroxidação lipídica induzida por DOX em modelo de eritrócitos humanos

2.10.1. Hemólise oxidativa

A capacidade do EMFS em reduzir a hemólise oxidativa ocasionada pela DOX foi determinada utilizando suspensão de eritrócitos 10 % (preparados como descrito no item 2.9.1). Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C por 30 min com diferentes concentrações do EMFS (50-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Posteriormente foi adicionada DOX (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo mantidos a 37 °C durante 240 min, com agitação periódica. Após este período a porcentagem de hemólise foi determinada através da mensuração da absorbância a 540 nm, pela equação 2. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

2.10.2. Peroxidação lipídica

A capacidade do EMFS em reduzir o estresse oxidativo em eritrócitos humanos induzido por DOX foi determinada pela redução de MDA gerado. Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C durante 30 min na presença de diferentes concentrações do EMFS (50-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida, DOX (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada à solução de eritrócitos, sendo incubado a 37 °C durante 4 h, com agitação periódica. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 2000 g e, alíquotas de 500 μL do sobrenadante foram transferidas para tubos com 1 mL de TBA 10 nmol. Como padrão, 500 μL de solução de MDA (20 mM) foram adicionados a 1 mL de TBA. As amostras foram incubadas a 96 °C durante 45 min. Em seguida, foram adicionados 4 mL de álcool n-butílico e centrifugadas a 2000 g. Os sobrenadantes das amostras

foram removidos e a absorbância foi mensurada a 532 nm. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. A concentração de MDA nas amostras foi expressa em nmol.mL^{-1} , segundo a equação 3.

2.11. Ensaio de viabilidade celular pelo teste de exclusão de azul de Tripán

Para avaliar o efeito do EMFS sobre a ação citotóxica de DOX, foi realizado ensaio de viabilidade com células leucêmicas K562 através do teste de exclusão de azul de tripan. O ensaio foi realizado de acordo com método descrito por Franchi et al. [34] com modificações.

Para isso, células K562 ($10^5.\text{mL}^{-1}$) em meio RPMI suplementado com 10 % soro fetal bovino inativado, 100 U.mL^{-1} de penicilina e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina foram plaqueadas em placa de 96 poços, seguido pela adição de DOX (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e diferentes concentrações do EMFS (50-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As células foram incubadas em um volume final de 100 μL durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ em uma atmosfera de CO_2 5 % umidificada. Após o período de incubação, 100 μL de azul de tripan 0,4 % foram adicionados em cada poço, sendo transferidos 10 μL para contagem das células em Câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pela porcentagem de células viáveis após 24 h em relação às células controles, que não receberam tratamento. Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

2.12. Análise estatística

Os dados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para análise e comparação dos resultados obtidos foi empregado o teste de variância de uma via, ANOVA, com pós-teste *Student Newman Keuls*. Os dados foram considerados significantes quando $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos, ácido ascórbico e saponinas

No EMFS foi verificada a presença de $145,45 \pm 4,5$ mg EAG.g⁻¹ de extrato de compostos fenólicos totais, $12,46 \pm 1,6$ EQ.g⁻¹ de extrato de flavonoides, $129,36 \pm 0,9$ mg EC.g⁻¹ de extrato de taninos e $7,78 \pm 0,5$ mg EAA.g⁻¹ de extrato de ácido ascórbico. Não foi verificada a presença de saponinas.

3.2. Atividade antioxidante

3.2.1. Captura do radical livre DPPH

Considerando a presença de substâncias com potencial antioxidante, foi realizado ensaio *in vitro* para avaliar a atividade de captura do radical livre DPPH pelo EMFS. A concentração que inibiu 50 % dos radicais livres DPPH (IC₅₀) e a atividade máxima apresentada pelo EMFS foi semelhante às apresentadas pelo ácido ascórbico, como mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Capacidade do ácido ascórbico e do extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* (EMFS) de capturar o radical livre DPPH, valores de IC₅₀ e atividade máxima (A_{max}).

	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	A _{max} (%)	A _{max} (µg.mL ⁻¹)
Ácido ascórbico	2,3 ± 0,4	95,7 ± 0,2	50
EMFS	3,7 ± 1,6	94,2 ± 0,4	50

Os valores são expressos como média ± SEM.

3.2.2. Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx

As atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram avaliadas em lisados de eritrócitos humanos. O EMFS aumentou a atividade enzimática da SOD em todas as concentrações avaliadas em aproximadamente 25 ± 2 % (Figura 1A), entretanto não influenciou a atividade da CAT (Figura 1B) e GPx (Figura 1C), exceto na maior concentração avaliada (500 µg.mL⁻¹).

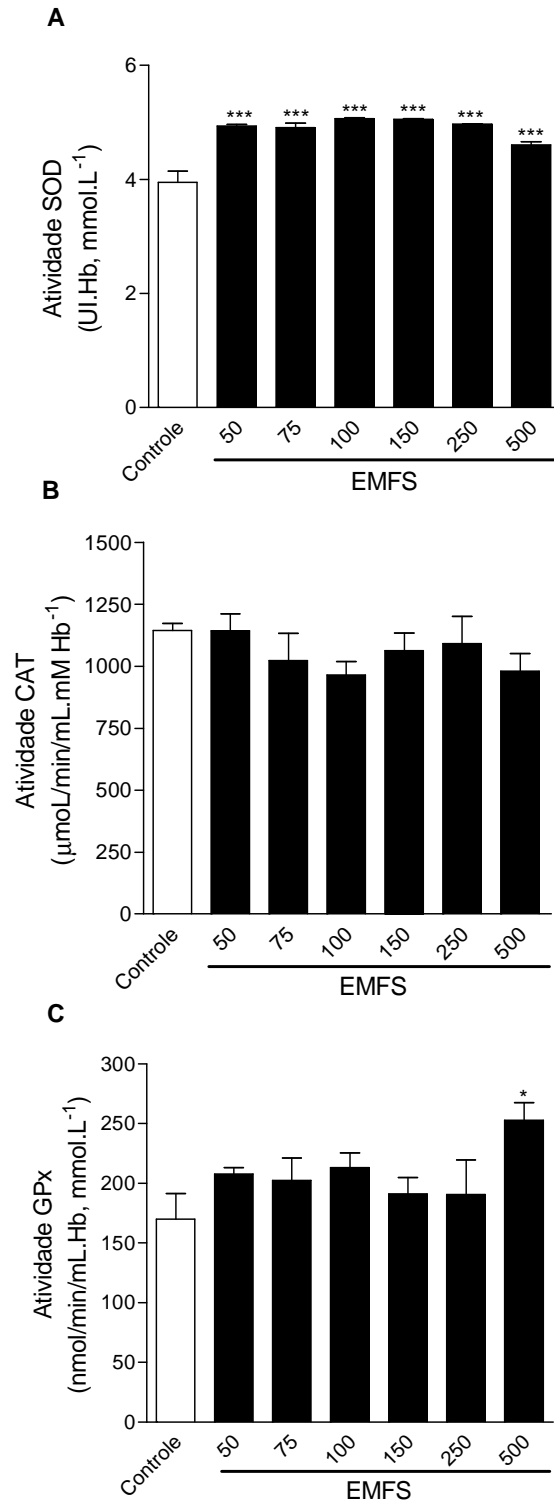


Figura 1. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A), catalase (B), e glutaciona peroxidase (C) em lisados de eritrócitos incubados

com EMFS em diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os valores são expressos como média \pm SEM. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparados ao grupo Controle.

3.2.3. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa

O EMFS também foi avaliado quanto à sua propriedade hemolítica e sua capacidade de proteger os eritrócitos contra hemólise oxidativa. O EMFS e o controle ácido ascórbico não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações até $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ao longo do período experimental de 240 min (Figura 2A), o que indica que estes não são tóxicos para este modelo celular nas concentrações avaliadas. Contudo, na maior concentração avaliada, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o EMFS induziu hemólise. Adicionalmente, o EMFS exibiu atividade anti-hemolítica em todas as concentrações avaliadas ao longo de todo o período experimental de 240 min (Figura 2B).

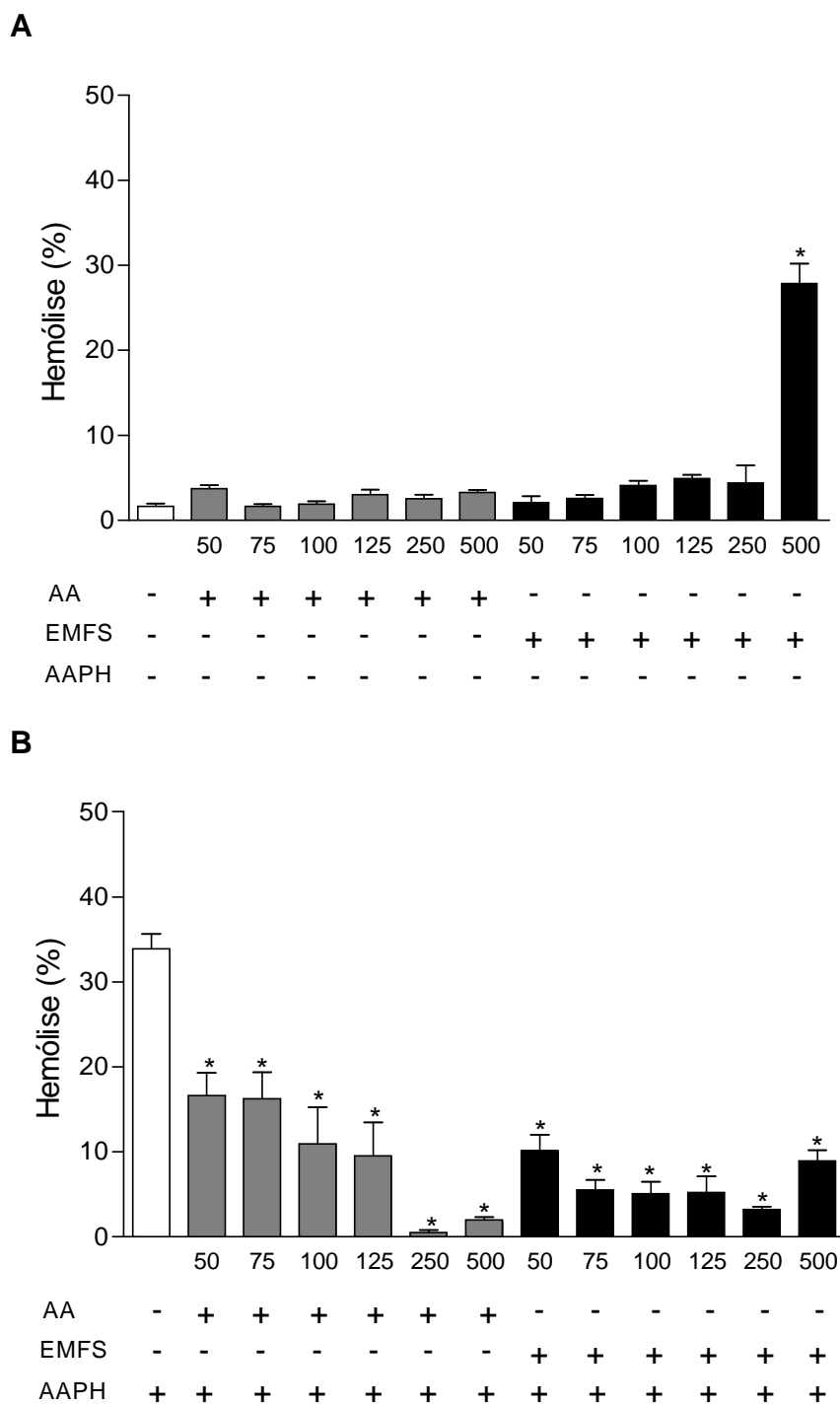


Figura 2. Eritrócitos humanos incubados durante 240 min, com diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de ácido ascórbico e EMFS na ausência (A) e na presença de AAPH 50 mM (B). Os valores são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,001$ comparados ao grupo Controle NaCl 0,9 % em (A) e AAPH em (B).

3.2.4. Inibição da peroxidação lipídica

A capacidade do EMFS em inibir a peroxidação lipídica de eritrócitos humanos induzidos por AAPH foi confirmada com a dosagem de MDA gerado. O EMFS inibiu a peroxidação lipídica induzida por AAPH como indicado pela redução nos níveis de MDA, em 76, 92, 90, 90, 84 e 72 % nas concentrações de 50, 75, 100, 125, 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, comparados ao grupo AAPH, de forma semelhante ao efeito do ácido ascórbico nas mesmas concentrações, que apresentou redução de 36, 43, 78, 80, 89 e 90 % (Figura 3).

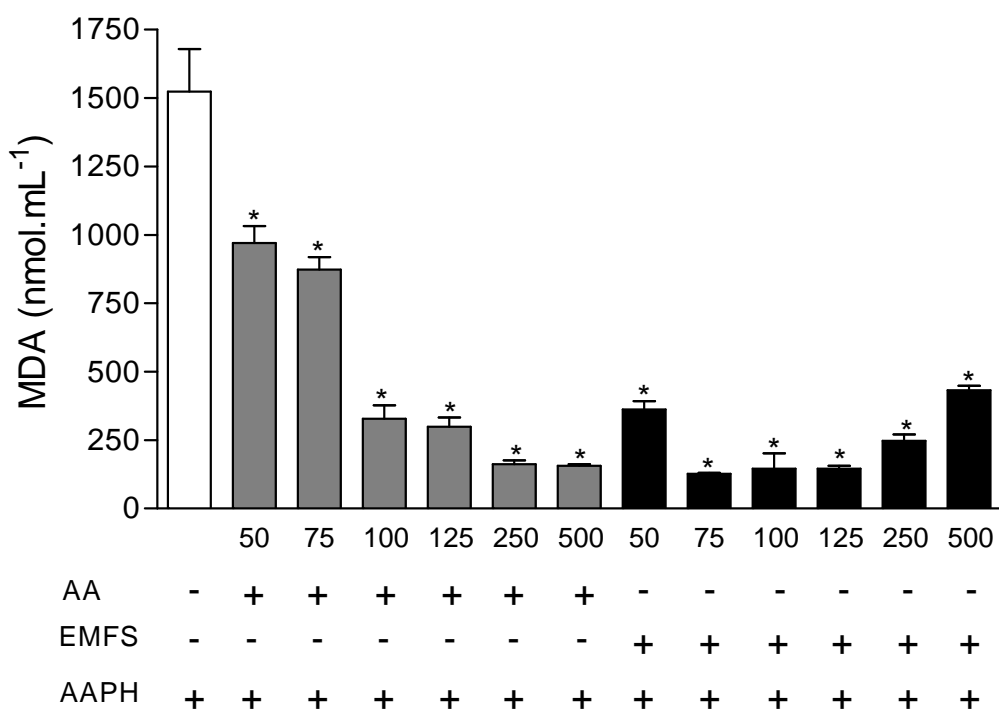


Figura 3. Conteúdo de MDA em eritrócitos incubados com diferentes concentrações de ácido ascórbico e EMFS ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 240 min. O grupo Controle foi incubado apenas com AAPH. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,001$ comparados ao grupo Controle.

3.3. Redução da hemólise oxidativa e peroxidação lipídica induzida por DOX em modelo de eritrócitos humanos

O EMFS foi capaz de reduzir a hemólise oxidativa induzida pela DOX em $34,83 \pm 5,23$ e $52,53 \pm 5,06$ % nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 4A), e os níveis de MDA em $17,89 \pm 5,24$; $33,09 \pm 5,04$ e $46,23 \pm 1,51$ % em concentrações de 125, 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 4B).

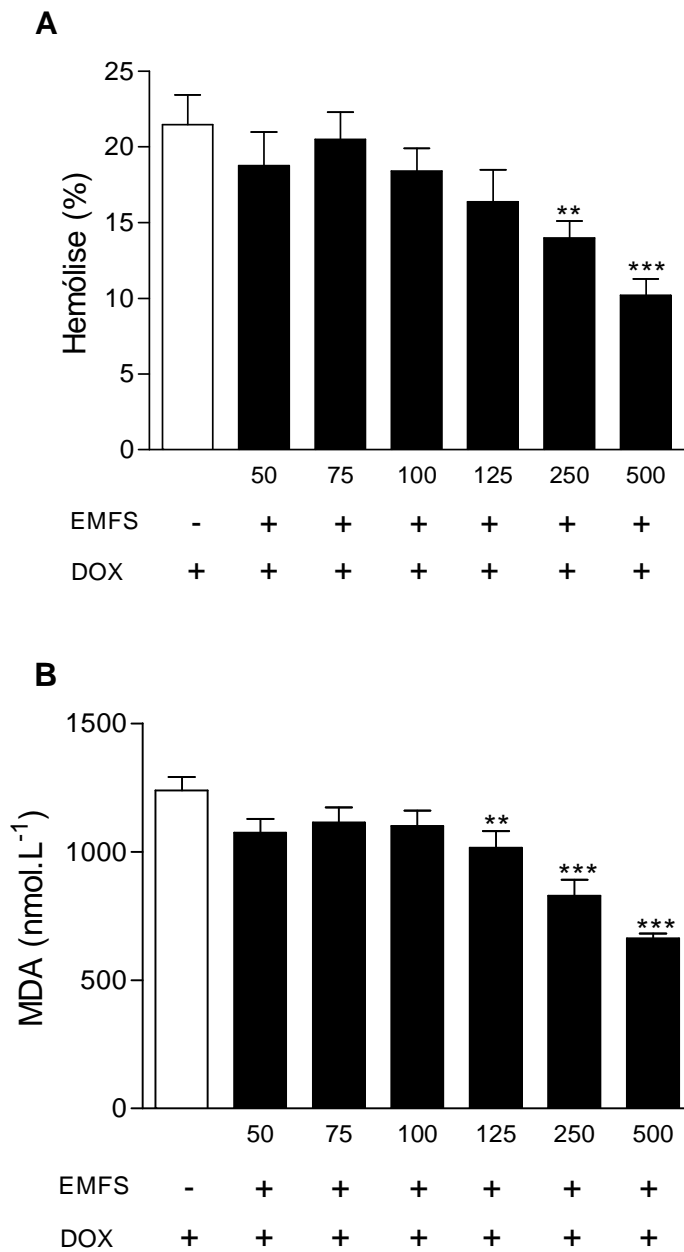


Figura 4. Eritrócitos humanos incubados com DOX e diferentes concentrações do EMFS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 240 min a 37 °C: percentual de hemólise (A) e conteúdo de MDA (B). Os valores são expressos como média \pm SEM. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparados ao grupo Controle (tratado somente com DOX).

3.4. Viabilidade celular pelo teste de exclusão de azul de Tripán

A viabilidade das células leucêmicas K562 foi quantificada utilizando solução de azul de tripan 0,4 % após um período de 24 h de incubação. A DOX foi capaz de reduzir aproximadamente 60% a viabilidade celular e, o EMFS não alterou a ação citotóxica da DOX em células K562 em todas as concentrações avaliadas (Figura 5).

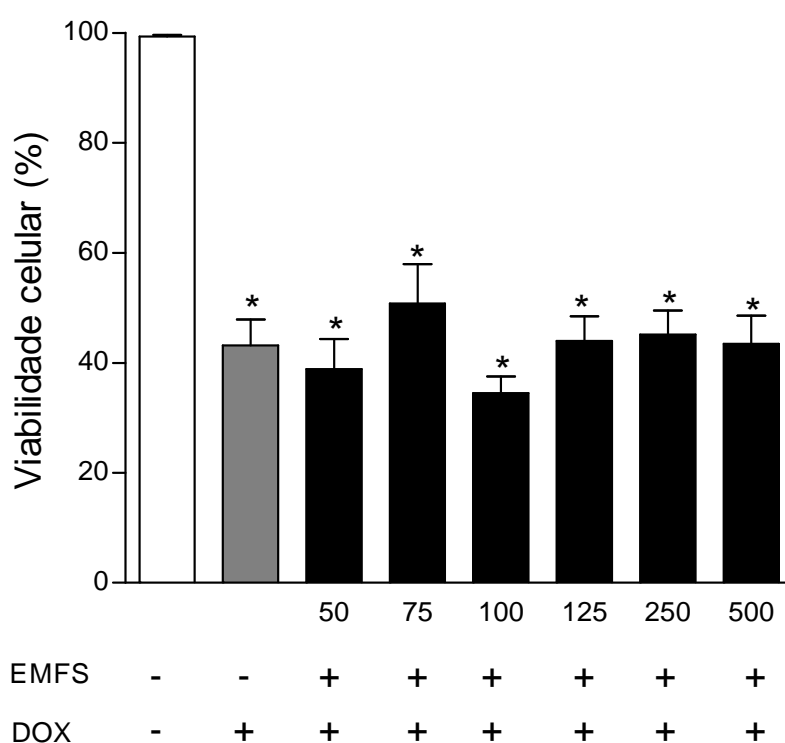


Figura 5. Percentual de viabilidade de células K562 incubadas com DOX (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e EMFS em diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). O grupo Controle contém apenas células sem tratamento. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,001$ comparados ao grupo Controle.

4. Discussão

Este estudo demonstrou a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius*, bem como seu efeito redutor do estresse oxidativo induzido por DOX em eritrócitos humanos, sem alterar a ação citotóxica do antineoplásico em células leucêmicas K562.

Durante o tratamento do câncer, a DOX aumenta a produção de radicais livres e reduz a expressão de enzimas antioxidantes no coração, indicando que esta droga induz o estresse oxidativo, que resulta em cardiotoxicidade, a qual se torna uma das principais limitações para seu uso clínico [35, 36].

Atualmente, combinações de drogas antineoplásicas com agentes antioxidantes estão sendo investigadas para melhorar a resposta clínica e reduzir os efeitos colaterais gerados pelos antineoplásicos. Tem sido evidenciado que a administração de agentes antioxidantes como carotenoides, e flavonoides, pode prevenir danos ocasionados pelo uso da DOX [9, 37]. Alguns extratos de plantas vêm sendo avaliados contra a toxicidade induzida por DOX como, *Vaccinium macrocarpon*, *Vaccinium myrtillu*, *Punica granatum*, *Ixora coccínea*, *Ficus racemosa*, *Camelia sinensis*, *Olea europaea* e *Uncaria tomentosa*, sendo esta última utilizada em ensaio clínico como adjuvante no tratamento de câncer de mama, com atividade cardioprotetora relacionada ao seu elevado teor de antioxidantes [38-45].

Nossos resultados mostram que a composição química do EMFS apresenta compostos fenólicos, e, dentre estes, destacam-se os flavonoides e taninos, bem como o ácido ascórbico, substâncias reconhecidamente antioxidantes [46-48]. O ácido ascórbico pode estar associado ao aumento da atividade da

enzima SOD, capaz de transformar ânions radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [49].

Em nosso estudo, a atividade das enzimas CAT e GPx não apresentaram alterações relevantes, o que pode indicar que a capacidade de reduzir o estresse oxidativo observado nos eritrócitos na presença do agente oxidativo AAPH e do antineoplásico DOX pode ser associada à complexação dos compostos fenólicos presentes no EMFS com metal ferro, inibindo reações de Fenton, que resultam na geração do radical $\bullet OH$, para o qual não há sistema enzimático de defesa especializado [50]. Adicionalmente, o anel aromático com um ou mais grupos hidroxila dos compostos fenólicos podem atuar doando pares de elétrons para estabilizar radicais livres, como radical $\bullet OH$, inibindo a peroxidação lipídica [51].

Durante o processo de estresse oxidativo ocorrem danos celulares, alguns resultantes da formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como MDA, substância conhecida por estar associada ao desenvolvimento de diferentes doenças [52]. A redução na geração de MDA em eritrócitos incubados com AAPH ou DOX na presença do EMFS confirmou sua atividade antioxidante e sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo neste modelo celular.

Antioxidantes podem auxiliar no tratamento de pacientes que fazem o uso de antineoplásicos, reduzindo o impacto do estresse oxidativo gerado pelas drogas [53, 54], desde que não alterem suas propriedades farmacológicas. O EMFS administrando conjuntamente com a DOX às células leucêmicas K562, não alterou a atividade citotóxica da droga, demonstrando seu potencial de uso

como coadjuvante protetor frente ao estresse oxidativo gerado por drogas antineoplásicas.

Em conjunto, os dados mostram que o EMFS possui atividade antioxidante, provavelmente mediada por seus constituintes químicos, sugerindo seu potencial uso futuro na prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, bem como adjuvante em terapia antineoplásica com DOX.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por subsídios da Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, e Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq. Edson Lucas dos Santos e Maria do Carmo Vieira são bolsistas de pesquisa do CNPq.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- [1] Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56: 185-229, 2004.

- [2] Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., Yeh E. T. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 18: 1639-1642, 2012.
- [3] Li, T., & Singal, P. K. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation*, 102: 2105-2110, 2000.
- [4] Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., Moens, A. L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52: 1213-1225, 2012.
- [5] Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Chow, D. A., Singal, P. K. Probuco protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*, 91: 10-15, 1995.
- [6] Imbaby, S., Ewais, M., Essawy, S., Farag, N. Cardioprotective effects of curcumin and nebivolol against doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 33: 800-813, 2014.
- [7] Gibellini, L., Bianchini, E., De Biasi, S., Nasi, M., Cossarizza, A., Pinti, M. Natural compounds modulating mitochondrial functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1: 1-13, 2015.
- [8] Ghosh, J., Das, J., Manna, P., Sil, P. C. The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis. *Biomaterials*, 32: 4857-4866, 2011.
- [9] Indu, R., Azhar, T. S., Nair, A., Nair, C. K. Amelioration of doxorubicin induced cardio-and hepato-toxicity by carotenoids. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10: 62-67, 2014.

- [10] Xiao, J., Sun, G. B., Sun, B., Wu, Y., He, L., Wang, X., Chen, R. C., Cao, L., Ren, X. Y., Sun, X. B. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology*, 292: 53-62, 2012.
- [11] Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M., El-Demerdash, E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 728: 107-118, 2014.
- [12] Chen, R. C., Xu, X. D., Zhi Liu, X., Sun, G. B., Zhu, Y. D., Dong, X., Wang, J., Zhang, H. J., Zhang, Q., Sun, X. B. Total flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in Vitro* and *in Vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1: 1-17, 2015.
- [13] Butler, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 25: 475-516, 2008.
- [14] Bauer, A. & Bronstrup, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural Product Reports*, 31: 35-60, 2014.
- [15] Morton, J. F. Brazilian pepper - its impact on people, animals and the environment. *Economic Botany*, 32: 353-359, 1978.
- [16] Brandão, M. G. L.; Consenza, G. P.; Moreira, R. A.; Monte-Mor, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 408-420, 2006.
- [17] Jain, M. K.; Yu, B. Z.; Rogers, J. M.; Smith, A. E.; Boger, E. T. A.; Ostrander, R. L.; Rheingold, A. L. Specific competitive inhibitor of

- secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, 39: 537-547, 1995.
- [18] Alves, L. A.; Freires, I. A.; Pereira, T. M.; Souza, A.; Lima, E. O.; Castro, R. D. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71: 965-971, 2013.
- [19] Bendaoud, H.; Romdhane, M.; Souchard, J. P.; Cazaux, S.; Bouajila, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal of Food Science*, 75: 466-472, 2010.
- [20] Matsuo, A. L.; Figueiredo, C. R.; Arruda, D. C.; Pereira, F. V.; Scutti, J. A. B.; Massaoka, M. H.; Travassos, L. R.; Sartorelli, P.; Lago, J. H. G. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411: 449-454, 2011.
- [21] Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 505-512, 2006.
- [22] Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias*, 31: 669-682, 2010.
- [23] Nickel, A., Kohlhaas, M., Maack, C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73: 26-33, 2014.

- [24] Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Nicoletta Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 15: 316-328, 2005.
- [25] Bonomini, F.; Rodella, L. F.; Rezzani, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging and Disease*, 6: 109-120, 2015.
- [26] Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571-577, 2005.
- [27] Liberio, S. A., Pereira, A. L. A., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araújo, M. J. A. M., Mattar, N. S., Silva, L. A., Ribeiro, M. N., Nascimento, F. R., Guerra, R. N., Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11: 1-10, 2011.
- [28] Agostini-Costa, T. S., Garruti, D. S., Lima, L.; Freire, S., Abreu, F. A. P., Feitosa, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. *Boletim CEPPA*, 17: 167-176, 1999.
- [29] Benassi, M. T. & Antunes, A. J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 31: 507-513, 1988.

- [30] Tirloni, C. A. S., Macorini, L. F. B., Santos, U. P., Rocha, P. S., Barros, S. V., Mello, A. M. M. F., Vieira, M. C., de Picoli, S., Santos, E. L. Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity from leaves of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess &.) Hieron. ex Niederl. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 9: 353-362, 2015.
- [31] Campos, J. F., dos Santos, U. P., Macorini, L. F., de Melo, A. M., Balestieri, J. B., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A., de Picoli Souza, K., dos Santos, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). Food and Chemical Toxicology, 65: 374-380, 2014.
- [32] Xu, P., Costa-Goncalves, A. C., Todiras, M., Rabelo, L. A., Sampaio, W. O., Moura, M. M., Santos, S. S., Luft, F. C., Bader, M., Gross, V., Alenina, N., Santos, R. A. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in mas gene-deleted mice. Hypertension, 51: 574-580, 2008.
- [33] Paglia, D. E. & Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 70: 158-169, 1967.
- [34] Franchi, G. C., Moraes, C. S., Toreti, V. C., Dausch, A., Nowill, A. E., Park, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1: 1-6, 2012.
- [35] Hardina, R., Gersl, V., Klimtova, I., Simunek, T., Machackova, J., Adamcova, M. Anthracycline induced cardiotoxicity. Acta Medica, 43: 75-82, 2000.

- [36] Thandavarayan, R. A., Giridharan, V. V., Arumugam, S., Suzuki, K., Ko, K. M., Krishnamurthy, P., Watanabe, K., Konishi, T. *Schisandrin B* prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling. *PLoS One*, 10: 1-18, 2015.
- [37] Dong, Q., Chen, L., Lu, Q., Sharma, S., Li, L., Morimoto, S., Wang, G. Quercetin attenuates doxorubicin cardiotoxicity by modulating Bmi-1 expression. *British Journal of Pharmacology*, 171: 4440-4454, 2014.
- [38] Elberry, A. A., Abdel-Naim, A. B., Abdel-Sattar, E. A., Nagy, A. A., Mosli, H. A., Mohamadin, A. M., Ashour, O. M. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1178-1184, 2010.
- [39] Ashour, O. M., Elberry, A. A., Alahdal, A., Al Mohamadi, A. M., Nagy, A. A., Abdel-Naim, A. B., Abdel-Sattar, E. A., Mohamadin, A. M. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Medical Science Monitor*, 17: 110-115, 2011.
- [40] Hassanpour Fard, M., Ghule, A. E., Bodhankar, S. L., Dikshit, M. Cardioprotective effect of whole fruit extract of pomegranate on doxorubicin-induced toxicity in rat. *Pharmaceutical Biology*, 49: 377-382, 2011.
- [41] Momin, F. N., Kalai, B. R., Shikalgar, T. S., Naikwade, N. S. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Ixora coccinea* Linn. leaves on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44: 178-183, 2012.

- [42] Ahmed, F. & Urooj, A. Cardioprotective activity of standardized extract of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced toxicity. *Pharmaceutical Biology*, 50: 468-73, 2012.
- [43] Khan, G., Haque, S. E., Anwer, T., Ahsan, M. N., Safhi, M. M., Alam, M. F. Cardioprotective effect of green tea extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 71: 861-868, 2014.
- [44] Kumral, A, Giriş, M, Soluk-Tekkeşin, M, Olgaç, V, Doğru-Abbasoğlu, S, Türkoğlu, Ü, Uysal, M. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology*, 22: 117-123, 2015.
- [45] Araújo, M. C. S., Farias, I. L., Gutierrez, J., Dalmora, S. L., Flores, N., Farias, J., Cruz, I., Chiesa, J., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C. *Uncaria tomentosa*-adjuvant treatment for breast cancer: clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1: 1-8, 2012.
- [46] Kumar, S. & Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, 29: 1-16. 2013.
- [47] Okuda, T. & Ito, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16: 2191-2217, 2011.
- [48] Yen, G. C., Duh, P. D., Hui-Ling Tsai, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79: 307-313, 2002.
- [49] Chen, X., Touyz, R. M., Park, J. B., Schiffrin, E. L. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular

- NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. Hypertension, 38: 606-611, 2001.
- [50] Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. Revista de Nutrição, 23: 629-643, 2010.
- [51] Amorati, R. & Valgimigli, L. Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. Organic & Biomolecular Chemistry, 10: 4147-4158, 2012.
- [52] Lykkesfeldt, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. Clinica Chimica Acta, 380: 50-8, 2007.
- [53] Waseem, M. & Parvez, S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: modulatory role of curcumin. Food and Chemical Toxicology, 53: 334-342, 2013.
- [54] Bagchi, D., Swaroop, A., Preuss, H. G., Bagchi, M. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. Mutation Research, 768: 69-73, 2014.

Qualidade microbiológica, toxicidade, potencial anti-hiperglicemiante e antidiabético de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Paola dos Santos da Rocha^a, Uilson Pereira dos Santos^a, Maria do Carmo Vieira^a, Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho^b, Edson Lucas dos Santos^a, Kely de Picoli Souza^{a*}

^aUniversidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804970 Dourados, MS, Brasil

^bInstituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5301-855, Bragança, Portugal

*Autor correspondente; e-mail: kelypicoli@gmail.com; Tel.: +00-55-67-8131-8870.

Resumo

Diabetes mellitus (DM) é um problema de saúde mundial, caracterizado por hiperglicemia, associado ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares. O uso de medicamentos alopáticos para o tratamento de DM ocasiona efeitos secundários. Nesta perspectiva, buscam-se plantas medicinais com qualidade microbiológica, a fim de originar produtos para o tratamento de DM, que não apresentem efeitos tóxicos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica, toxicidade e potencial anti-hiperglicemiante e antidiabético das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi. A análise microbiológica foi determinada utilizando métodos padrão da AOAC. A toxicidade aguda foi verificada nas concentrações de 2000 e 5000 mg.mL⁻¹ e, as atividades anti-hiperglicemiante e antidiabética foram determinadas pelo teste oral de tolerância a glicose e tratamento crônico por 28 dias em camundongos C57Bl/6, respectivamente. A ingestão alimentar, o consumo de água e a massa corporal foram avaliados semanalmente durante todo o período experimental. Após o tratamento os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para dosagem sérica de glicose, avaliação de hemoglobina glicada (HbA1c), triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). Órgãos (coração, fígado e rim) foram retirados, pesados. As folhas de *S. terebinthifolius* apresentaram microrganismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes fecais, enterobactérias e *Escherichia coli* dentro dos limites estabelecidos, sendo ausente *Salmonella* sp., *Clostrídios*, *Staphylococcus aureus*. O extrato não foi tóxico, sendo capaz de atenuar a glicose pós-prandial em ensaio agudo e, reduzir níveis de glicose, HbA1c, AST e ALT séricos

($P < 0,05$) após 28 dias de tratamento. Em conjunto, os dados mostram que as folhas de *S. terebinthifolius* apresentam qualidade microbiológica, o que as tornam seguras para elaboração do EMFS que apresenta atividade anti-hiperglicemiante e antidiabético, possibilitando seu uso no tratamento de DM.

Palavras-chave: pimenta-rosa, segurança, *Diabetes mellitus*

1. Introdução

Diabetes mellitus (DM) é uma doença multifatorial, caracterizada pelo desenvolvimento de distúrbios metabólicos que envolvem a elevação da glicemia em resposta a secreção deficiente de insulina (DM tipo 1) ou resistência das células a insulina (DM tipo 2) [1, 2].

O DM está associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), sendo esta a causa mais comum de morbimortalidade [3]. A exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia está diretamente relacionada a anormalidades estruturais e funcionais do endotélio que levam ao desenvolvimento de DCV [4, 5]. Essas alterações estão ligadas à redução da capacidade antioxidante, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam o estresse oxidativo em indivíduos diabéticos [6, 7].

O aumento na prevalência e impacto do DM implica na utilização de diversas classes de medicamentos, como sulfonilureias, biguanidas, inibidores de glicosidases, tiazolidinedionas, inibidores da dipeptidil peptidase-4, além da própria administração da insulina, no entanto, estes medicamentos produzem efeitos secundários [8].

Nesta perspectiva, ampliam-se as buscas por produtos para o tratamento de hiperglicemia, DM e outros fatores de risco para desenvolvimento de DCV, como o estresse oxidativo. As plantas medicinais vêm sendo estudadas por regular mecanismos controladores da hiperglicemia associada ao seu potencial antioxidante e presença de compostos fenólicos [9, 10]. Adicionalmente, estudos sobre a qualidade microbiológica e toxicidade são necessários, a fim de se obter produtos naturais, como fitoterápicos de qualidade e seguros para tratamento da hiperglicemia e DM.

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), é conhecida popularmente como aroeira-vermelha ou pimenta-rosa, sendo nativa do Brasil. É uma planta medicinal, cujas atividades biológicas, com destaque para atividade antioxidante proveniente da presença de compostos fenólicos, têm sido investigadas, com diferentes extratos em diferentes modelos farmacológicos [11-13]. Em nosso trabalho, a qualidade microbiológica, toxicidade e o potencial anti-hiperglicemiante e antidiabético das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi foram investigados.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Folhas de *S. terebinthifolius* Raddi foram coletadas sob as coordenadas S 22°11'43.7568" W 54°56'8.0916", secas e pulverizadas. A partir do pó das folhas foi realizada a análise microbiológica. Parte das folhas foi mantida em maceração exaustiva em metanol. O filtrado foi concentrado sob vácuo a 45 °C e liofilizado para se obter o extrato bruto para realizar a avaliação das

atividades biológicas. O rendimento foi de aproximadamente 13 %. Uma exsicata foi depositada no herbário, DDMS (n°4889) .

2.2. Avaliação microbiológica

Foram avaliados parâmetros de qualidade comercial: microrganismos mesófilos, bolores e leveduras; indicadores de qualidade sanitária: coliformes fecais e *Escherichia coli*, e indicadores de segurança: esporos de *Clostridium* sulfito-redutores e *Salmonella sp.* Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.1. Preparação das amostras

Para análises microbiológicas, 10 g do pó das folhas foram assepticamente homogeneizadas utilizando pré-esterilizador Stomacher Lab-Blender (Seward tipo 400, Londres, Reino Unido) durante 3 minutos, com 90 mL de solução fisiológica peptonada estéril (0,1 % de peptona neutro + 0,85 % de NaCl em H₂O deionizada estéril, pH 7,0 ± 0,05) pré-arrefecida (4 ± 0,5 °C). Foram preparadas diluições a partir deste homogeneizado com os mesmos diluentes estéreis refrigerados 1:10 (w/w).

2.2.2. Contagem do total de microrganismos mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos foram contados por incorporação de 1 mL de cada diluição em Plate Count Agar (PCA), conforme o NP-3788 [14] -

Legislação Portuguesa. Contagens microbianas foram expressas como unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC.g⁻¹).

2.2.3. Contagem de leveduras e bolores

A contagem de leveduras e bolores foi realizada em meio peptona dextrose para leveduras, incubadas a 25 °C por 5 dias - ISO 21527-2 [15]. Contagens microbianas foram expressas como unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC.g⁻¹).

2.2.4. Determinação de *S. aureus*

A determinação de *S. aureus* foi realizada de acordo com o protocolo da NP 4400-1 [16]. Diluições da amostra foram inoculadas em caldo Baird-Parker com Egg Yolk Tellurito Emulsion (Himedia) durante 24 h (37 °C). Foram selecionadas 3 a 5 colônias características, a fim de verificar a presença de coagulase e catalase. Contagens microbianas foram expressas como unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC.g⁻¹).

2.2.5. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

A contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada utilizando o SimPlate Cec-Método CI - AOAC Official Method, 03 [17] com multiple test medium (BioControl System), de acordo com instruções e procedimentos do fabricante, Feldsine et al. [18]. Para o ensaio 1 mL da diluição e 9 mL de água

peptonada misturadas com a cor azul de base, foram colocadas no centro do dispositivo SimPlate. Os SimPlates foram empilhados e armazenados a 37 ± 1 °C durante 24-28 h. A contagem positiva para coliformes totais foi realizada com base na mudança de cor e a contagem positiva para *E. coli* com base na mudança de cor e fluorescência sob luz UV. As populações de coliformes e *E. coli* foram determinadas com base nos números de poços positivos, correlacionando com a tabela de conversão do SimPlate e expressas como unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC.g⁻¹).

2.2.6. Determinação de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores

Para determinação esporos de *Clostridium* sulfito-redutores, foram adicionados alíquotas de 1 mL da suspensão inicial, tratada a 80 °C durante 15 minutos, com caldo Diferencial Reinforced *Clostridial* (Himedia), incubado a 37 °C durante 5 dias. Após esse período, foi realizada a contagem das colônias pretas. Os resultados são expressos como a presença esporos de *Clostridium* sulfito-redutores em 0,01 g de amostra - ISO 15213 [19]. Os resultados foram expressos como a maioria dos números de prováveis esporos de *Clostridium* sulfito-redutores por grama de amostra (UFC.g⁻¹).

2.2.7. Determinação de *Salmonella* sp

A detecção de *Salmonella* sp. foi realizada utilizando a técnica de *imunodifusion test* 1-2, teste de utilização única para *Salmonella*, reconhecido pela AOAC official method 989,13 [17]. Resultados foram obtidos entre 16-20 h

após o pré-enriquecimento de água peptonada tamponada. Os resultados foram interpretados visualmente observando o desenvolvimento de imunobanda.

2.3. Animais experimentais

Camundongos C57Bl/6 machos com 20-30 g, 12-15 semanas idade foram obtidos a partir do Biotério Central-UT/CCBS, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (6-10 animais por gaiola), mantidos em condições padrão (12 h de luz e 12 horas de ciclo escuro; 22 ± 2 °C), com acesso livre à dieta e água *ad libitum*. Antes do início da experiência, os animais foram aclimatados às condições laboratoriais. Todos os procedimentos experimentais com animais seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (parecer nº 025/2012 CEUA/UFGD). A dose para os ensaios *in vivo* foi selecionada com base no estudo de toxicidade aguda. A dose média foi de um décimo da dose considerada limite.

2.3.1. Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado com base nos protocolos da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)- Guidelines 425 [20]. No primeiro dia, um camundongo macho C57Bl/6 em jejum de 8 h recebeu a dose de 2000 mg.kg^{-1} de extrato via oral. Sequencialmente, outros

quatro camundongos foram submetidos a jejum durante 8 h e uma dose única de 2000 mg.kg⁻¹, sendo observados. O mesmo procedimento foi realizado posteriormente com outro grupo de camundongos onde foi administrada a dose de 5000 mg.kg⁻¹ para definir a dose letal para 50 % dos camundongos (DL₅₀). Os animais foram observados periodicamente durante as primeiras 24h, posteriormente, uma vez ao dia durante 14 dias. A ingestão alimentar, o consumo de água, e massa corporal foram registrados. Ao final do período de observação, todos os animais foram submetidos à eutanásia. Os órgãos (coração, pulmão, fígado e rins) foram retirados, pesados e analisados macroscopicamente.

2.3.2. Teste oral de tolerância a glicose

O teste oral de tolerância à glicose foi realizado em camundongos C57Bl/6, seguindo metodologia descrita por Lanjhiyana et al. [21]. Os animais permaneceram em jejum durante 12 h e foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada. O grupo controle recebeu água, o grupo Glib, recebeu glibenclamida na dose de 10 mg.kg⁻¹, o grupo Met, recebeu metformina na dose de 100 mg.kg⁻¹ e, o grupo EMFS recebeu a dose de 200 mg.kg⁻¹. Após 30 min da administração dos tratamentos, todos os animais receberam, por gavagem, uma solução de glicose (2 g.kg⁻¹). As amostras de sangue foram coletadas a partir da veia caudal imediatamente antes (tempo 0) e 30, 60, 90, 120 e 180 min após a administração da glicose e foram utilizados para calcular a área sobre a curva (AUC). Os níveis de glicose no sangue foram verificados com auxílio do glicosímetro Accucheck active da Roche.

2.3.3. *Indução de diabetes*

DM foi induzido em camundongos C57Bl/6 machos submetidos a jejum durante a noite, por uma única injeção intraperitoneal de aloxano (180 mg.kg^{-1}) dissolvido em NaCl 0,9%. O grupo controle normal recebeu NaCl 0,9% apenas como veículo. Depois de 72 h de indução os níveis de glicose no sangue foram verificados com auxílio do glicosímetro Accucheck active da Roche. Os animais foram considerados diabéticos pelos níveis elevados de glicose no plasma (200 mg.dL^{-1}).

2.3.3.1. *Delineamento experimental*

Após a indução os animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada, sendo:

Grupo I: ND-Controle- camundongos normais, administração de água;

Grupo II: D-Controle- camundongos diabéticos, administração de água;

Grupo III: D-Met- camundongos diabéticos, administração de 100 mg.kg^{-1} de metformina;

Grupo IV: D-EMFS- camundongos diabéticos, administração de 200 mg.kg^{-1} de EMFS.

Todos os camundongos receberam os tratamentos via gavagem uma vez ao dia, durante 28 dias.

2.3.3.2. Parâmetros antropométricos e bioquímicos

A ingestão alimentar (g), o consumo de água (mL), e a massa corporal (g) foram avaliados semanalmente durante todo o período experimental. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação de hemoglobina glicada (HbA1c), dosagem sérica de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). Órgãos (coração, fígado e rim) foram retirados, pesados e calculados as respectivas massas relativas (g de órgão.100 g⁻¹ de massa corporal).

2.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Para análise e comparação dos resultados obtidos foi empregado o teste de variância ANOVA com pós-teste *Student Newman Keuls* utilizando o programa *Graph Pad Prism 5.0*. O nível de significância foi fixado em P<0,05.

3. Resultados

3.1. Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica revelou a presença de microrganismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes fecais, enterobactérias e *Escherichia coli*, dentro dos limites estabelecidos pelo Código Alimentar Argentino (1998) e, ausência de *Salmonella sp.*, *Clostrídios* e *Staphylococcus*

aureus. A Tabela 1 apresenta a análise microbiológica das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi.

Tabela 1. Análise microbiológica das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi.

Parâmetros	Média ± SEM
Aeróbios mesófilos (UFC.g⁻¹)	9,64 x 10 ⁴ ±0,09
Bolores e leveduras (UFC.g⁻¹)	1,33 x 10 ⁴ ±0,03
Coliformes totais (UFC.g⁻¹)	7,38 x 10 ³ ±0,005
Enterobactérias (UFC.g⁻¹)	7,38 x 10 ³ ±0,005
<i>Escherichia coli</i> (UFC.g⁻¹)	< 1
Clostrídios sulfito-redutores (UFC.g⁻¹)	Ausente
<i>Salmonella sp.</i> (UFC.g⁻¹)	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC.g⁻¹)	Ausente

Os valores são expressos como média ± SEM.

3.2. Toxicidade aguda

Os camundongos tratados com EMFS nas doses de 2000 e 5000 mg.kg⁻¹ não apresentaram qualquer efeito adverso sobre as respostas comportamentais até 14º dia de observação. Observações físicas não indicaram sinais de alterações na pele, olhos e, padrões de comportamento nos camundongos. Não houve mortalidade observada nas doses testadas. Não foi observada perda de massa corporal na dose de 2000 mg.kg⁻¹ (Tabela 2). Foram observadas diferenças na massa corporal, ingestão alimentar e consumo de água na dose de 5000 mg.kg⁻¹ comparado ao controle (Tabela 2).

O exame macroscópico nas avaliações de autópsia dos diversos órgãos não revelou diferenças. A DL₅₀ do EMFS foi estimada como sendo superior a 5000 mg.kg⁻¹. Os ensaios *in vivo* seguiram com a concentração de 200 mg.kg⁻¹, sendo 10 vezes menor que a dose considerada segura no ensaio de toxicidade aguda.

Tabela 2. Massa corporal, ingestão alimentar, consumo de água e massa relativa dos órgãos de camundongos normais tratados durante 14 dias. Ausência de mortes.

Parâmetros	Controle	2000 mg.kg ⁻¹	5000 mg.kg ⁻¹
Δ MC (%)	-0,3±1,3	-2,8±1,6	-5,7±1,1*
Ingestão alimentar (g.dia⁻¹)	3,8±0,2	5,1±0,3	6,3±0,8**
Ingestão de água (mL.dia⁻¹)	6,3±0,4	6,0±0,5	12,4±0,8***
Fígado (g.100 g⁻¹ de MC)	3,9±0,1	3,6±0,1	3,8±0,1
Pulmão (g.100 g⁻¹ de MC)	0,60±0,02	0,68±0,09	0,62±0,02
Rins (g.100 g⁻¹ de MC)	1,06±0,02	1,11±0,06	0,95±0,02
Coração (g.100 g⁻¹ de MC)	0,56±0,03	0,57±0,04	0,54±0,02

Δ MC (%), variação em % entre o peso corporal final e inicial. Os valores são apresentados como média ± SEM. N=5. (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

3.3. Teste oral de tolerância a glicose

A administração de glicose elevou a glicemia dos animais normoglicêmicos após 30 min, o que foi revertido aos 180 min. O EMFS apresentou potencial anti-hiperglicemiante, observado através da redução da glicemia pós-prandial (Figura 1A). Os valores de área sobre a curva (AUC) corroboram os dados anteriores (Figura 1B).

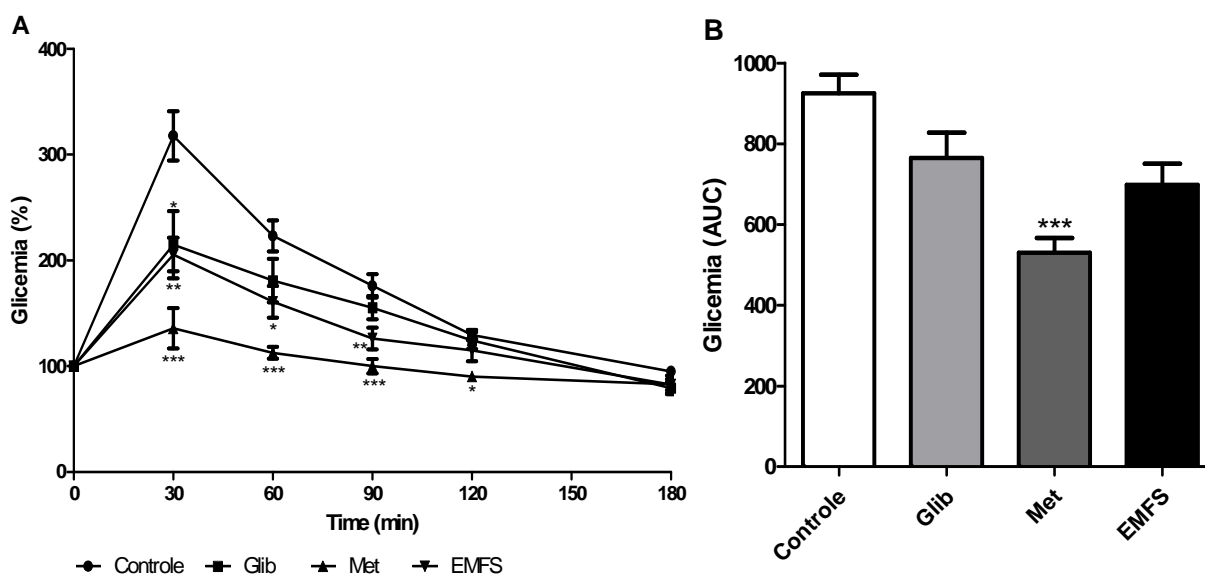


Figura 1. (A) Glicemia e (B) AUC obtidos no teste oral de tolerância a glicose em camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos. N=5. Os valores são expressos como média \pm SEM. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

3.4. Atividade antidiabética do EMFS

3.4.1. Efeito do EMFS sobre os níveis de glicose e HbA1c

Os níveis de glicose no sangue foram significativamente maiores no grupo D-Controle comparados ao grupo ND-Controle (Figura 2A), assim como o percentual de HbA1c (Figura 2B). Os camundongos dos grupos D-EMFS e D-Met apresentaram glicemia (Figura 2A) e HbA1c (Figura 2B) reduzida ao 28º de tratamento de forma semelhante ao grupo ND-Controle.

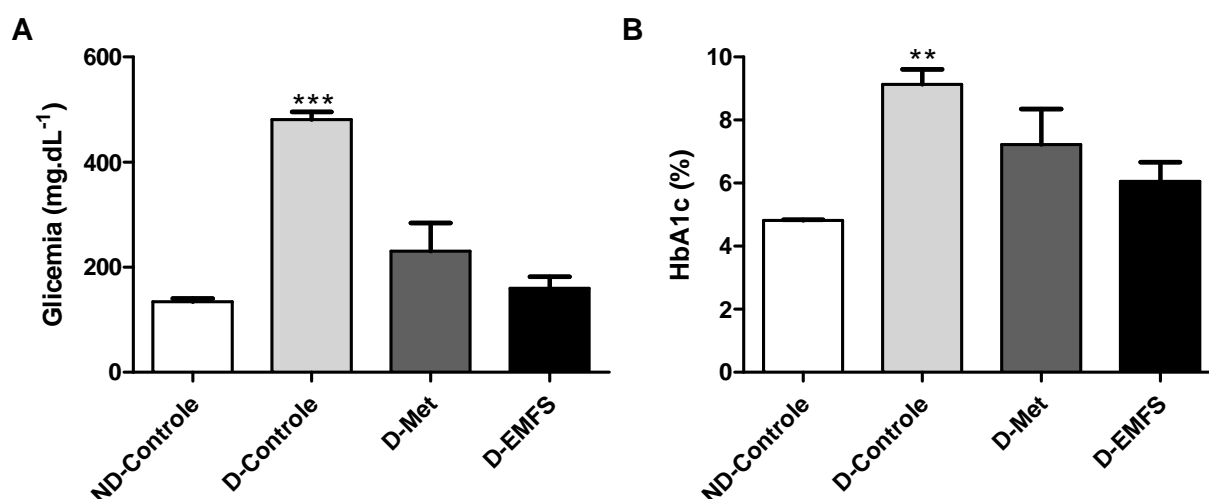


Figura 2. (A) Glicemia e (B) HbA1c de camundongos C57Bl/6 após 28 dias de tratamento. N=5. Os valores são expressos como média \pm SEM. (** P <0,01; *** P <0,001).

3.4.2. Parâmetros antropométricos e massa relativa dos órgãos

Durante o tratamento não foram observadas mudanças significativas na massa corporal entre os grupos (Tabela 3). Os animais diabéticos

apresentaram aumento na ingestão alimentar e hídrica, e o EMFS foi capaz de reduzir o consumo. Os resultados revelaram que o peso do fígado e rins aumentou no grupo D-Controle comparado ao grupo ND-Controle, e o EMFS e metformina reverteram o quadro.

Tabela 3. Massa corporal, ingestão alimentar, consumo de água e massa relativa dos órgãos de camundongos normais e diabéticos tratados durante 28 dias.

Parâmetros	ND-Controle	D-Controle	D-Met	D-EMFS
Δ MC (%)	6±3	0,4±4	8±3	8±2
Ingestão alimentar (g.dia⁻¹)	4,6±0,2	6,8±0,5 ^{***}	6,5±0,2 ^{**}	4,8±0,2
Ingestão de água (mL.dia⁻¹)	7,5±0,4	30,4±1,4 ^{***}	23,3±0,9 ^{***}	11,2±0,8 [*]
Fígado (g.100 g⁻¹ de MC)	4,1±0,2	5,2±0,2 ^{**}	4,7±0,2	4,0±0,2
Rins (g.100 g⁻¹ e MC)	1,08±0,03	1,48±0,05 ^{***}	1,12±0,09	1,03±0,03
Coração (g.100 g⁻¹ de MC)	0,45±0,01	0,46±0,01	0,45±0,01	0,49±0,03

Δ MC (%), variação em % entre a massa corporal final e inicial. Os valores são apresentados como média ± SEM. N=5. (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

3.4.3. Efeito do EMFS sobre parâmetros bioquímicos

A administração do EMFS não ocasionou mudanças nos níveis de colesterol total, HDL colesterol, triglicérides, AST, ALT, uréia e creatinina (Tabela 4). Todos os parâmetros bioquímicos analisados foram semelhantes ao grupo ND-Controle. Os animais do grupo D-Controle apresentaram aumento de AST e ALT comparado ao grupo ND-Controle, o que pode explicar

parcialmente o aumento do fígado. A administração do EMFS e metformina reduziu os danos no fígado ocasionado pela indução de DM.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de camundongos normais e diabéticos tratados durante 28 dias.

Parâmetros	ND-Controle	D-Controle	D-Met	D-EMFS
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	100±7	105±8	96±5	109±2
HDL-colesterol (mg.dL ⁻¹)	103±8	108±8	90±5	107±2
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	51±4	49±5	70±14	66±6
AST (U.L ⁻¹)	63±6	163±20 ^{**}	131±54	62±8
ALT (U.L ⁻¹)	26±3	72±5 [*]	58±23	30±4
Uréia (mg.dL ⁻¹)	106±9	143±20	110±11	106±8
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0,23±0,02	0,27±0,02	0,26±0,01	0,23±0,01

Os dados são expressos como média ± SEM. N=5. (*P<0,05; **P<0,01).

4. Discussão

A segurança e eficácia dos produtos naturais e/ou fitoterápicos têm influência de diferentes fatores, dentre eles a qualidade microbiológica da matéria-prima [22]. Nosso estudo mostrou a qualidade microbiológica das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi, que possibilitou o desenvolvimento de um extrato de qualidade. O EMFS não apresentou efeitos tóxicos, sendo evidenciado seu potencial anti-hiperglicemiante e antidiabético em camundongos com diabetes induzida por aloxano, tornando o extrato seguro e promissor para o tratamento de hiperglicemia e DM.

O controle da hiperglicemia pode ser realizado por vários mecanismos, como inibição de glicosidases [23], inibição da absorção de glicose dependente de Na⁺ por proteínas transportadoras SGLT [24], ativação da translocação de GLUT4 [25] e, aumento da secreção de insulina [26]. Estes mecanismos podem ser ativados por diversas substâncias, dentre as quais são descritas os flavonoides [27, 28]. Estudos anteriores evidenciam a presença de flavonoides em diferentes extratos das folhas de *S. terebintifolius* Raddi [11-13].

A administração do EMFS reduziu a glicemia pós-prandial em camundongos, evidenciando seu potencial anti-hiperglicemiante. A elevação da glicemia pós-prandial é um fator de risco para o desenvolvimento de complicações diabéticas, como desenvolvimento de DCV, devido à ativação de isoformas de proteína quinase C e formação de produtos de glicação avançada [29, 30]. Estudos sugerem que flavonoides são capazes de inibir a hidrólise de hidratos de carbono, através da inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase, reduzindo o nível de glicose pós-prandial [31]. Embora existam diversos medicamentos para o tratamento do diabetes, buscam-se constantemente novas opções terapêuticas, uma vez que o uso constante de medicamentos alopáticos aumenta o risco de efeitos secundários.

No tratamento crônico os animais diabéticos apresentaram aumento na ingestão alimentar (polifagia) e consumo de água (polidipsia). Os sintomas mais comuns desenvolvidos no diabetes são polidipsia, poliúria, fadiga, noctúria e a perda de peso. A polifagia ocorre devido à redução na fonte de energia, uma vez que a glicose consumida é pouco utilizada, devido a pouca quantidade de insulina, como consequência há o desenvolvimento de polidipsia, na busca da reposição do equilíbrio homeostático do organismo [32].

A administração do EMFS foi capaz de restaurar a ingestão alimentar e reduzir o consumo de água.

O restabelecimento do consumo nos animais tratados com EMFS pode estar associado à redução dos níveis de glicose e HbA1c, sugerindo que o extrato tem efeito semelhante à insulina em tecidos periféricos, uma vez que a indução de diabetes com aloxano ocasiona a destruição de células β -pancreáticas [33]. Há evidências que flavonoides, assim como a metformina são capazes de ativar a translocação de GLUT4 em membranas de adipócitos, reduzindo os níveis de glicose sanguínea [34].

O aloxano também é caracterizado por induzir a produção de radicais livres e causar lesão no fígado [35]. As alterações metabólicas no fígado, caracterizadas no diabetes por elevar as enzimas de função hepática AST e ALT [36] foram verificadas nos animais e, o EMFS e a metformina foram capazes de reduzir os danos no fígado ocasionado pela indução de diabetes. O aumento das enzimas de função hepática AST e ALT sérica é atribuído principalmente ao metabolismo desordenado de glicose e, pode acarretar o desenvolvimento de DCV [37].

Em conjunto, os dados mostram que as folhas de *S. terebinthifolius* apresentam qualidade microbiológica, o que as tornam seguras para elaboração do EMFS, que apresenta atividade anti-hiperglicemiante e antidiabética, possibilitando seu uso no tratamento de diabetes.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por subsídios da Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, e Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq. Edson Lucas dos é bolsista de pesquisa do CNPq.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- [1] Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michels, A.W. Type 1 diabetes. *Lancet*, 383: 69-82, 2014.
- [2] Kharroubi, A.T. & Darwish, H.M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6: 850-867, 2015.
- [3] Triggle, C.R. & Ding, H. Cardiovascular impact of drugs used in the treatment of diabetes. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 5: 245-268, 2014.
- [4] Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, 109: 143-159, 2005.

- [5] Bertoluci, M. C., Cé, G. V., da Silva, A. M., Wainstein, M. V., Boff, W., Puñales, M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes*, 6: 679-692, 2015.
- [6] Mehta, J.L., Rasouli, N., Sinha, A.K., Molavi, B. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 794-803, 2006.
- [7] Clerici, C., Nardi, E., Battezzati, P. M., Ascutti, S., Castellani, D., Corazzi, N., Giuliano, V., Gizzi, S., Perriello, G., Di Matteo, G., Galli, F., Setchell, K. D. Novel soy germ pasta improves endothelial function, blood pressure, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 34: 1946-1948, 2011.
- [8] Campbell, R.K. & White, J.R.Jr. More choices than ever before: emerging therapies for type 2 diabetes. *The Diabetes Educator*, 34: 518-534, 2008.
- [9] Antu, K.A., Riya, M.P., Mishra, A., Anilkumar, K.S., Chandrakanth, C.K., Tamrakar, A.K., Srivastava, A.K., Raghu, K.G. Antidiabetic property of *Symplocos cochinchinensis* is mediated by inhibition of alpha glucosidase and enhanced insulin sensitivity. *PLoS One*, 9: 1-13, 2014.
- [10] Kumkrai, P., Weeranantanapan, O., Chudapongse, N. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory activity and sub-chronic toxicity of *Derris reticulata* extract: its antidiabetic potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15: 1-10, 2015.

- [11] El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., Shaaban, H.A., Shibamoto, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5265-5270, 2009.
- [12] D'Sousa' Costa, C.O., Ribeiro, P.R., Loureiro, M. B., Simões, R.C., de Castro, R.D., Fernandez, L.G. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, 11: 607-614, 2015.
- [13] Bulla, M.K., Hernandes, L., Baesso, M.L., Nogueira, A.C., Bento, A.C., Bortoluzzi, B.B., Serra, L.Z., Cortez, D.A.G. Evaluation of photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi extract. *Photochemistry and Photobiology*, 91: 558–566, 2015.
- [14] NP 3788, 2002. *Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30 °C*. Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- [15] ISO 21527-2, 2008. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds – Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95*. International Standards Organization, Switzerland.
- [16] NP 4400-1, 2002. *Microbiologia alimentar: Norma portuguesa: regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva: Parte 1*:

Técnica com confirmação de colónias (Método corrente). Instituto Português da Qualidade, Portugal.

[17] AOAC. Official Methods of Analysis. (16th ed.) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (2005).

[18] Feldsine, P.T., Lienau, A.H., Roa, N.H., Green, S.T. Enumeration of total coliforms and *E. coli* in foods by the sim plate coliform and *E. coli* color indicator method and conventional culture methods: collaborative study. J. AOAC Int., 88 (2005), p. 5.

[19] ISO 15213, 2003. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. International Standards Organization, Switzerland.

[20] OECD (2008), Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

[21] Lanjhiyana, S., Garabadu, D., Ahirwar, D., Bigoniya, P., Rana, A. C.; Patra, K. C., Lanjhiyana, S. K., Karuppaih, M. Antidiabetic activity of methnolic extract of stem bark of *Elaodendram glaucum* Pers in alloxanized rat model. Advances in Applied Science Research, 2: 47-67, 2011.

[22] Kroll, U. & Cordes, C. Pharmaceutical prerequisites for a multi-target therapy. Phytomedicine, 13: 12-19, 2006.

- [23] Hanefeld, M. & Schaper, F. Acarbose: oral anti-diabetes drug with additional cardiovascular benefits. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6: 153-163, 2008.
- [24] Vaidya, H.B. & Goyal, R.K. Exploring newer target sodium glucose transporter 2 for the treatment of diabetes mellitus. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10: 905-913, 2010.
- [25] Gandhi, G. R., Stalin, A., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., Paulraj, M. G., Vishal, R. Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 2243-55, 2013.
- [26] Becker, R. H., Stechl, J., Steintraesser, A., Golor, G., Pellissier, F. Lixisenatide reduces postprandial hyperglycaemia via gastrostatic and insulinotropic effects. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 1: 1-9, 2015.
- [27] Sheliya, M.A., Rayhana, B., Ali, A., Pillai, K.K., Aeri, V., Sharma, M., Mir, S.R. Inhibition of α -glucosidase by new prenylated flavonoids from *euphorbia hirta* L. herb. *Journal of Ethnopharmacology*, 176: 1-8, 2015.
- [28] Chen, J., Mangelinckx, S., Adams, A., Wang, Z.T., Li, W.L., De Kimpe, N. Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Natural Product Communications*, 10: 187-200, 2015.

- [29] Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications; is it time to treat? *Diabetes*, 54: 1-7, 2005.
- [30] Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A. S. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18: 1-14, 2014.
- [31] Asghari, B., Peyman Salehi, P., Sonboli, A., Ebrahimi, S. N. Flavonoids from *Salvia chloroleuca* with α -amylase and α -glucosidase inhibitory effect. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14: 609-615, 2015.
- [32] Usher-Smith, J. A., Thompson, M. J., Zhu, H., Sharp, S. J., Walter, F. M. The pathway to diagnosis of type 1 diabetes in children: a questionnaire study. *BMJ Open*, 5: 1-11, 2015.
- [33] Lenzen, S. The mechanisms of alloxan - and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216-226, 2008.
- [34] Ohta, M., Fujinami, A., Kobayashi, N., Amano, A., Ishigami, A., Tokuda, H., Suzuki, N., Ito, F., Mori, T., Sawada, M., Iwasa, K., Kitawaki, J., Ohnishi, K., Tsujikawa, M., Obayashi, H. Two chalcones, 4-hydroxyderricin and xanthoangelol, stimulate GLUT4-dependent glucose uptake through the LKB1/AMP-activated protein kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition Research*, 35: 618-625, 2015.
- [35] Giordano, S., Martocchia, A., Toussan, L., Stefanelli, M., Pastore, F., Devito, A., Risicato, M. G., Ruco, L., Falaschi, P. Diagnosis of hepatic glycogenosis in poorly controlled type 1 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 5: 882-888, 2014.

- [36] Harris, E. H. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. *Clinical Diabetes*, 23: 115-119, 2005.
- [37] Shen, J., Zhang, J., Wen, J., Ming, Q., Zhang, J., Xu, Y. Correlation of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase with coronary heart disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8: 4399-4404, 2015.

ANEXOS

Anexo I (Revista: Qualis/Biodiversidade; escopo e o link-normas de publicação)

Revista: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Qualis: B1 Biodiversidade

Fator de impacto: 1.880

Escopo: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM) is an international, peer-reviewed journal that seeks to understand the sources and to encourage rigorous research in this new, yet ancient world of complementary and alternative medicine. The journal seeks to apply scientific rigor to the study of complementary and alternative medicine (CAM) modalities, particularly traditional Asian healing systems. eCAM emphasizes health outcome, while documenting biological mechanisms of action. The journal is devoted to the advancement of science in the field of basic research, clinical studies, methodology or scientific theory in diverse areas of Biomedical Sciences.

Link normas publicação: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/guidelines/>

Anexo II (Declaração Comitê de Ética em Pesquisa)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIGRAN


Dourados, 20 de Novembro de 2012.

Prezado Pesquisador
Edson Lucas dos Santos

O Projeto de vossa autoria 123/12, intitulado: “Potencial antioxidante de plantas e própolis de abelhas nativas do cerrado” foi integralmente **APROVADO** pelo CEP-UNIGRAN e poderá ser conduzido.

Ressalto que os relatórios semestrais devem ser apresentados ao Comitê para acompanhamento e que alterações em seu projeto devem ser avisadas previamente a coordenação.

Respeitosamente,


Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo
Coordenadora do CEP-UNIGRAN

Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Universitário da Grande Dourados
R: Balbina de Matos, 2121 – Fone: (67) 3411-4207 / Fax: 3411-4167 – CEP: 79824-900 – Dourados – MS
E-mail: comitedeetica@unigran.br

Anexo III (Declaração Comissão de ética no Uso de Animais)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 5 de fevereiro de 2013

Senhora Pesquisadora:

Kely de Picoli Souza

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **025/2012** – **CEUA/UFGD** - intitulado "**Avaliação do potencial farmacológico e toxicológico de plantas do Cerrado: *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae) e *Schinus terebinthifolius* Radd (Anacardiaceae)**", foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.



Felipe de Almeida Borges
Secretário CEUA/UFGD
Felipe de Almeida Borges
Assistente em Administração
SIAPE - 1669836
