

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DE TOXICIDADE (AGUDA
E SUBAGUDA) DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. em ratos
Wistar**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Amanda Luana Forbrig Froeder

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

ESTUDO FITOQUÍMICO E DE TOXICIDADE (AGUDA E SUBAGUDA) DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. em ratos Wistar

Amanda Luana Forbrig Froeder

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Margareth Linde Athayde

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Forbrig Froeder, Amanda Luana
ESTUDO FITOQUÍMICO E DE TOXICIDADE (AGUDA E SUBAGUDA)
DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. EM RATOS WISTAR /
Amanda Luana Forbrig Froeder.-2015.
105 p.; 30cm

Orientador: Margareth Linde Athayde
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. *Celtis iguanaea* 2. esporão-de-galo 3. Cannabaceae
4. Antioxidante 5. Toxicidade I. Linde Athayde,
Margareth II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DE TOXICIDADE (AGUDA E SUBAGUDA)
DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. em ratos Wistar**

elaborada por
Amanda Luana Forbrig Froeder

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Comissão Examinadora:

Margareth Linde Athayde, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Aline Augusti Boligon, Dr^a. (UFSM)

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 27 de março de 2015.

*Dedico este trabalho à minha mãe, Neiva.
À ela, todo meu amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela oportunidade de presenciar as belezas da vida e me dar força para continuar nos momentos de fraqueza;

À minha família, Neiva, José e Maicol, por me ensinarem a ter caráter e a lutar pelos meus objetivos. Em especial, a minha mãe Neiva, pela dedicação, carinho e por estar sempre ao meu lado torcendo pela minha vitória.

À Dona Ema Bortoluzzi e Seu Daniel Fischer, por ceder sua propriedade para que fosse possível a coleta da planta.

À minha orientadora Dr^a. Margareth Linde Athayde pela amizade, orientação e oportunidade oferecida desde a iniciação científica, por tornar possível a realização de um sonho;

Aos meus amigos Antônio Marcos, Bárbara, Danusa e Sérgio, pela amizade, apoio, entender meus momentos de angústia e confiar na minha vitória junto comigo;

Aos meus colegas e queridos amigos de laboratório Aline, Lauren, Letícia, Thiele, Mariana, Ritiel, Amanda, Bianca, Natália, Alana, Andréia, Roberta e Robson, pela ajuda, muitos ensinamentos, apoio e amizade;

Ao Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares e Sílvio Terra Stefanello, do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica desta instituição, e ao Prof. Dr. Michel Mansur Machado, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIPAMPA, por contribuírem para o engrandecimento deste estudo.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela minha formação profissional e por todas as oportunidades oferecidas durante a graduação e pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela estrutura e subsídios oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para minha formação, para a realização deste trabalho ou que torceram por isso.

“...As forças mais relaxantes são: uma religião saudável, o sono, a música e o riso.

Tenha fé em Deus – Aprenda a dormir bem

Ame a boa música – Veja o lado divertido da vida

E a saúde e a felicidade serão suas...”

“Como evitar preocupações e começar a viver” – Dale Carnegie

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO FITOQUÍMICO E DE TOXICIDADE (AGUDA E SUBAGUDA) DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. em ratos Wistar

AUTORA: AMANDA LUANA FORBRIG FROEDER
ORIENTADORA: Dr^a. MARGARETH LINDE ATHAYDE
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 27 de março de 2015.

A espécie *Celtis iguanaea* é popularmente conhecida como esporão-de-galo, e suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de dores no corpo, reumatismo, asma, cólicas, má digestão, úlceras e como diurético, e as raízes para infecções urinárias. O presente trabalho objetivou contribuir para o estudo fitoquímico, antioxidante e antimicrobiano das raízes da planta, assim como avaliar a toxicidade aguda e subaguda das folhas de *C. iguanaea*. As folhas e raízes da planta foram secas, trituradas e maceradas com etanol (70%) por sete dias, com renovação do solvente. O material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório a fim de obter o extrato aquoso (EA). Parte do EA das raízes foi levado a secura originando o extrato bruto (EB), e o restante foi fracionado sucessivamente com diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH). Todo o EA das folhas foi levado a secura para obter EB. Na análise fitoquímica e antioxidante das raízes, a fração AcOEt apresentou a maior quantidade de polifenóis ($221,55 \pm 0,28$ mg equivalentes de ácido gálico/g), flavonoides ($28,80 \pm 0,09$ mg equivalentes de quercetina/g) e alcaloides ($3,96 \pm 0,32$ mg/g) e a melhor capacidade antioxidante através do método do DPPH ($IC_{50} = 27,97 \pm 0,35$ μ g/mL), TBARS ($IC_{50} = 42,03 \pm 4,55$ μ g/mL) e pelo teste de poder de redução ($EC_{50} = 0,86 \pm 0,13$ mg/mL, mas sem diferença estatística em relação aos outros extratos). Esta fração também foi capaz de remover radicais livres de modo significativo, através do ensaio da DCFH-DA e capaz de reverter completamente o dano oxidativo através do ensaio da proteína carbonil. No que diz respeito a avaliação da toxicidade das folhas, uma única dose de 2000 mg/kg de extrato bruto administrada a ratos *Wistar*, não causou mortalidade ou morbidade, desta forma, o extrato foi classificado na categoria 5 (LD_{50} entre 2000-5000 mg/kg) de acordo com o Guia OECD 423. No ensaio subagudo, os animais foram divididos em quatro grupos: controle e os experimentais (doses de 100, 200 e 400 mg/kg) durante 28 dias. Observou-se um aumento na glicemia dos animais, indicando uma possível toxicidade pancreática. Por outro lado, alterações enzimáticas e a análise histológica indicaram que o extrato não possui efeito hepatotóxico, mesmo na maior dose de extrato utilizada. O resultados ajudam a elucidar algumas características fitoquímicas e antioxidantes da espécie e mostram que *C. iguanaea* pode ser considerado seguro.

Palavras-chave: Esporão-de-galo. Antioxidante. Toxicidade. Cannabaceae.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

PHYTOCHEMICAL STUDY AND TOXICITY (ACUTE AND SUBACUTE) OF *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. in Wistar rats

AUTHOR: AMANDA LUANA FORBRIG FROEDER

ADVISER: Dr^a. MARGARETH LINDE ATHAYDE

Place and Date of the Defense: Santa Maria, March 27, 2015.

The *Celtis iguanaea* species is popularly known as “esporão-de-galo” and its leaves are used in folk medicine to treat body aches, rheumatism, asthma, colic, indigestion, ulcers, and as a diuretic, and roots for urinary tract infections. This study aimed to contribute to the phytochemical, antioxidant and antimicrobial study from plant roots, as well as investigated the acute and subacute toxicity of the leaves of *C. Iguanaea*. The leaves and roots of the plant were dried, triturated and macerated with ethanol (70%) for seven days, with renewal of the solvent. The material was filtered and concentrated in a rotary evaporator to obtain the aqueous extract (AE). Part of the AE roots was taken to complete dryness yielding the crude extract (CE) and the remainder was fractionated successively with dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA) and *n*-buthanol (BU). All EA leaves was taken to dryness to give EB. In the antioxidant and phytochemical analysis of roots, the EA fraction showed the highest amount of polyphenols (221.55 ± 0.28 mg gallic acid equivalents/g), flavonoids (28.80 ± 0.09 mg quercetin equivalents/g) and alkaloids (3.96 ± 0.32 mg/g) and the best antioxidant capacity by DPPH method ($IC_{50} = 27.97 \pm 0.35$ μ g/mL), TBARS ($IC_{50} = 42.03 \pm 4.55$ μ g/mL) and the reduction of power test ($EC_{50} = 0.86 \pm 0.13$ mg/mL, but no statistical difference compared to other extracts). This fraction was also capable of removing free radicals significantly through testing of DCFH-DA and able to completely reverse the oxidative damage by protein carbonyl assay. As regards the assessment of the toxicity of the leaves, a single dose of 2000 mg/kg of crude extract administered to rats did not cause mortality or morbidity, so, the extract was classified in category 5 (LD_{50} entre 2000-5000 mg/kg) in accordance with OECD 423. The guide subacute experiment, the animals were divided into four groups: control and experimental (doses of 100, 200 and 400 mg/kg) for 28 days. There was an increase in blood sugar of the animals, indicating a possible pancreatic toxicity. Moreover, enzyme levels and histological analysis indicated that the extract does not have a hepatotoxic effect, even at the highest dose used. The findings contributed to reveal some phytochemicals and antioxidants characteristics of the species and show that *C. iguanaea* can be considered safe.

Keywords: Esporão-de-galo. Antioxidants. Toxicity. Cannabaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ácido ginkgólico.....	18
Figura 2 - <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent – aspecto geral da planta. Imagem obtida da planta em seu local de coleta.....	22
Figura 3 - Estrutura da friedelina (A) e do epinefriedelinol (B).....	24

CAPÍTULO 1

Figure 1 - HPLC/DAD of CE (a), EA (b) e BU (c) fractions of <i>C. iguanaea</i> roots.....	40
Figure 2 - DPPH scavenging capacity of ascorbic acid (AA), crude extract and fractions from roots of <i>C. Iguanaea</i>	41
Figure 3 - <i>C. iguanaea</i> roots extracts and quercetin reducing power values.....	41
Figure 4 - Effect of <i>C. iguanaea</i> roots crude extract and fractions on scavenging of ROS in supernatant of rat brain homogenate by DCFH-DA method.....	42
Figure 5 - Effect of <i>C. iguanaea</i> roots crude extract and fractions on lipid peroxidation production in supernatant of rat brain homogenate.....	43
Figure 6 - Effect of CE, DCM, EA and BU fractions of <i>C. iguanaea</i> roots on protein carbonyl groups production in plasma.....	44

CAPÍTULO 2

Figure 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of <i>Celtis iguanaea</i> , detection UV was at 327 nm.....	65
Figure 2 - Activity of δ -ALA-D renal and hepatic enzyme in male Wistar rats treated (2000 mg/kg <i>C. Iguanaea</i> extract) and control (distilled water).....	68
Figure 3 - Quantification of lipid peroxidation liver and kidney tissue of Wistar rats treated with CEL and control (distilled water) by the TBARS method.....	69
Figure 4 - Activity of renal and hepatic CAT enzyme in male Wistar rats treated with CEL and control (distilled water).....	69
Figure 5 - Weight evaluation of Wistar rats during subacute treatment with <i>C. Iguanaea</i> . 70	
Figure 6 - Effect of δ -ALA-D renal and hepatic activity in rats with sub-acute treatment with <i>Celtis iguanaea</i> crude extract at concentrations of 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg compared within the control group expressed in porphobilinogen nmol/hour ($p < 0.05$).....	73
Figure 7 - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in liver and kidney, expressed as nmol/mg protein of MDA after sub-acute treatment with the crude extract of <i>C. Iguanaea</i> concentrations of 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg compared to the control group ($p < 0.05$).....	73
Figure 8 - Effects of subacute administration of the crude extract of <i>C. iguanaea</i> on the catalase enzyme activity in liver and kidneys of rats . ($p < 0.05$).....	74
Figure 9 – Photomicrography (A) Architecture of control's renal normal histology (B) Renal histology of a subject treated with 400 mg/kg <i>C. iguanaea</i> (C) Architecture of control's hepatic normal histology (D) Hepatic histology of a subject treated with 400 mg/kg <i>C. iguanaea</i>	75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 - CE and fractions contents of total phenols, flavonoids, tannins and alkaloids of <i>C. iguanaea</i> roots.....	39
Table 2 - IC ₅₀ (µg/mL) values of the DPPH and TBARS assay and EC ₅₀ (mg/mL) reducing power assay for crude extract and fractions of <i>C. iguanaea</i>	43
Table 3 - Minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/mL) of CE and fractions of <i>C. iguanaea</i> roots.....	45

CAPÍTULO 2

Table 1 - Composition of <i>Celtis iguanaea</i> CEL.....	66
Table 2 - Analysis of the effect of administration of 2000 mg/kg of the <i>C. Iguanaea</i> extract in erythrocyte parameters and levels of male Wistar rats platelets.....	66
Table 3 - Effects of the acute administration of <i>Celtis iguanaea</i> on white cells and differential leukocytes counts in rats.....	67
Table 4 - Effects of acute administration of CEL on biochemical parameters in rats.....	67
Table 5 - Effects of sub-acute administration of CEL for 28 days on biochemical parameters in rats.....	71
Table 6 - Effects of the sub-acute administration of CEL for 28 days on erythrocytic parameters and platelets in rats.....	71
Table 7 - Effects of the sub-acute administration of <i>Celtis iguanaea</i> (crude extract) for 28 days on white cells and differential leukocytes count in rats.....	72

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante.....	16
3.2 Atividade antimicrobiana.....	17
3.3 Metabólitos secundários.....	17
3.4 Toxicidade de plantas medicinais.....	19
3.5 Descrição da família Cannabaceae.....	20
3.6 Descrição do Gênero <i>Celtis</i>.....	21
3.7 Descrição da espécie <i>Celtis iguanaea</i>.....	22
4 RESULTADOS.....
MANUSCRITO 1- <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg. roots: phytochemical profile and <i>in vitro</i> antimicrobial and antioxidant capacity.....	28
Introduction.....	31
Materials and Methods.....	32
Results.....	39
Discussion.....	46
Conclusion.....	49
References.....	49
MANUSCRITO 2 - Biochemical and hematological parameters of <i>Wistar</i> rats with acute and subacute administration of the crude extract of <i>Celtis iguanaea</i> leaves (Jacq.) Sargent.....	57
Introduction.....	59
Materials and methods.....	60
Results.....	66
Discussion.....	76
Conclusion.....	81
References.....	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
6 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

INTRODUÇÃO

O uso das plantas para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. As civilizações primitivas logo perceberam que ao lado das plantas que usavam como alimentos, existiam outras que, dotadas de maior ou menor toxicidade, ao serem experimentadas no combate às suas enfermidades, revelavam grande potencial curativo. Todas as informações sobre essas plantas medicinais foram sendo transmitidas oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passarem a ser guardadas como um tesouro precioso (CUNHA, 2005).

Uma nova fase da utilização de plantas medicinais deu-se início a partir do final do século XIX, com a substituição progressiva destas e dos seus extratos, pelos compostos responsáveis por sua ação farmacológica. Nos últimos 50 anos, devido ao desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais modernos, apoiados em aparelhos cada vez mais sofisticados, pode-se obter um melhor conhecimento da composição química dos fármacos vegetais e estrutura dos seus princípios ativos. Atropina, ácido salicílico, colchicina, digoxina, morfina e quinina são alguns exemplos de fármacos extraídos de plantas. A maioria foi descoberta por meio da investigação das curas tradicionais e conhecimentos populares (GILANI e ATTA, 2005).

Os produtos naturais são muito reconhecidos pela sua importância no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas ainda como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais (CALIXTO et al., 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

O Brasil, por possuir a maior biodiversidade do planeta, associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais (BRASIL, 2006). Apesar de possuir cerca de 100.000 espécies vegetais superiores catalogadas, menos de 10% dessas tem estudos científicos que as validem quanto à qualidade, eficácia e segurança. Desta forma, a partir de novos fármacos de origem

vegetal ainda não estudados, muitas patologias que permanecem sem um tratamento adequado, poderão ser tratadas de forma mais eficiente (SIMÕES et al., 2010).

No intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo brasileiro na área de plantas medicinais e fitoterápicos, foi elaborada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira. Essa política foi aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006).

Por sua vez, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, pactuada na Comissão Intergestores Tripartite, aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde no ano de 2005 e publicada por meio da Portaria Nº 971, 3 de maio de 2006, propôs a inclusão de plantas medicinais, fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa, acupuntura e termalismo social/crenoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde (BRASIL, 2006). Junto com este documento, houve a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos (Rename-Fito) e o provimento do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS (BRASIL, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem elaborado normas para a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos. A resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 48 de 16 de março de 2004, tem como base principal a garantia da qualidade do medicamento para o consumidor por meio de vários critérios que abrangem avaliação farmacêutica, padrões para o material vegetal bruto, composição das preparações fitoterápicas, estabilidade do produto final e comprovação da eficácia e segurança (BRASIL, 2004).

Apesar da grande evolução da medicina alopática e os investimentos para regulamentação dos medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, existem ainda obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes que, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para a utilização desta terapia alternativa, principalmente dos países em desenvolvimento (VEIGA e PINTO, 2005). Estas plantas da flora nativa são consumidas no Brasil com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas ou efeitos tóxicos. Autores sugerem a existência de uma crença da população de não existir efeito prejudicial à saúde com o emprego de plantas medicinais (SCHENKEL, 1995; MARQUES, 2001). Isto, entretanto, não é verdade, sendo a toxicidade de plantas um risco para a população e a mesma deve ser alertada quanto ao seu uso indiscriminado.

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se *Celtis iguanaea*, pertencente à família Cannabaceae e conhecida popularmente como esporão-de-

galo. Amplamente distribuída no sul da América do Sul, ainda é uma planta pouco conhecida do ponto de vista fitoquímico. Sabendo-se da ampla variedade de indicações terapêuticas com base somente no uso popular, como em casos de dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má digestão e como diurético, tornam-se importantes novos estudos que descrevam os constituintes químicos e possíveis atividades biológicas da planta, como também sua toxicidade, para que desta forma, possa se contribuir para o conhecimento da flora brasileira e também buscar novos compostos bioativos de interesse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo geral realizar o estudo fitoquímico das raízes de *Celtis iguanaea*, analisar as capacidades antioxidante e antimicrobiana, assim como avaliar a toxicidade das folhas da planta.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise fitoquímica qualitativa preliminar do extrato bruto das raízes de *Celtis iguanaea*;
- Realizar o doseamento de compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados e alcaloides do extrato bruto e frações das raízes da planta;
- Delinear o perfil cromatográfico das raízes e das folhas planta por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Testar a atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações das raízes utilizando a técnica de micro diluição em caldo;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações das raízes pelo método colorimétrico do DPPH, a peroxidação lipídica pelo método do TBARS, a inibição da oxidação de proteínas pelo método da proteína carbonil e o poder de redução dos extratos;
- Determinar a formação intracelular de EROS através do método da DCFH-DA (raízes);
- Avaliar a toxicidade aguda *ex vivo* do extrato bruto das folhas de *C. iguanaea* de acordo com o Guia OECD 423;
- Avaliar a toxicidade subaguda *ex vivo* do extrato bruto conforme o Guia OECD 407.
- Verificar possíveis alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos após administração aguda e subaguda do extrato bruto das folhas de *C. iguanaea*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante

Os radicais livres são estruturas que possuem na parte química um ou mais elétrons desemparelhados, sendo, em sua maioria, muito instáveis, altamente reativos e de meia vida curta. A geração destas espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras, é parte integrante do metabolismo humano e pode ser encontrada em diversas condições fisiológicas. Os ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na apoptose e na fagocitose de agentes patogênicos. Sua produção também pode ocorrer a partir de fontes exógenas, como a radiação ionizante, raios UV, fumo, substâncias tóxicas como solventes, herbicidas e drogas (quimioterápicos), entre outros (SANTOS, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Os organismos vivos possuem sistemas antioxidantes endógenos que ajudam a manter a formação de radicais livres em níveis toleráveis. Quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, gera o estresse oxidativo com dano consequente (SCHAFER e BUETTNER, 2011). Alterações de funções e morte celular podem ocorrer quando os agentes oxidantes causam danos excessivos aos componentes celulares, oxidando lipídeos, lisossomas e membranas mitocondriais (GORDON, 1996). As reações dos radicais livres resultam em danos celulares por diferentes mecanismos que precedem a várias patologias, como inflamações, reumatismos, doenças gastrintestinais, isquemias, doenças cardiovasculares, indução do câncer, desordens no sistema nervoso e processos neurodegenerativos (CHOI, 2002). Desta forma, torna-se importante a busca por substâncias químicas capazes de inibir estes processos de oxidação *in vivo* sem apresentar risco à saúde humana (CHO et al., 2003).

As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes que mitigam os danos moleculares produzidos por radicais livres, podendo ser utilizadas como alternativa de prevenção e redução de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Os compostos fenólicos são a classe mais importante dessas substâncias encontradas nos vegetais (TSUDA et al., 1994; ZIELINSKA; GÜLDEN; SEIBERT, 2003). Dentre os vários polifenóis, os flavonoides são, talvez, o grupo mais importante (DI MAMBRO e FONSECA, 2005).

3.2 Atividade antimicrobiana

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com propriedades antimicrobianas pode ser de grande importância em tratamentos terapêuticos. Devido ao fato de, em geral, as bactérias adquirirem resistência aos antibióticos, aumentou-se a necessidade de buscar novos compostos que possam ser utilizados no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados em diferentes países para comprovar a eficiência de plantas como agentes antimicrobianos, atividade relacionada aos compostos sintetizados em seu metabolismo secundário, como compostos fenólicos (BOLIGON et al., 2013; MOURA-COSTA et al., 2012; PANGHAL; KAUSHAL; YADAV, 2011).

Além dos polifenóis, óleos essenciais, alcaloides, quinonas, flavonas, flavonols, flavonoides, taninos e cumarinas representam os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas descritos na literatura (DUARTE et al., 2007; HATANO et al., 2005; MOREL et al., 2005).

3.3 Metabólitos secundários

3.3.1 Definição, função e importância

Metabolismo é o conjunto de reações que continuamente estão ocorrendo em toda célula viva. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados por essas reações são chamados metabólitos. O metabolismo primário fornece as substâncias envolvidas nas funções básicas e essenciais da vida celular, como respiração e biossíntese de aminoácidos e outras substâncias necessárias para a vida da célula. Basicamente, todos os organismos convivem com os mesmos metabólitos primários. Os metabólitos secundários, encontrados em vegetais, micro-organismos e, em menor escala, animais, são específicos das espécies, e embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação das espécies (SIMÕES et al., 2010).

Diversas funções são atribuídas aos metabólitos secundários, como defesa contra herbívoros, proteção contra raios UV, atração de polinizadores e de animais dispersores de

sementes, entre outras. Esses metabólitos frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Vários pesquisadores da área farmacêutica, agrônômica e alimentar descrevem a importância dos metabólitos secundários, principalmente por serem fontes promissoras de moléculas potencialmente úteis ao homem (BRAZ FILHO, 2010).

Dentre estes metabólitos, encontram-se os compostos fenólicos, pertencentes a uma classe de substâncias químicas que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem ao menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxilas (SIMÕES et al., 2010). Dentre os polifenóis pertencentes aos vegetais encontram-se os derivados da cumarina, ligninas, taninos, flavonoides e terpenoides.

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que funcionam como ativos farmacológicos em muitas plantas medicinais. São atribuídos a essa classe de polifenóis propriedades como anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana, entre outras (SIMÕES et al., 2010). Muitas das ações biológicas dos flavonoides foram atribuídas às suas propriedades antioxidantes potentes, como, por exemplo, a prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (ARAÚJO et al., 2005).

Plantas ricas em taninos são empregadas pela medicina tradicional no tratamento da diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário, processos inflamatórios em geral (SIMÕES et al., 2010) e como antissépticos (ação antibacteriana e antifúngica) (CUNHA, 2005).

Alcaloides são substâncias básicas nitrogenadas, pouco solúveis em água e dotados de uma estrutura complexa onde os átomos de nitrogênio são parte de um anel heterocíclico da molécula. Estes compostos são responsáveis por muitas atividades farmacológicas, tais como antibacteriana, antitumoral, hipoglicemiante, diurética, anestésica, analgésica, cardiotônica, psicoestimulantes e neurodepressores (LIM et al., 2009).

Os fitoesteroides, esteroides das plantas, possuem uma grande variedade de benefícios reconhecidos cientificamente para várias doenças físicas, aterosclerose, câncer de próstata e de cólon (NAIR; KANFER; HOOGMATTENS, 2006; RAO e JANEZIC, 1992). Os esteroides mais abundantes das plantas são o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (ALASALVAR et al., 2003).

3.4 Toxicidade de plantas medicinais

As plantas medicinais da flora nativa do Brasil são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológica e possíveis efeitos tóxicos. A toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial quando comparada com a toxicidade dos medicamentos alopáticos. No entanto, já existem muitas investigações científicas que evidenciam a toxicidade de alguns compostos e alertam para os riscos do consumo indiscriminado de plantas que os contêm (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; VEIGA E PINTO, 2005).

Por exemplo, podemos citar o *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), muito utilizado na medicina tradicional, mas há relatos de casos de efeitos tóxicos em pessoas idosas, como hemorragia intracerebral espontânea, hematoma subdural lateral, hemorragia parietal, dentre outras (CUPP, 2000). O ácido ginkgólico (Figura 1), alquilfenóis e outros compostos presentes nos extratos de ginkgo apresentam um alto nível de potencial tóxico (BARON-RUPPERT e LUEPKE, 2001).

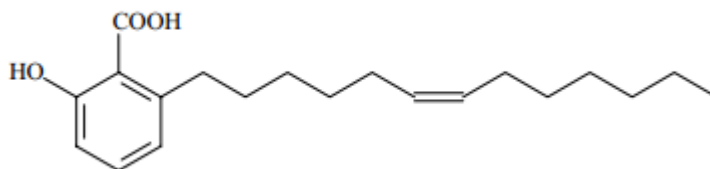


Figura 1. Ácido ginkgólico

Estudos da literatura sobre os efeitos tóxicos da kava-kava (*Piper methysticum*), revelaram uma série de efeitos indesejáveis, tais como sedação, diminuição do estado de alerta, fadiga, problemas gastrointestinais, alterações visuais e de equilíbrio. Esta planta também pode potencializar os efeitos de depressores do sistema nervoso central (ex. Etanol e barbitúricos) (PEPPING, 1999; WOOLTORTON, 2002).

De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), no ano de 2010, foram registrados no Brasil 1132 casos de intoxicação humana por uso de plantas, sendo que desses, 5 foram a óbito, apresentando uma letalidade de 0,32%,

enquanto que medicamentos apresentaram uma letalidade menor, de 0,26% (SINITOX, 2010).

A maioria dos problemas com a administração de fitoterápicos e drogas vegetais resulta da dose, posologia ou dia de administração inadequadas; da forma imprópria do preparo; do uso contínuo; associação de várias plantas, interação com fármacos sintéticos; contaminação da planta com metais pesados; resíduos de pesticidas e adulteração de produtos não declarados na embalagem. Soma-se a isso, o número de espécies diferentes com a mesma sinonímia popular e que são utilizadas como se fossem a mesma planta por não apresentarem a identificação botânica correta (COLOMBO, 2008; CUNHA 2009; SIMÕES et al., 2010).

3.4 Descrição da família Cannabaceae

A família Cannabaceae apresenta 11 gêneros e cerca de 170 espécies amplamente dispersas em regiões tropicais e temperadas (JUDD et al., 2009). No Brasil, encontram-se quatro gêneros: *Celtis* L, *Trema* Lour, *Cannabis* L. e *Humulus* L.. O gênero *Celtis* possui o maior número de espécies da família, distribuindo-se pela Ásia, África e continente americano (SOUZA e LORENZI, 2008).

Em sua maioria são árvores ou arbustos lenhosos, eretos ou escandentes, monóicos ou polígamos. Folhas simples, alternas, geralmente dísticas, base geralmente assimétrica, bordo dentado a serrado, nervura secundária basal alongada até o terço superior (PEDERNEIRAS et al., 2011).

O gênero *Trema* ocorre nas regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios e nas Américas ocorrem de quatro a cinco espécies, desde o sul da Flórida e ilhas do Caribe até o norte da Argentina (SATTARIAN, 2006). No Brasil ocorre provavelmente uma única espécie, *Trema micranta*, uma planta perene e arbórea. Seu extrato demonstrou possuir atividade analgésica e anti-inflamatória em ratos e camundongos e suas folhas são utilizadas no tratamento de doenças da pele, sífilis, reumatismo e como hipoglicemiante (SCHOENFELDER; CIRIMBELLI; ZANETTE, 2006). Frimmel et al. (2000) isolaram vitexina, paprazina, β sitosterol e ácido ursólico das folhas e ramos da espécie.

A raiz de *Trema orientalis* é usada na medicina popular para o tratamento de traumatismos, hemorragia intestinal e estomacal. Foram isolados e identificados diversos

compostos desta espécie, entre eles triterpenos, esteroides, ácidos graxos e flavonoides (KUO et al., 2007).

Parte da literatura aponta para uma classificação monotípica do gênero *Cannabis*, sendo *Cannabis sativa* a única espécie registrada, possuindo diversas variedades, como *Cannabis sativa* var. *indica*, var. *sativa*, var. *ruderalis*, var. *vulgaris*, var. *mexicana*, etc (SMALL e CRONQUIST, 1976). Porém, nos últimos anos, nota-se uma tendência a aceitar a classificação taxonômica politípica (mais de uma espécie) do gênero *Cannabis* (MCPARTLAND et al., 2000). A proibição do uso dessa planta advém da presença do tetraidocanabinol (THC), principal composto psicoativo da planta (BRENNEISEIN, 2006). O uso medicinal de componentes da *Cannabis sativa* tem sido estudado ao redor do mundo. Alguns destes componentes, que não tem ação psicotrópica, podem ter propriedades anticonvulsivantes e no controle de crises epiléticas (DANTAS, 2005).

3.5 Descrição do Gênero *Celtis*

O gênero *Celtis*, com aproximadamente 70 espécies de arbustos ou árvores, é o mais numeroso da família Canabaceae. Distribui-se nas regiões temperadas e tropicais dos dois hemisférios. Na América do Sul estima-se de 6 a 30 espécies (HWANG et al., 2003). Dentre as espécies de importância destaca-se *Celtis chinensis* ou *Celtis sinensis*, bem distribuída na Coreia e frequentemente usada na medicina popular para cura de doenças gástricas, dor abdominal e urticária. Na Coreia, Japão e China suas cascas são usadas para o tratamento de irregularidades menstruais, doenças gástricas e dores abdominais. (PEDERNEIRAS et al., 2011).

Celtis australis L. é uma pequena árvore de até 25 m de altura. Na Europa, a espécie é restrita ao Sul. A decocção de suas folhas e frutos é usada no tratamento da amenorreia, cólicas menstruais, úlceras, diarreia e disenteria (DEMIR et al., 2002). Estudos sobre compostos fenólicos das folhas da planta *C. australis* revelaram a presença de 200-O-a-L rhamno piranosil vitexina, isovitexina, 200-O-a-L-ramno piranosil-7-O-metil vitexina, citisósido e acetina 7-O-glicosídeo (SOMMAVILLA et al., 2012).

A espécie *Celtis philippinensis* é uma árvore ou arbusto lenhoso perene, amplamente distribuído na África, Ásia e Austrália. Dois triterpenos tóxicos, além de cinco outros

compostos triterpênicos conhecidos foram isolados a partir dos galhos de *C. philippinensis* (HWANG et al., 2003).

As folhas de *Celtis africana* são usadas na medicina tradicional africana para o tratamento de indigestão e edema. Perveen e colaboradores (2011) isolaram dois novos compostos C-glycosilflavonoides, celtisides A e B, juntamente com cinco C-glycosylflavonoides conhecidos: vitexina, orientina, isoswertiajaponina, isoswertisina e 200-Orhamnosyl vitexina.

3.6 Descrição da espécie *Celtis iguanaea*

Celtis iguanaea é uma angiosperma e dicotiledônea, caracterizada como arbusto ou pequena árvore (Figura 2). É conhecida popularmente por esporão-de-galo, grão de galo, joá-mirim, jameri, tela, taleira, sarã, gurrupιά ou gumbixava, dependendo da região do Brasil onde é encontrada (LORENZI e SOUZA, 1999; PIO, 1931; SILVA e PROENÇA, 2008).

É uma planta espinhenta de 6 a 9 metros de altura, dotada de copa arredondada, tronco ereto e cilíndrico de 15 a 30 cm de diâmetro, com casca rugosa e íntegra (LORENZI e SOUZA, 1999). Os ramos são compridos, aproximadamente 7 metros, muito flexíveis, armados com espinhos estipulares curtos, agudos, solitários e recurvados (PIO, 1931). As folhas são simples, descolores, de bordas lisas na base e serradas no restante, glabras na face superior e espazo-pubescentes na inferior com nervuras salientes de cor amarelada. Possui fruto drupa esférica, glabra, amarela, com polpa carnosa e adocicada, contendo uma única semente. Os frutos são comestíveis e muito procurados por várias espécies de pássaros. Floresce durante os meses de agosto a outubro, e os frutos amadurecem de fevereiro a março (LORENZI e SOUZA, 1999).

Possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo dos Estados Unidos à América do Sul. No Brasil é encontrada nos estados do Acre, Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (LORENZI e SOUZA 1999).

A grande variação no tamanho de suas folhas deu a espécie vasta sinonímia botânica: *Celtis aculeata* Sw., *Celtis aculeata* var. *laevigata* (Kunth) Planch., *Celtis alnifolia* (Wedd.) Planch., *Celtis aspérula* Miq., *Celtis bonplandiana* Planch., *Celtis brevifolia* (Klotzsch) Miq.,

Celtis dichotoma (Klotzsch) Miq., *Celtis goudotii* Planch., *Celtis hilariana* Planch., *Celtis morifolia* Planch., *Celtis pavonii* Planch., *Celtis spinosa* Spreng., *Celtis spinosissima* (Wedd.) Miq., *Celtis triflora* (Ruiz ex klotzsch) Miq., dentre outras (CORRÊA, 1984).



Figura 2. *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent – aspecto geral da planta. Imagem obtida da planta em seu local de coleta – Jaboticaba (RS).

Relatos populares indicam o uso do esporão-de-galo, sob a forma de chá ou abafado de suas folhas, para o tratamento de várias queixas. As mais comuns são dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má digestão e como diurético (PEREIRA et al., 2008). Ortêncio (1994) estudando o uso popular de plantas medicinais no estado de Goiás encontrou a indicação de esporão-de-galo para “tratamento de bexiga” e rins (cálculos renais e pielonefrite).

Em um levantamento etnobotânico realizado por Silva e Proença (2008) sobre o uso e disponibilidade de plantas medicinais por comunidades rurais e urbanas no município de Ouro Verde de Goiás (GO), *Celtis iguanaea* teve um CUPc (concordância de uso popular corrigida) de 54% para o uso em infecções urinárias (folha/raiz – decocção). Através da CUPc são apontados os usos mais difundidos e aceitos para uma espécie, pois provavelmente são utilizados e reconhecidos por muitas pessoas, o que evidencia maior segurança quanto a sua validade. Assim, as espécies com CUPc acima de 50% podem evidenciar potencial uso

medicinal, funcionando, até mesmo, como uma pré-triagem de espécies para estudos etnofarmacológicos. *Celtis iguanaea*, portanto, apresenta um alto consenso de informações e, conseqüentemente, implica em maior probabilidade de eficácia quanto ao seu uso.

Estudo realizado em cidades do Equador apontou o uso das folhas e frutos da planta, na forma de infusão, para dor renal e hepática (TENE et al., 2007). Na medicina popular do México, folhas e flores da espécie são usadas para o controle do diabetes *mellitus* (GALICIA et al., 2002). Rodrigues (2007), em pesquisa etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de florestas estacionais semidecíduais na região do Alto Rio Grande (MG), aponta o uso popular da casca do caule de *Celtis iguanaea* em casos febris. Segundo Pio (1931), a casca apresenta bastante tanino e é utilizada no tratamento de leucorréias, enquanto que seus frutos, macerados e fervidos, são utilizados em casos de disenteria e catarro intestinal.

Em uma caracterização farmacognóstica das folhas de *C. iguanaea*, Paula et al (2010) detectaram mucilagem, flavonoides e cumarinas na triagem fitoquímica. Os teores de umidade, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, polifenóis e flavonoides totais encontrados pelos autores foram 7,05%, 18,2%, 7,43%, 0,55% e 0,53%, respectivamente.

Em 2012, Trevisan e colaboradores utilizando a fração hexano das cascas do esporão-de-galo, isolaram e identificaram dois triterpenos pentacíclicos da série friedelano, a friedelina e o epifriedelinol (Figura 3). Os mesmos autores ainda realizaram a avaliação da toxicidade das cascas frente à *Artemia salina*, verificando a ausência de toxicidade, uma vez que o extrato etanólico e frações semipurificadas das cascas da espécie, apresentaram valores de $CL_{50} > 1000$ ppm.

Costa et al. (2008) realizaram um estudo para a investigação das ações farmacológicas do extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* em modelos de úlcera gástrica induzida por diferentes agentes ulcerogênicos em camundongos. Seus resultados permitiram sugerir que a espécie possui princípios ativos com atividade gastroprotetora, já que seu extrato mostrou-se efetivo em reduzir o índice de lesões e o número de úlceras induzidas pelos agentes ulcerogênicos, o que pode justificar o uso popular da planta no tratamento de distúrbios gástricos. Em trabalho realizado por Paula (2009), o extrato aquoso das folhas também foi capaz de proteger a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por indometacina, etanol e estresse, diminuindo o volume e a acidez da secreção ácida gástrica e alterando significativamente a motilidade por meio do aumento do trânsito intestinal.

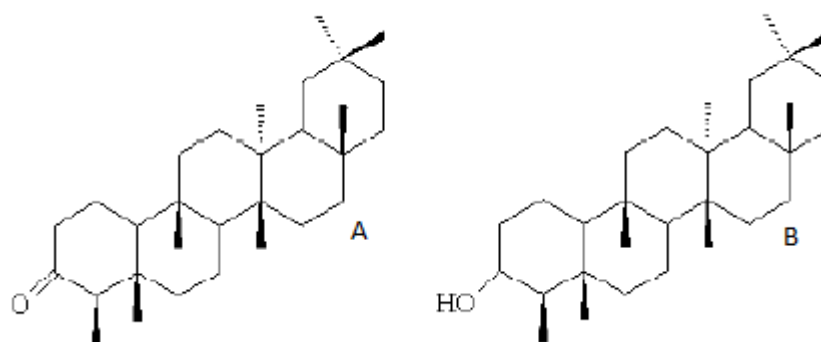


Figura 3 - Estrutura da friedelina (A) e do epinefriedelinol (B).

Outro estudo que novamente sugeriu o efeito antiulcerogênico de *C. iguanaea* foi o de Souza e colaboradores (2013), após administração via oral do extrato hexânico das folhas. Os resultados obtidos indicaram esse efeito após a indução de lesões gástricas por indometacina, e pela via intraduodenal após a indução de lesões gástricas pelo método da ligadura pilórica, tendo em vista a capacidade do extrato de diminuir o número de úlceras e o índice de lesões. Os autores relacionaram o efeito antiulcerogênico à uma atividade anti-secretora, observada após administração intraduodenal no modelo de ligadura pilórica.

Com o objetivo de investigar os mecanismos antiúlcera das folhas de *C. Iguanaea*, Martins et al. (2014) utilizou o modelo indutor de úlcera com HCl/EtOH considerado um dos agentes mais intensos para indução de úlcera gástrica. O extrato hexânico (HE) foi obtido por uma extração exaustiva por Soxhlet. A caracterização química detectou a presença de lipídios, lipídios esteroides, glicosídeos de esteroides e glicosídeos de polifenóis. A administração oral de 100 mg/kg e 200 mg/kg de HE foi capaz de proteger a mucosa gástrica. O autores sugeriram a participação de muco, bem como o envolvimento de receptores $\alpha 2$ -adrenérgico, NO e prostaglandinas como mecanismo gastroprotetor de *C. Iguanaea*.

Em um estudo preliminar da toxicidade aguda das folhas de esporão-de-galo de acordo com o modelo biológico utilizando o peixe *Poecilia reticulata*, Santos et al. (2011) encontraram uma CL_{50} (concentração letal média) de 2,69 g/L com 96 h de exposição. Os resultados das análises histológicas da pele dos animais não apresentaram alterações em nenhuma das concentrações estudadas, o que, juntamente com o CL_{50} encontrado, permitiu sugerir um baixo potencial tóxico da espécie.

Em 2008, Pereira et al. realizaram uma investigação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do extrato aquoso das folhas da espécie em células somáticas de *Drosophila melanogaster* pelo Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática. A análise microscópica dos pêlos mutantes presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos permitiu demonstrar que o extrato aquoso de *Celtis iguanaea* não foi capaz de induzir eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos nas condições experimentais apresentadas.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta seus resultados na forma de manuscritos (manuscritos 1 e 2). Cada manuscrito é constituído de introdução, metodologia, resultados, discussão e conclusão.

Além disso, esta dissertação contempla os itens considerações finais, no qual os resultados são interpretados em conjunto, conclusões e referências bibliográficas, as quais são relativas às seções introdução, revisão bibliográfica e considerações finais.

4 RESULTADOS

MANUSCRITO 1

***Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. roots: phytochemical profile and *in vitro* antimicrobial and antioxidant capacity**

Amanda Luana Forbrig Froeder, Thiele Faccim de Brum, Janaina Kieling Fröhlich, Lauren Pappis, Letícia Teixeira Nunes, Mariana Piana, Sílvio Terra Stefanello, Félix Alexandre Antunes Soares, Camila Martins Guez, Michel Mansur Machado and Margareth Linde Athayde

***Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. roots: phytochemical profile and *in vitro*
antimicrobial and antioxidant capacity**

**Amanda Luana Forbrig Froeder¹, Thiele Faccim de Brum¹, Janaina Kieling Fröhlich¹,
Lauren Pappis¹, Letícia Teixeira Nunes¹, Mariana Piana¹, Sílvio Terra Stefanello², Félix
Alexandre Antunes Soares², Camila Martins Guez³, Michel Mansur Machado³ and
Margareth Linde Athayde^{1,*}**

¹ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

² Post-Graduate Program in Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

³ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brazil.

*Correspondence to: Amanda Luana Forbrig Froeder, Department of Industrial Pharmacy of Federal University of Santa Maria, Campus Camobi, prédio 26, sala 1115. Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil. [telephone number +55 55 3220 9618; fax: +55 55 3220 8248; e-mail: amandafroeder@hotmail.com].

ABSTRACT

Celtis iguanaea belongs to Cannabaceae family which comprises 11 genres distributed in tropical and temperate regions. This specie is popularly known as “esporão-de-galo” and it is used in traditional medicine in Brazil for many diseases, as urinary infection, indigestion, pain in the body, asthma and other. The aim of this study was to carry out a pharmacognostic characterization of the fractions from *C. iguanaea* roots and evaluate the antioxidant and antimicrobial activities. The ethyl acetate fraction showed the strongest radical scavenging activity in the DPPH method, as well as, in lipid peroxidation inhibitory ($IC_{50} = 27.97 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$ and $IC_{50} = 42.03 \pm 4.55 \mu\text{g/mL}$, respectively). This fraction also exhibited the highest of polyphenols ($221.55 \pm 0.28 \text{ mg/g}$), flavonoids ($28.80 \pm 0.09 \text{ mg/g}$) and alkaloids ($3.96 \pm 0.32 \text{ mg/g}$). All extracts were able to reduce levels of plasma protein carbonyl. In addition, gallic acid was identified and quantified by HPLC/DAD. The fungus *Sacharomyces cerevisiae* was the only susceptible microorganism with MIC values of 0.25 and 0.50 mg/mL to EA and DCM, respectively. Taken together, our results indicate that this plant has antioxidant potential and can be a promising source of natural antioxidants.

Keywords: Cannabaceae; polyphenols; HPLC/DAD; DPPH, TBARS.

Introduction

Medicinal plants have been used for many therapeutic purposes since long times. The presence of phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids and tannins, nitrogen compounds such as alkaloids and amines, as well as vitamins, terpenoids and other metabolites of fruits and vegetables are associated with beneficial effects, mainly attributed to their high antioxidant capacity (Cai et al. 2004; Djeridade et al. 2006; Yang et al. 2009). The ability of these compounds, mostly polyphenols, to scavenge free radicals and active oxygen species such as singlet oxygen and hydroxyl radicals, before these free radicals attack cells and other biological components, can prevent or suppress aging and many diseases associated with oxidative stress, like cancer, cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases, among other (Mayne, 2003).

Several studies have demonstrated the antimicrobial activity of phenols and/or phenolic extracts (Proestos et al. 2005; Sousa et al. 2006; Boligon et al, 2013). It can make them a good alternative to antibiotics and chemical preservatives. Moreover, there is a growing interest in using natural antimicrobial compounds due to increasing resistance of microorganisms to antibiotics (Oliveira et al. 2007).

Celtis iguanaea (Jacq.) Sarg belongs to Cannabaceae family, which consists of 11 genera and 180 species (Judd et al. 2009). It is popularly known as “esporão-de-galo”, “taleira” and “gurrupiá” and it occurs in American South and many Brazil states, as Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná. In folk medicine, infusions of the leaves are used as analgesic, antiasthmatic, digestive, diuretic and other, and its roots for urinary infection (Tene et al. 2007). A previous study demonstrated antiulcerogenic activity of crude ethanolic extract of *C. iguanaea* leaves (Souza et al. 2013). In this same work, the hexane fraction inhibits the gastric acid secretion, increase the gastric pH, decreasing the gastric acidity and total gastric contents.

Trevisan et al. (2012), isolated the triterpenes friedelin and epifriedelinol from the bark hexane fraction (Trevisan et al. 2012).

The aim of this study was to carry out a pharmacognostical screening of the fractions from the roots of *C. iguanaea* as well as to quantify phenolic compounds by HPLC-DAD at these fractions. Additionally, we perform an antimicrobial activity against fungus and bacterias. An antioxidant screening was evaluated by scavenging capacity on DPPH radicals, reducing power of iron of the extract, lipid peroxidation inhibition, inhibition of protein oxidation (carbonyl content) and scavenging of ROS by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) method.

Materials and Methods

Chemicals, apparatus and general procedures

All chemicals and solvents were of the analytical grade obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The absorbance of phenolics, flavonoids, tannins, alkaloids, DPPH, TBARS, DCFH-DA and protein oxidation assay were measured in a Shimadzu-UV-1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. HPLC/DAD analysis was performed on a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser, CBM 20 A integrator, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and LC Solution 1.22 SP1 software.

Plant collection and extractions

Roots of the *C. iguanaea* were collected in Jaboticaba, Rio Grande do Sul State, Brazil (27°37'48''S, 53°16'55''W), in April of 2011. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register

number SMBD 12.952. Plant material (2800g) was dried in a stove at controlled temperature (40°C), triturated and subjected to maceration with 70% ethanol for seven days, with daily agitation. The solvent was renewed until the total extraction of the compounds. The material was filtered and concentrated under reduced pressure, in order to obtain an aqueous extract. Part of this aqueous extract was evaporated to dryness to provide a Crude extract (CE). The remaining aqueous extract was partitioned with solvents of increasing polarity: Dichloromethane (DCM), Ethyl acetate (EA) and *n*-Butanol (BU), which also were dried to give each corresponding fraction.

Phytochemical analysis

Preliminary phytochemical screening

The phytochemical screening was realized as a preliminary evaluation of the classes of secondary metabolites present in the roots. This phytochemical study was performed according to the method described by Moreira (1979), which comprising a series of qualitative characterization reactions to aqueous and hydroalcoholic extract.

Determination of total phenolics contents

Total phenolic content was performed by Folin-Ciocalteu method with slightly modifications (Chandra et al. 2004). Samples were prepared in triplicate at 0.15 mg/mL and the Absorbance was measured at 730 nm in spectrophotometer. The standard curve was prepared with gallic acid for quantification and the results were expressed in milligrams equivalents of gallic acid (GAE) per gram of each fraction (mg/g GAE).

Determination of total flavonoids contents

The determination of flavonoids was determined according to the colorimetric method described by Woisky and Salatino (1998), using a 2% aluminum chloride solution. Samples were prepared in triplicate at 1 mg/mL. The absorbance was determined by spectrophotometer at 420 nm. A standard curve of rutin was used for quantification, and the results were expressed as mg of rutin equivalents per gram of extract (mg/g RE).

Determination of condensed tannins

The condensed tannins content was performed using the method described by Morrison et al (1995), with some modifications. Samples were prepared at a concentration of 25 mg/mL in methanol. Solution A (1 g of vanillin in 100 mL of methanol) and solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used to this experiment. The absorbance was read at 500 nm against the blank of each sample. The condensed tannins content was expressed in milligram equivalents of catechin per gram of each fraction.

Determination of total alkaloids

Total alkaloids were determined by precipitated reaction with Dragendorff's reagent, described by Sreevidya and Mehrotra (2003). The CE and fractions were prepared at a concentration of 50 mg/mL, absorbance was measured at 435 nm and the test was performed in triplicate. A standard curve of bismuth nitrate was used to calculate the total alkaloids content, and the results were expressed as mg of total alkaloids per gram of extract.

HPLC/DAD analysis of gallic acid

Reverse phase chromatography analyses were carried out with a Phenomenex C-18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles, volume injection was 40 µL and the gradient elution was conducted according to Evaristo and Leitão (2001) method with minor modifications. Mobile phase consists of water containing 2 % acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B) and the flow rate was 0.8 mL/min. Identification of phenolics was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with the standard. Samples of CE and fractions of *C. iguanaea* were solubilized at mobile phase. Quantification was performed by integration of the peaks using the external standard method. The chromatographic operations were carried out in triplicate.

Antimicrobial assay

The CE and fractions were individually evaluated against *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida glabrata* (clinical isolate), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Sacharomyces cerevisiae* (clinical isolate). The minimal inhibitory concentration (MIC) of each fraction against the test microorganisms was determined by the broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards CLSI M07-A8 (2009) to bacteria and CLSI M27-A3 (2009) to yeast. The experiments were repeated twice and the results were determined as an average value. Samples were prepared in DMSO in six different dilutions (1000, 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 µg/mL). Bacterial strains were cultured overnight at 35 °C in Mueller-Hinton agar. Yeasts were cultured for 48 hours at 30 °C in Sabouraud agar. The first column of the plate was reserved for negative control wells (without inoculants) and the last column, for the growth control wells (without antimicrobial agents). The MIC was considered as the

lowest concentration of the extract or fraction inhibiting the total growth of microorganism. MIC was detected by lack of visual turbidity (matching the negative growth control).

Animals

Male Wistar rats (3.0–3.5 months of age and weighing 270–320 g) were maintained groups of 3–4 rats per cage. They had continuous access to food and water in a room with controlled temperature (22 ± 3 °C) and on a 12 h light/dark cycle. The animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) (project number 23081.005770/2009-38). After killed the rats by decapitation, the brain tissue was rapidly dissected, weighed and immediately homogenized in Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4,000 rpm and the supernatant was used for inhibition of lipid peroxidation and test of scavenging of ROS by DCFH-DA method.

Human Blood Samples

Peripheral blood samples were collected after 12-h overnight fasting by venipuncture using top Vacutainer (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with heparin. Blood specimens (5 ml) were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500g, to obtain the plasma samples.

Antioxidant screening methods

DPPH radical scavenging capacity

The fractions and CE of *C. iguanaea* roots were evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method described by Choi et al. (2002). Samples were diluted in ethanol at the following concentrations: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81 µg/mL. The DPPH quenching ability was expressed as IC₅₀ (the extract concentration required to inhibit 50 % of the DPPH in the assay medium). Each sample was mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the absorption was measured at 518 nm. A solution of DPPH in ethanol was used as negative control and ascorbic acid (AA) in the same concentrations of the samples was used as positive control. The tests were performed in triplicate, and the calculation of the antioxidant capacity followed the equation:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \right] \quad (1)$$

where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of fractions without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of negative control.

The reducing power of the extracts

The reducing power of *C. iguanaea* roots extracts was determined as described in Oyaizu (1986) and Yen et al (2000). Briefly, 0.5 mL of each extract (0.1 – 0.5 mg/mL) in distilled water was mixed with 1.25 mL of 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) and 1.25 mL of 1% potassium ferricyanide. After incubation, 1.25 mL of 10% trichloroacetic acid were added and the mixture was centrifugated at 2795g. The upper layer (1.25 mL) was mixed with 1.25 mL of deionized water and 0.25 mL of 0.1% ferric chloride, and the absorbance was

measured spectrophotometrically at 700 nm. The extract concentration providing 0.5 of absorbance (EC_{50}) was calculated from the graph of absorbance registered at 700 nm against the correspondent extract concentration. ascorbic acid and quercetin were used as positive controls.

DCFH-DA method

Intracellular formation of ROS was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as the substrate, according to Myrhe et al (2003). The supernatant of rat brain homogenate was incubating at 37 °C with different concentrations of CE and fractions of roots of *C. iguanaea*. After 1 hour, DCFH-DA (5 μ M) was added and incubation continued for 1 hour in the dark. The fluorescence was measured using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. ROS levels (expressed as percentage value in relation to the control group) were calculated by interpolation in a standard curve of oxidized DCF, corrected by the content of protein (Lowry et al. 1951). The negative control used was ethanol and AA as positive control. The tests were performed in triplicate and data were expressed as mean \pm S.E.

Measurement of inhibition of Lipid Peroxidation (TBARS Assay)

To evaluate the inhibition of lipid peroxidation, an aliquot of 100 μ L of rat brain homogenate supernatant was incubated for 1 hour at 37 °C with pro-oxidant agent (10 μ M of $FeSO_4$) in presence or absence of CE and fractions of *C. iguanaea*. The production of TBARS (tiobarbituric acid reactive substances) was determined by the colorimetric method according to Ohkawa et al (1979). The positive control used was ascorbic acid. The extract concentration required to reduce the lipid peroxidation in 50% was expressed as IC_{50} .

Measurement of Inhibition of Protein Oxidation (Carbonyl Assay)

The plasma content of protein carbonyl groups was evaluated with the Levine method (LEVINE et al., 1990). In a test tube, 1 mL of plasma and 1 mL of CE and fractions diluted in PBS buffer (in the desired concentrations) was added. After 30 minutes at 37 °C was placed H₂O₂ 100 µm (final concentration). Dosages of protein carbonyl were performed after 60 minutes at 37 °C, according to Morabito et al. (2004). The determination of total protein in plasma was conducted using a commercial Labtest® kit as recommended by the manufacturer. The carbonyl content was expressed as nmol/g protein and all tests were performed in triplicate.

Statistical analysis

The experimental values of phytochemical composition, antioxidant capacity by DPPH assay and HPLC/DAD analysis were statistically analyzed by one-way ANOVA and the data were expressed as mean ± S.E. (n = 3). For the data analysis of inhibition of lipid peroxidation, protein carbonyl content and scavenging of ROS by DCFH-DA method, was used analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test, and $p < 0.05$ were considered significant. Data were expressed as mean ± S.E.

Results

Phytochemical profile

The preliminary screening of *C. iguanaea* roots showed positive results to anthocyanin glycosides, amino groups, flavonoids, anthocyanins, leucoanthocyanidins, flavones, triterpenoides, steroids, phenolic compounds, coumarins and organic acids.

The contents of total polyphenols, flavonoids, condensed tannins and alkaloids are shown in Table 1. EA fraction exhibited the highest content of phenolics (221.55 ± 0.28 mg/g GAE, respectively) when compared to the BU fraction (152.90 ± 0.29), CE (89.37 ± 1.08 mg/g GAE) and DCM fraction (62.51 ± 0.34 mg/g GAE). For the determination of flavonoids contents, the EA fraction exhibited the highest value (28.80 ± 0.09 mg/g quercetin) and DCM expressed the second highest value (26.21 ± 0.25 mg/g quercetin). The EA fraction also demonstrated the highest content of alkaloids (3.96 ± 0.32 mg/g fraction). On the other hand, BU showed the greatest amount of condensed tannins (14.10 ± 0.20 mg/g fraction), following by EA fraction (12.50 ± 0.48 mg/g fraction).

Table 1. CE and fractions contents of total phenols, flavonoids, tannins and alkaloids of *C. iguanaea* roots.

CE and fractions	Phenols ^a \pm S.E. (mg/g)	Flavonoids ^b \pm S.E. (mg/g)	Tannins ^c \pm S.E. (mg/g)	Alkaloids \pm S.E. (mg/g)
CE	89.37 ± 1.08 a	12.01 ± 0.64 a	6.40 ± 0.23 a	1.70 ± 0.12 a
DCM	62.51 ± 0.34 b	26.21 ± 0.25 b	9.60 ± 1.11 b	1.50 ± 0.56 a
EA	221.55 ± 0.28 c	28.80 ± 0.09 c	12.50 ± 0.48 c	3.96 ± 0.32 b
BU	152.90 ± 0.29 d	13.71 ± 0.72 d	14.10 ± 0.20 d	2.34 ± 0.78 a

Averages followed by different letters in each column differ by Tukey test at $p < 0.05$.

^a Phenols: expressed as gallic acid equivalents (GAE).

^b Flavonoids: expressed as quercetin (mg/g fraction).

^c Tannins: expressed as catechin (mg/g fraction).

The gallic acid was identified and quantified by HPLC/DAD in CE, EA and BU fractions of *C. iguanaea* roots. Results and chromatograms are shown in Figure 1. The EA fraction presented the highest amount of GA (30.34 ± 0.35 mg/g), followed by CE (18.95 ± 0.03 mg/g) and BU (11.33 ± 0.24 mg/g).

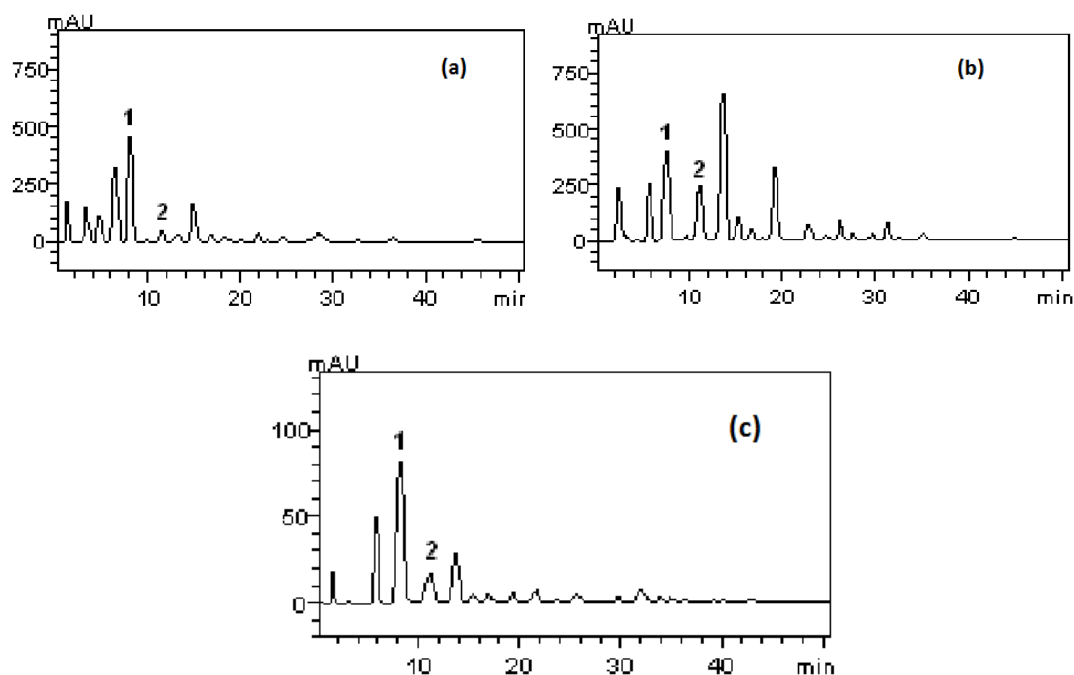


Figure 1 (a-c). HPLC/DAD of CE (a), EA (b) e BU (c) fractions of *C. iguanaea* roots. (1) gallic acid.

Antioxidant Screening

In this study, the antioxidant capacity against ROS species of *C. iguanaea* roots was accessed by five different assays: scavenging capacity on DPPH radicals, reducing power of iron, lipid peroxidation inhibition (TBARS assay), inhibition of protein oxidation (carbonyl content) and scavenging of ROS by DCFH-DA method.

The results of free radical scavenging properties of CE and fractions of the roots of *C. iguanaea* were showed in Figure 2 and Table 2. In DPPH assay, all extracts showed a radical scavenging activity in a dose-dependent manner and were significantly different ($p < 0.05$) (Table 2). The EA fraction shown the better antioxidant capacity with a $IC_{50} = 27.97 \pm 0.35$ $\mu\text{g/mL}$, while the AA presented a $IC_{50} = 15.98 \pm 0.28$ $\mu\text{g/mL}$.

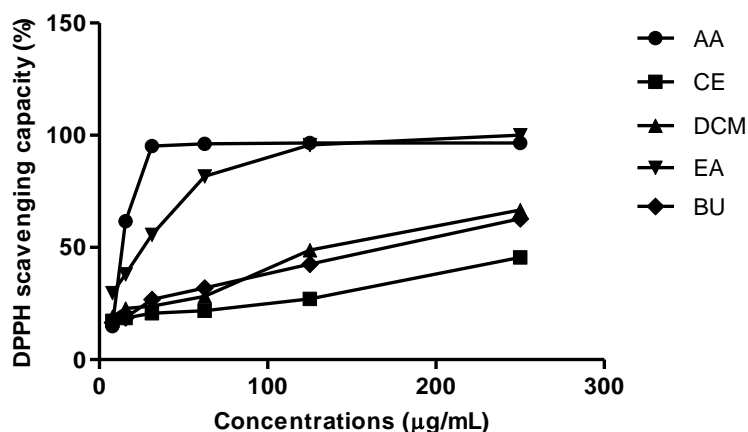


Figure 2. Scavenging capacity of AA, CE and fractions from roots of *C. iguanaea*.

The reductive capabilities of the *C. iguanaea* roots fractions and CE and quercetin are presented in Figure 3. The activities of the extracts were much lower than that of quercetin. However, the extracts differed in their capacity. For extract concentrations of 0.5 mg/mL the reducing power values varied from 0.132 (DCM) to 0.315 (EA). The EC_{50} values showed no significant difference between CE and EA and BU fractions.

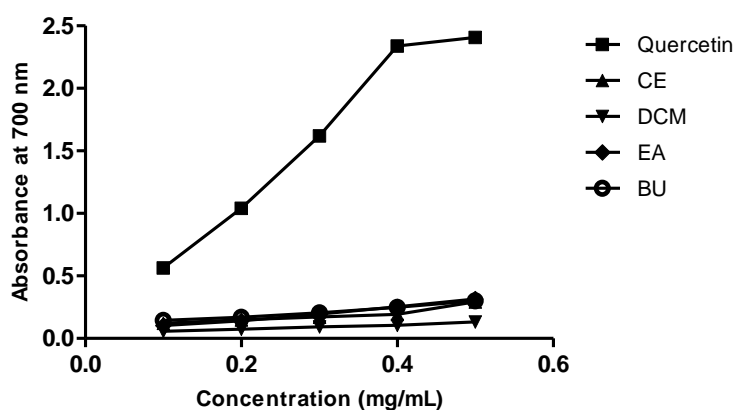
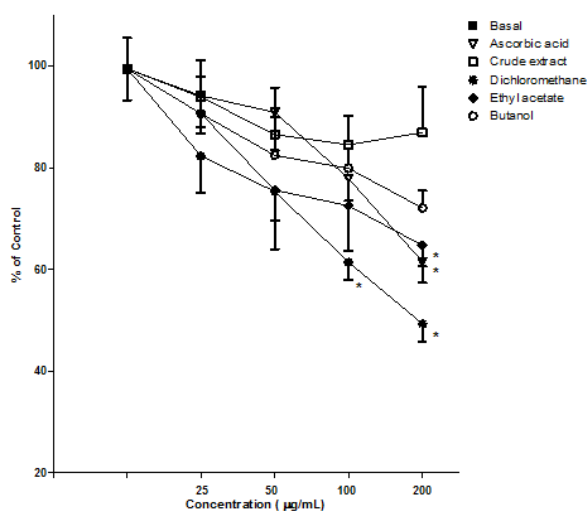


Figure 3. *C. iguanaea* roots extracts and quercetin reducing power values.

In the DCFH-DA method, the DCM fraction at a concentration of 100 and 200 µg/mL and EA fraction at 200 µg/mL were able to significantly reduce the oxidation of DCFH and, consequently, reduce the oxidative stress observed in rat brain cells when compared to the

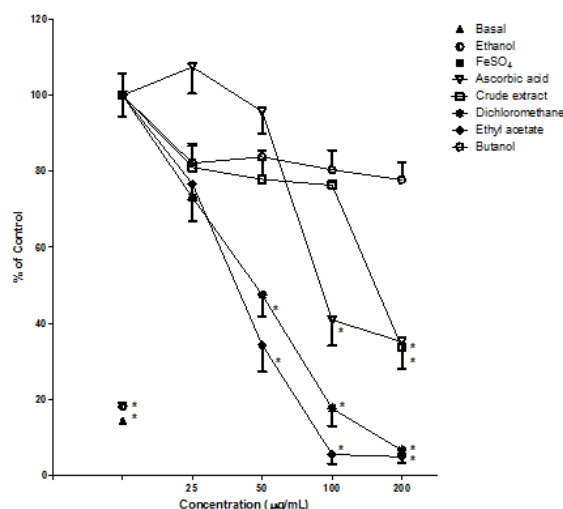
basal group, which demonstrates the pronounced antioxidant capacity of these fractions (Figure 4). Ascorbic acid reduced in a significant way the DCFH-DA oxidation at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$.



* significant difference from the basal group ($p < 0.05$)

Figure 4. Effect of *C. iguanaea* roots CE and fractions on scavenging of ROS in supernatant of rat brain homogenate by DCFH-DA method.

EA and DCM fractions and CE of *C. iguanaea* roots significantly inhibited iron-induced TBARS production in brain preparations (Figure 5). The inhibitory potency was in the following order: EA ($\text{IC}_{50} = 42.03 \pm 4.55 \mu\text{g/mL}$) > DCM ($\text{IC}_{50} = 55.66 \pm 3.74 \mu\text{g/mL}$) > CE ($\text{IC}_{50} = 158.52 \pm 3.36 \mu\text{g/mL}$) (Table 2). AA showed an IC_{50} value of $123.11 \pm 5.23 \mu\text{g/mL}$.



* significant difference ($p < 0.05$) from the induced control (FeSO_4), by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test ($n = 3$).

Figure 5. Effect of *C. iguanaea* roots CE and fractions on lipid peroxidation production in supernatant of rat brain homogenate.

Table 2. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) values of the DPPH and TBARS assay and EC_{50} (mg/mL) reducing power assay for CE and fractions of *C. iguanaea*.

Extract/ fraction	IC_{50} DPPH \pm S.E. ($\mu\text{g/mL}$)	EC_{50} Reducing power (mg/mL)	IC_{50} TBARS \pm S.E. ($\mu\text{g/mL}$)
CE	303.55 ± 0.40 a	1.10 ± 0.21 a	158.52 ± 3.36 a
DCM	172.89 ± 0.34 b	2.54 ± 0.45 b	55.66 ± 3.74 b
EA	27.97 ± 0.35 c	0.86 ± 0.13 a	42.03 ± 4.55 c
BU	157.40 ± 0.22 d	1.03 ± 0.33 a	#
AA	15.98 ± 0.28 e	-	123.11 ± 5.23 d
Quercetin	-	0.08 ± 0.02 c	-

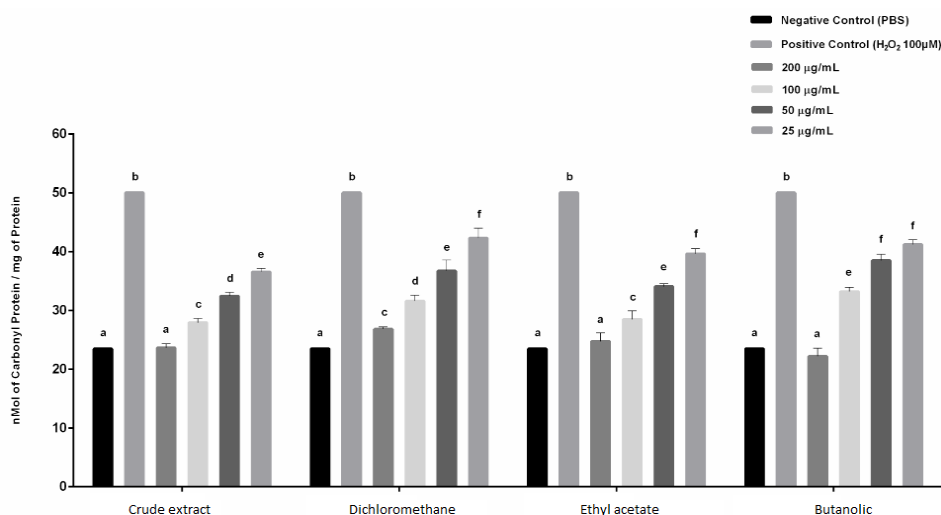
IC_{50} : concentration required to inhibit 50% of the activity. S.E.: standard error; averages followed by different letters in each column differ by Tukey test at $p < 0.05$. # fractions did not present IC_{50} values on the concentrations tested.

EC_{50} : extract concentration providing 0.5 of absorbance at 700 nm.

- Not tested.

The Carbonyl assay revealed a significant decrease in protein carbonyl content in plasma after incubation with the extracts at all concentrations (25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) when

compared to the positive control (H_2O_2) (Figure 6). The results demonstrated a dose-dependent effect once the higher doses are richer in phenolic compounds. All fractions at concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ but DCM fraction were able to completely inhibited the oxidative damage caused.



*Data are expressed as means \pm SD (n = 3). The letters a, b, c, d, e, f means significance difference ($p < 0.05$).

Figure 6. Effect of CE, DCM, EA and BU fractions of *C. iguanaea* roots on protein carbonyl groups production in plasma.

Antimicrobial activity

MIC (minimal inhibitory concentration) values of fractions and CE of *C. iguanaea* roots are shown in Table 3. Five bacteria and five fungus were tested. The extracts did not present antimicrobial activity at the used concentrations against the tested bacteria, presenting MICs > 1.00 mg/mL. The fungus *Sacharomyces cerevisiae* was the only susceptible microorganism with MIC values of 0.25 and 0.50 mg/mL to EA and DCM, respectively.

Table 3. Minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/mL) of CE and fractions of *C. iguanaea* roots.

Microorganisms	<i>C. iguanaea</i> roots (mg/mL)			
	CE	DCM	EA	BU
<i>Protheus mirabilis</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Escherichia coli</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Candida albicans</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Candida glabrata</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Candida parapsilosis</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	>1.00	0.50	0.25	>1.00
<i>Malassezia pachidermatis</i>	>1.00	>1.00	>1.00	>1.00

Discussion

Several studies have been revealed the presence of high concentrations of phenolics in plants extracts obtained using polar solvents. Schubert et al. (2007) working with *Ilex paraguariensis* leaves and fruits found total phenolics contents ranging from 199.91 to 86.82 mg/g, while in our study we found higher values to EA fraction. Using similar methodology, *Scutia buxifolia* stem bark showed a variation of the 323.47 to 141.09 mg/g; 145.72 to 100.37 mg/g; 176.70 to 66.67 mg/g and 3.07 to 0.28 mg/g for phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents, respectively (Boligon et al. 2012a).

The presence of gallic acid is known to have many biological activities, such as anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate (Kaur et al. 2009). A recent study showed that oral administration of GA has profound neuroprotective effects, which are possibly associated with the significant antioxidant capacity (Mansouri et al. 2013).

Oxidative stress in biological systems is caused by an imbalance between the generation of ROS and the antioxidant defense capacity of the organism, affects major cellular components, including lipids, proteins and DNA. The continuous decrease in antioxidant defenses and/or the over-production of ROS may contribute to the development of several health diseases (Valko et al. 2007). DPPH free radical is widely used to determine the radical-scavenging capacity of natural compounds that act as radical scavengers or hydrogen donors *in vitro*. The highest antioxidant capacity was obtained from the EA fraction with the lowest IC₅₀ value of $27.97 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$. This same fraction also exhibited the highest values of polyphenols and flavonoids, showing a positive relation between these compounds and antioxidant activity against DPPH. Relation between phenolic content and DPPH radical-scavenging activity was found in several studies (Orhan et al. 2009; Janovik et al. 2011; Brum et al. 2013). However, some authors have suggested that is not always possible a positive relation between total phenolics and antioxidant capacity (Kahkonen et al. 1999; Yu et al. 2002). In fact, the DCM fraction, which had the lowest content of polyphenols among the fractions, showed higher antioxidant capacity than CE, presenting a lower IC₅₀. It can be explained by several factors, including the presence of different active compounds that can modify the antioxidant capacity, the synergistic effects, the experimental conditions, and the mechanisms of the methods used for the antioxidant reactions (Jayaprakasha and Patil 2007). Some compounds also react strongly with the DPPH, while others have a slower reaction rate (Tsimogiannis, 2006).

The reducing power of an extract may serve as a significant indicator of its antioxidant capacity (MEIR ET AL., 1995). The presence of antioxidants (reducers) causes de reduction of Fe³⁺/ferricyanide complex to the ferrous form (Fe²⁺) changing the color of the tests solution from yellow to green depending on the reducing power of the test specimen, monitored at 700nm. In general, extracts with high total phenols content presented lower EC₅₀ values in

reducing power assay and in the order EA > BU > CE > DCM (Table 2). Other studies have also demonstrated that the reducing power of natural extracts is related to the quantity of phenolic compounds (Kosalec et al. 2013; Perez et al. 2011). This is due the capability of natural phenols present in the extracts donors an electron and stops the radical chain reaction (Liu et al. 2011).

The fluorogenic compound DCFH-DA has been utilized extensively as a marker for oxidative stress in cells (Meir et al. 1995; Perez et al. 2011; Liu et al. 2011; Zadra et al. 2012; Kosalec et al. 2013). When the diacetate form of DCFH enters the cell, it is hydrolyzed by intracellular esterases to liberate DCFH, which is oxidized by ROS, particularly H₂O₂ and hydroxyl radical, forming the highly fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (Wang and Joseph 1999; Rota et al. 1999). Therefore, when there is an increase in DCF fluorescence, it is suggestive of H₂O₂ and hydroxyl radical generation. The principle of this method is evaluated the capacity of antioxidants molecules in the roots extracts to scavenge ROS and then inhibit the oxidation of DCFH. The DCM and EA fractions were able to significantly reduce the oxidation of DCFH to DCF. This results found confirm that *C. Iguanaea* roots could exert a substantial effect against intracellular ROS formation.

Present research suggested that strongest inhibition in the lipid peroxidation of EA fraction is due to the cumulative contribution of its phenolics compounds and flavonoids contents that play important contribution in antioxidant capacity. Lipid peroxidation is an oxidative deterioration process of polyunsaturated fatty acids damaged by ROS. MDA, one of the secondary products of lipid peroxidation, is widely used as biomarkers. Several human diseases, including Alzheimer's disease, diabetes, some malignancies, and other have been related to high levels of protein carbonyl groups (Dalle-Donne et al. 2003). The action of reactive oxygen species on proteins increase the formation of carbonyl groups, thus the levels of these groups in circulating proteins is considered a useful marker of oxidative stress. It is

suggested that the inhibited capacity in protein oxidation of the extracts demonstrated in our study could prevent many diseases related to the accumulation of this compound, since all the extracts tested were able to reduce the protein carbonyl content in plasma.

Conclusions

The antioxidant screening of the *C. iguanaea* roots and some phytochemical characteristics of the species were showed in our study. Analyzing the results of all antioxidants methods, the EA fraction demonstrated the better activity, which can be due to high amount of polyphenols compounds and flavonoids. HPLC/DAD analysis revealed the presence of gallic acid in all fractions except for DCM fraction. This phenol is well known for its ability to scavenge ROS and may be involved to the antioxidant activity found in the roots. All results are showed for the first time in the roots of *C. iguanaea*.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank D. Fischer (Jaboticaba, Brazil) for plant collection, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/Brazil for the financial support.

References

- Boligon, A.A., Brum, T.F., Frohlich, J.K., Froeder, A.L.F. and Athayde, M.L. (2012). HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Research Journal of Phytochemistry* 6, 84–91.

- Boligon, A.A., Janovick, V., Boligon, A.A. and Athayde, M.L. (2012a). HPLC analysis of polyphenolics compounds and antioxidant activity in *Nasturtium officinale*. *International Journal of Food Properties* 16:61- 69.
- Boligon, A.A., Kubiça, T.F., Mario, D.M., Brum, T.F., Piana, M., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S.H., Santos, R.C.V., Alves, C.F.S. and Athayde, M.L. (2013). Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:2229–2239.
- Brum, T.F., Zadra, M., Piana, M., Boligon, A.A., Fröhlich, J.,K., Freitas, R.B., Stefanello, S.T., Froeder, A.L.F., Belke, B.V., Nunes, L.T., Jesus, R.S., Machado, M.M., Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A. and Athayde, M.L. (2013). HPLC Analysis of phenolics compounds and antioxidante capacity of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Molecules* 18, 8342-8357.
- Cai, Y., Luo, Q.; Sun, M. and Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science* 74, 2157–2184.
- Chandra, S. and Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparision to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 52, p. 3583-3589.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H. and Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161–1168.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Eighth edition. *CLSI document M07-A8*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – Third edition. *CLSI document M27-A3*.
- Dalle-Done, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. And Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23–38.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654–660.
- Evaristo, I.M. and Leitão, M.C. (2001). Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana* 9, 135–141.
- Janovik, V., Boligon, A.A., Bandeira, R.V. and Athayde, M.L. (2011). HPLC/DAD analysis, determination of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity from the leaves of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Research Journal of Phytochemistry* 5, 209–215.
- Jayaprakasha, G.K. and Patil, B.S. (2007). *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry* 101, 410–418.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. and Donoghue, M.J. (2009). *Sistemática vegetal, um enfoque filogenético*. Artmed, Porto Alegre. 632p.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3954–3962.

- Kaur, M.B., Velmurugan, S., Rajamanickam, R. And Agarwal, C. (2009). Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharmaceutical Research* 26:2133-2140.
- Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randic, M. and Zovko Koncic, M. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry* 136, 335–341.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, Anke, G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Standtman, E. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464–478.
- Liang, C.H., Chan, L.P., Ding, H.Y., So, E.C., Lin, R.J., Wang, H.M., Chen, Y.G. and Chou, T.H. (2012). Free radical scavenging activity of 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O- β -D-glucopyranoside from *Origanum vulgare* and its protection against oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 7690–7696.
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S. and Liu, J. (2011). The antioxidant and freeradical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry* 126, 261269.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Mayne, S.T. (2003) Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 133, 933–940.

- Mansouri, M.T., Farbood, Y., Sameri, M.J., Sarkaki, A., Naghizadeha, B. and Rafeiradd, M. (2013). Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chemistry*. 138, 1028–1033.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. and Philosoph-Hadas, S. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Food Chemistry* 43, 1813–1819.
- Morabito, F., Cristani, M., Saija, A., Stelitano, C., Callea, V., Tomaino, A., Minciullo, P.L. and Gangemi, S. (2004). Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators of Inflammation* 13, 381–383.
- Moreira, E.A. (1979). Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. *Companulaceae*. *Tribuna Farmacêutica* 47 (1): 13-39.
- Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T. and Powell, A.A. (1995). Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. *Annals of Botany* 76, 287–290.
- Myrhe, O., Andersen, J.M., Aarnes, H. and Fonnum, F. (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology* 65, 1575–1582.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- Oliveira, F.A., Frazzon, A.P.G., Brandelli, A., Tondo, E.C. (2007). Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella enteridis* involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries* 1:170–176.
- Orhan, I., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Kartal, M., Sekeroglu, N. and Deveci, M. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*,

Thymus praecox subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*.

Food and Chemical Toxicology 47, 1304–1310.

Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 35, 771±775.

Perez, M.B., Banek, S.A. and Croci, C.A. (2011). Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian sage and oregano. Food Chemistry 126, 121–126.

Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E. and Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1190–1195.

Rota, C., Chignell, C.F. and Mason, R.P. (1999). Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescin to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. Free Radical Biology and Medicine 27, 873–881.

Schubert, A., Pereira, D.F., Zanin, F.F., Alves, S.H., Beck, R.C.R. and Athayde, M.L. (2007). Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Pharmazie 62, 876–880.

Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. and Pereira, J.A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. Bioorganic Medicinal Chemistry 14, 8533–8538.

Souza, F.B., Martins, J.L.R., Florentino, I.F., Couto, R.O., Nascimento, M.V.M., Galdino, P., Ghedini, P.C., Paula, J.R. and Costa, E. A. (2013). Preliminary studies of

gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves (Ulmaceae). *Natural Product Research*. v. 27, 1102-1107.

Sreevidya, N. and Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International* 86, 1124–1127.

Tene, V., Malagón, O., Finzi, P.V., Vidari, G., Armijos, C. And Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 111, 63-81.

Trevisan, R.R., Lima C.P., Miyazaki, C.M.S., Pesci, F.A., Silva, C. B., Hirota, B.C.K., Lordello, A.L. L., Miguel, O.G., Miguel, M.D. and Zanin, S.M.W. (2012). Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* v. 14, n. 3, 494-9.

Tsimogiannis, D.I. and Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40-hydroxy substituted members. *Food Science Emerging Technology* 7, 140–146.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Milan Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44–84.

Wang, H. And Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 612–616.

Woisky, R.G. and Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37, 99–105.

- Yang, J., Martinson, T.E. and Liu, R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry* 116, 332–339.
- Yen, G.C., Duh, P.D. and Chuang, D.Y. (2000). Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry* 70, 437441.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J and Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1619–1624.
- Zadra, M., Piana, M., Brum, T.F., Boligon, A.A., Freitas, R.B., Machado, M.M., Stefanello, S.T., Soares, F.A.A. and Athayde, A.L. (2012). Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. S St.-Hil. *Molecules*, 17, 12560–12574.

MANUSCRITO 2

Biochemical and hematological parameters of *Wistar* rats submitted to acute and subacute administration of the crude extract of *Celtis iguanaea* leaves (Jacq.) Sargent

Amanda Luana Forbrig Froeder, Andreia Regina Haas da Silva, Kassia Figueredo, Julie Matie Noda, Robson Borba de Freitas, Manuela Sangoi Cardoso, Lauren Pappis, Letícia Teixeira Nunes, Thomaz Adolfo, Rafael Moresco, Margareth Linde Athayde

Biochemical and hematological parameters of *Wistar* rats submitted to acute and subacute administration of the crude extract from *Celtis iguanaea* leaves (Jacq.) Sarg

Amanda Luana Forbrig Froeder¹, Andreia Regina Haas da Silva¹, Kassia Figueredo¹, Julie Matie Noda¹, Robson Borba de Freitas¹, Manuela Sangoi Cardoso², Lauren Pappis¹, Letícia Teixeira Nunes¹, Thomaz Adolfo¹, Rafael Moresco², Margareth Linde Athayde^{1,*}

¹Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

²Post-Graduate Program in Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Correspondence to: Amanda Luana Forbrig Froeder, Department of Industrial Pharmacy of Federal University of Santa Maria, Campus Camobi, prédio 26, sala 1115. Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil. [telephone number +55 55 3220 9618; fax: +55 55 3220 8248; e-mail: amandafroeder@hotmail.com].

ABSTRACT

Celtis iguanaea is a native tree of Southern Brazil, which is popularly known as “esporão-de-galo” and the leaves they are used traditionally in infusion forms as analgesic, antiasthmatic, digestive and diuretic. The aim of this study was to assess the acute and sub-acute toxicity of the crude extract from the leaves *Celtis iguanaea* in male rats. The toxicity studies were based on the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD-guidelines 423 and 407). In an acute study, a single dose of 2000 mg/kg of *C. iguanaea* was administered orally. While in the sub-acute study, the extract was administered orally to male rats at doses of 100, 200 and 400 mg/kg/day for 28 days. Behavioral changes and biochemical, hematological, and histological analysis were evaluated. The acute administration of *C. iguanaea* did not cause changes in behavior or mortality. The animals presented decreased levels of platelets, alanine aminotransferase (ALAT) and lymphocytes, and neutrophils increase. On the other hand, in a sub-acute toxicity study, we observed an increase of glucose, suggesting a toxic effect on the pancreas. The activity of δ -ALA-D liver had significant increases, while the aspartate aminotransferase (ASAT) enzyme decreases, indicating a possible protective effect on the liver, which was corroborated by histological analysis. *Celtis iguanaea*, after acute administration, may be classified as safe (category 5), according to the OECD guide. However, the alterations observed after sub-acute administration with high doses of crude extract from the leaves, suggest that repeated administration can cause adverse effect on the pancreas, but protective effect on the liver.

Keywords: toxicity, esporão-de-galo, Cannabaceae, crude extract.

INTRODUCTION

The use of natural resources is a historical practice, through all the obstacles of the evolutionary process until today, reaching the entire world population (CASTRO, 1981). The World Health Organization (WHO) recognizes the importance of the traditional use of medicinal plants, but emphasizes that the employment of a plant for therapeutic purposes is essential to establish its safety, efficacy and quality assurance of preparations and such procedures are important relevance in scientific research (RATES, 2001).

The popular use, and even the traditional, is not sufficient to validate herbal ethically as effective and safe drugs. Thus, medicinal plants are no different than any other synthetic xenobiotics and their use should be based on supporting experimental evidence of the risks they are exposed those who use (VEIGA, 2005).

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent (family Cannabaceae), popularly known as “esporão-de-galo” (SILVA, PROENÇA, 2008), popular usage reports suggest the form of infusion (tea) or decoction of the leaves for the treatment of joint pain, asthma, cramps, poor digestion and as a diuretic (SILVA, PROENÇA, 2008; SOUZA et al., 2013). This medicinal plant is also widely used in the treatment of gastric ulcers (SOUZA et al., 2013). The phytochemical screening of the leaves and stem of *Celtis iguanaea* showed the presence of flavonoids, coumarins and mucilage (PAULA et al., 2010). Souza et al. (2013) showed gastroprotetive effect of the hexane fraction obtained from the partitioning of *Celtis iguanaea* ethanol leaves extract. Preliminary data founded by Martins et al. (2014) showed antiulcerogenic and secretory efficacy of hexane leaf extract suggesting anticholinergic and antihistaminergic mechanism or interruption of intracellular events that are linked to acid secretion. Martins et al. (2014a) demonstrated that the *C. Iguanaea* hexane extract exhibits gastroprotective activity in different gastric ulcer models. The mechanism of this effect suggests the participation of mucus as well as the involvement of α_2 -adrenergic receptors, NO and prostaglandins. The hydroxyl-linolenic acid, linoleic acids and conjugated oxo-linoleic acid are among the phytoconstituents that the authors were identified in the hexane extract.

As described above, the *C. iguanaea* leaves may presents pharmacological properties. However, toxicological studies are important to offer a standardized composition and security for the use by the population. In this way, no study about the toxic effects of the extract from the leaves *C. iguanaea* has been reported. Thus, the aim of this study was to investigate the

acute and subacute toxicity of the crude extract of the leaves *C. iguanaea* (Jacq.) Sarg in mice through hematological, biochemical and histopathological.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

The leaves of *Celtis iguanaea* were collected in Jaboticaba (Rio Grande do Sul, State of Brazil) (coordinates 27°37'48''S, 53°16'55''W) in March of 2013. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 12.952.

2.2 Extract preparation

The leaves of the plant were dried in a stove at controlled temperature (40°C) and powdered in a knife mill. The powder of the leaves was subjected to maceration with 70% ethanol at room temperature for seven days, with daily agitation. The solvent was renewed until the total extraction of the compounds. The material was filtered and concentrated under reduced pressure, in order to remove the ethanol. The aqueous extract was evaporated to dryness to provide the crude extract of the leaves (CEL).

2.3 Chemical, apparatus and general procedures

All chemicals were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, ellagic acid, chlorogenic acid and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The quercetin and rutin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance

liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and the LC solution 1.22 SP1 software.

2.4. Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions by using C18 column (4.6mm_250mm) packed with 5 μ m diameter particles. The mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was 5% of B until 2 min, 25% (B) until 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% (B) every 10 min; following the method described by Oboh et al. (2014), with minor modifications. The CEL was analyzed in a dissolved way with the mobile phase at a concentration of 15 mg/ml. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and, then, degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standard references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.025–0.300 mg/ml. The flow rate was 0.7 ml/min, injection volume 50 μ L and the wave length was 270 nm for gallic acid and elagic acid, 325 nm for chlorogenic acid and 366 nm for quercetin and rutin. The chromatography peaks were confirmed by comparing the retention time with those ones with reference standards and by DAD spectra (200–600nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 12574x + 1195.6$ ($r = 0.9998$); chlorogenic acid: $Y = 13472x + 1308.5$ ($r = 0.9997$); elagic acid $Y = 11834x + 1359.2$ ($r = 0.9999$), rutin: $Y = 13149x + 1273.8$ ($r = 0.9996$) and quercetin: $Y = 12409x + 1265.7$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, being σ the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve (BOLIGON et al., 2013).

2.5 Animals

Adult male Wistar rats (160-200g) were obtained from Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and they were arbitrarily distributed in to different experimental groups. The animals were housed in polypropylene cages at an ambient temperature of $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 45–55% relative humidity, with a 12:12h light/dark cycle and they were also adapted to local conditions for at least 72h before the experiment. Animals were provided with commercial food pellets and water *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA UFSM; Protocolo 103/2013).

2.6 Acute toxicity study

Acute oral toxicity of *C. iguanaea* was evaluated in *Wistar* male mice as preconized by the OECD Guideline (Organization for Economic Cooperation and Development, 2001) with some modifications. The experimental procedures were performed twice using three male *Wistar* rats per group at each step. The control group received distilled water (1 ml/kg) and the test group a single dose of 2000 mg/kg of CEL dissolved in water. Both treatments were made by gavage and the dose of 2000 mg/kg corresponds to the maximum dose recommended by the protocol adopted. The animals were observed 6 and 12 hours after administration and every day for 14 days. The weight of the animals and food intake were monitored, as well as cases of death, occurrence of tremors, convulsions, changes in skin and fur, somatomotor activity and behavior. On the 15th day, after a short period of fasting, the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture. The liver and the kidney of each animal was removed, homogenized in 50 mM Tris- HCl, pH 7.4, centrifuged and the supernatant used to measure the activity aminolevulinate dehydratase enzymes (δ -ALA-D), catalase (CAT) and thiobarbituric acid (TBARS). The blood was collected from the cardiac puncture in two tubes: one with the anticoagulant ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and the other without any additive.

2.7 Subacute toxicity study

The subacute toxicity study was developed following the guidelines of OECD 407 (1995) with minor modifications. CEL was dissolved in water and administered by gavage, each morning for 28 days. The animals were divided in four groups totaling 20 animals used in the experiment (n=5) as the following groups:

Group I: control group treated with water;

Group II: treated with CEL 100 mg/kg;

Group III: treated with CEL 200 mg/kg;

Group IV: treated with CEL 400mg/kg.

The body weight of the animals was made by daily monitoring throughout the study period. On day 29 of the study, all the animals were subjected to a short fasting period. After this period, blood was collected in two tubes: one with anticoagulant EDTA and the other without anticoagulant, through cardiac puncture from the left ventricle of the heart in a anesthetized animals. After wards, the rats were euthanized and the kidney and liver were removed, dissected, and fixed in a10% formalin solution. The liver and the kidney of each animal was removed, homogenized in 50 mM Tris- HCl, pH 7.4, centrifuged and the supernatant used to measure δ -ALA-D, CAT and TBARS.

2.8 Aminolevulinate dehydratase enzyme activity (δ -ALA- D)

The activity of δ -ALA-D renal and hepatic enzyme was measured using the method of Sassa (1982) with minor modifications. This method quantifies the rate of formation of the product porphobilinogen (PBG) in a 100 mM phosphate buffer, pH 6.8 and 2.4 mM aminolevulinic acid (ALA) as described by Barbosa et al., 1998. Incubations were performed using liver tissue and kidney at a temperature of 37 °C, 60 minutes. The reaction product was determined using Ehrlich's reagent (molar absorption coefficient of 6.1×10^4 / M to the salt Ehrlich - porphobilinogen) an absorbance of 555 nm.

2.9 Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

Lipid peroxidation (LPO) in the liver and kidney tissue was measured by TBARS method, which consists of a colorimetric reaction LPO product, malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA). This reaction produces a colored compound that absorbs at 532 nm at maximum (BUEGE; AUST, 1987).

2.10 Enzyme catalase activity (CAT)

The activity of catalase (CAT) kidney and liver was determined by the decay of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 32 °C. This method is based on the consumption of H_2O_2 by CAT enzyme to an absorbance of 240 nm (AEBI, 1995).

2.11 Biochemical and hematological parameters

The blood without the anticoagulant was allowed to clot before centrifugation (4000 rpm for 10min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of glucose (GLU), aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT) activities, total cholesterol (CHOL), blood urea nitrogen (URE), blood creatinine (CRE) and total blood protein (PRO) levels analyzed by use of standard methods on Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. The anticoagulated blood was analyzed immediately for hematological parameters: leukocytes (WBC), erythrocytes (RBC), hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cells distribution width (RDW) and platelet (PLT) counts were determined with the use of an automatic counter veterinary Mindray BC 2800. Lymphocyte, neutrophils,, monocytes, eosinoplis, and basophils were analyzed only for the study of subacute toxicity with the use of an automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

2.12 Histopathology of subacute toxicity

We analyzed 19 samples from liver and 18 samples from kidney, fixed in 10% buffered formalin. The samples underwent standard histological processing, embedded in paraffin, sectioned at 8 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin. In liver analysis were photomicrographed 4 random fields/blade in 4 histological slides per sample. Nuclear area and nuclear density of hepatocytes and densities of kupfer cells were analyzed. The analyzes were made in the software Image Pro Plus 4®, we used a grid of 200 μ m², dividing this grid in 12 subfields of equal size, with subsequent analysis by standardized sampling four subfields. In renal analysis were photomicrographed 5 random fields/blade in the area of the renal cortex, 5 blades per sample. In each histological blade, analyzed 10 randomly renal glomeruli. The variables measured were glomerular area and nephron area. The subcapsular area was estimated by subtracting the area of the glomerulus by the nephron area. Renal analysis is also performed by the software Image Pro Plus 4®.

2.13 Statistical analysis

The data are expressed as means \pm S.D. All the results were analyzed by oneway ANOVA, and Tukey test were used in order to compare any significant differences between the control group and the treated group. The differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$. The chromatographic analyzes were performed using the software R version 3.1.1 (R Core Team, 2014).

3 RESULTS

3.1 HPLC analysis

HPLC profile of CEL of *C. iguanaea* revealed the presence of the phenolics acids: gallic acid ($t_R = 9.75$ min; peak 1), chlorogenic acid ($t_R = 19.43$ min; peak 2) and ellagic acid ($t_R = 24.17$ min; peak 3), and the flavonoids: rutin ($t_R = 28.01$ min; peak 4) and quercetin ($t_R = 32.89$ min; peak 5) (Figure 1 and Table 1).

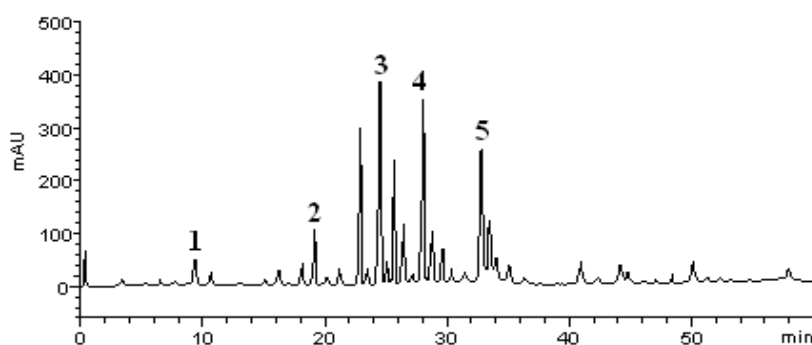


Figure 1. Representative high performance liquid chromatography profile of CEL of *C. iguanaea*, detection UV was at 327 nm. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), ellagic acid (peak 3), rutin (peak 4) and quercetin (peak 5).

3.2 Acute toxicity study

The dose of 2000 mg/kg of CEL did not cause any mortality or clinical signs of acute toxicity in male Wistar rats observed for a short time (48 h) and a longer period of time (14 days). Regarding hematological findings in particular of blood red cells (Table 2), the mean values of erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit values, as well as the RBC indices (MCV, MCH and MCHC) behaved within the normal range established in animals treated with the plant. However, platelets treated animals had a significant decrease when compared to the control. The average values of white serie there was a significant difference in some

variables studied correlated with the control group. Animals that received 2000 mg/kg of CEL showed a decrease of lymphocytes, and increase of neutrophils (Table 3).

Table 1. Composition of *C. iguanaea* CEL.

Compounds	<i>Celtis iguanaea</i>		<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
	(mg/g)	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)
Gallic acid	2.71 ± 0.03 a	0.27	0.021	0.069
Chlorogenic acid	5.03 ± 0.01 b	0.50	0.007	0.023
Ellagic acid	17.68 ± 0.01 c	1.76	0.013	0.042
Rutin	15.94 ± 0.02 d	1.59	0.019	0.061
Quercetin	10.83 ± 0.03 e	1.08	0.011	0.037

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

Table 2. Analysis of the effect of administration of 2000 mg/kg of CEL in erythrocyte parameters and levels of male Wistar rats platelets.

Hematological parameters	Study group	
	Control	2000 mg/kg
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.26 ± 0.20	8.66 ± 0.37
HBG (g/dL)	16.43 ± 0.51	16.20 ± 0.37
HCT (%)	47.56 ± 2.30	47.74 ± 1.87
VCM (fL)	57.63 ± 2.97	55.16 ± 2.30
HCM (pg)	19.83 ± 0.72	18.66 ± 0.82
CHCM (g/dL)	34.50 ± 0.55	33.92 ± 0.68
RDW (%)	15.43 ± 0.32	15.82 ± 0.20
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1115.33 ± 22.23	1021.00 ± 42.71*

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate. Red Blood Cells counts (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Mean Cell Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Red cells Distribution Width (RDW) and Platelet (PLT). Differences between groups were considered to be significant when $p > 0.05$. $n = 3$

*Different from the control group.

Table 3. Effects of the acute administration of *C. iguanaea* on white cells and differential leukocytes counts in rats.

Hematological parameters	Study group	
	Control	2000 mg/kg
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.46 \pm 2.89	10.14 \pm 1.83
Lymphocytes (%)	76.33 \pm 2.30	65.20 \pm 5.67 *
Neutrophils (%)	19.00 \pm 4.00	31.40 \pm 4.03 *
Monocytes (%)	3.33 \pm 1.52	2.80 \pm 2.17
Eosinophils (%)	1.33 \pm 1.52	0.60 \pm 0.89

Data are expressed as mean \pm S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n=3). Leukocytes (WBC). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

*Different from the control group.

Table 4 – Effects of acute administration of CEL on biochemical parameters in rats.

Biochemical parameters	Study group	
	Control	2000 mg/kg
GLU (mg/dL)	234.03 \pm 37.61	246.88 \pm 29.89
CHOL (mg/dL)	101.80 \pm 10.89	90.28 \pm 11.10
URE (mg/dL)	30.62 \pm 0.49	37.83 \pm 3.31 *
CRE (mg/dL)	0.42 \pm 0.07	0.46 \pm 0.03
ASAT (U/L)	123.40 \pm 23.57	109.40 \pm 22.13
ALAT (U/L)	80.33 \pm 2.08	62.20 \pm 9.49 *
PROT (g/dL)	5.32 \pm 0.98	5.68 \pm 1.10

Data are expressed as mean \pm S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n=3). Blood sugar levels (GLU), total cholesterol (CHOL), blood urea nitrogen (URE), blood creatinine (CRE), aspartate amino transferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT) and blood protein (PROT). Differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$. (*) Different from the control.

Analyzing the biochemical serum parameters (Table 4), there was a significant difference from urea and ALAT when compared to the control group. While the urea treated group had a significant increase, ALAT in the treated group decreased significantly. The other parameters did not have change the normal range.

3.2.1 Activity of δ -ALA-D renal and hepatic enzyme

There was no significant difference in the activity of δ -ALA-D enzyme in the liver and the kidney (Figure 2) of the animals treated with the LCE when compared to the control group.

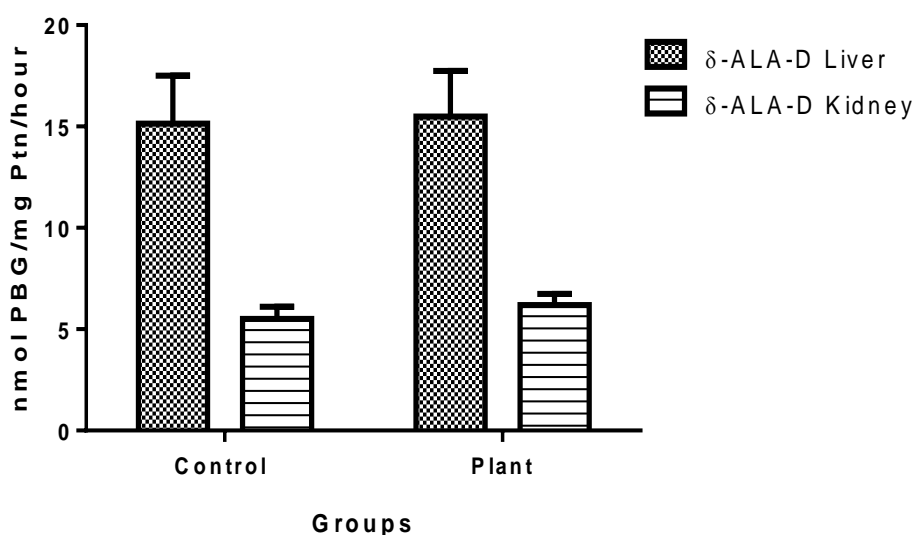


Figure 2. Activity of δ -ALA-D renal and hepatic enzyme in male Wistar rats treated (2000 mg/kg *C. Iguanaea* extract) and control (distilled water). The results were expressed as mean \pm standard deviation.

3.2.2 Renal and hepatic lipid peroxidation

Analyzing the lipid peroxidation in renal and hepatic tissues of the group treated with CEL evidenced no significant difference when compared with the control group (Figure 3).

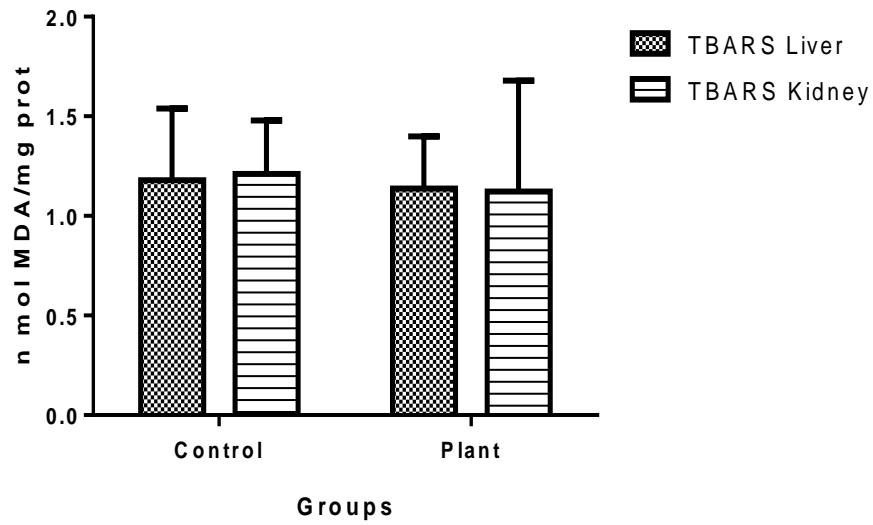


Figure 3. Quantification of lipid peroxidation liver and kidney tissue of Wistar rats treated (2000 mg/kg *Celtis iguanaea* extract) and control (distilled water) by the TBARS method. The results were expressed as mean \pm standard deviation.

3.2.3 Renal and hepatic catalase enzyme

Observed no significant difference in renal and hepatic CAT activity in the group treated with CEL when compared to the control group.

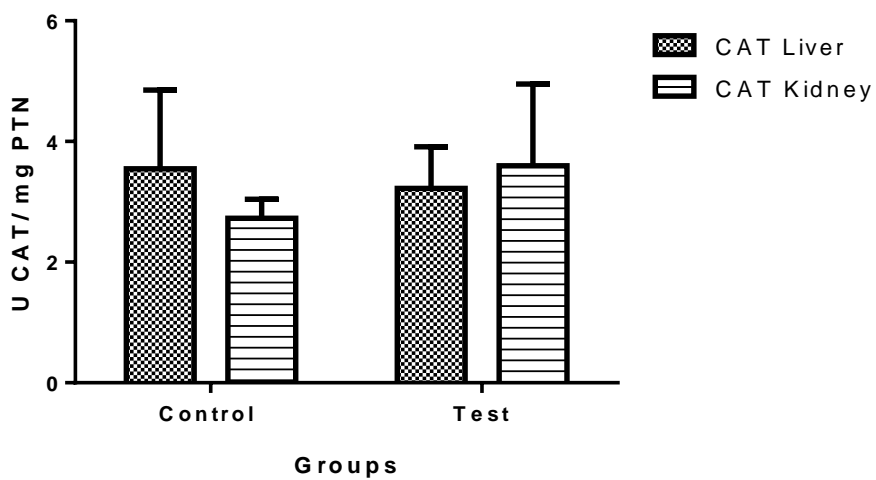


Figure 4. Activity of renal and hepatic CAT enzyme in male Wistar rats treated and control. The results were expressed as mean \pm standard deviation.

3.3 Sub-acute toxicity study

In Figure 5, it was found that the variation in weight between the groups was similar, suggesting that *C. Iguanaea* no significant effect on weight gain or loss of the treated animals, possibly indicating that the plant does not affect the appetite.

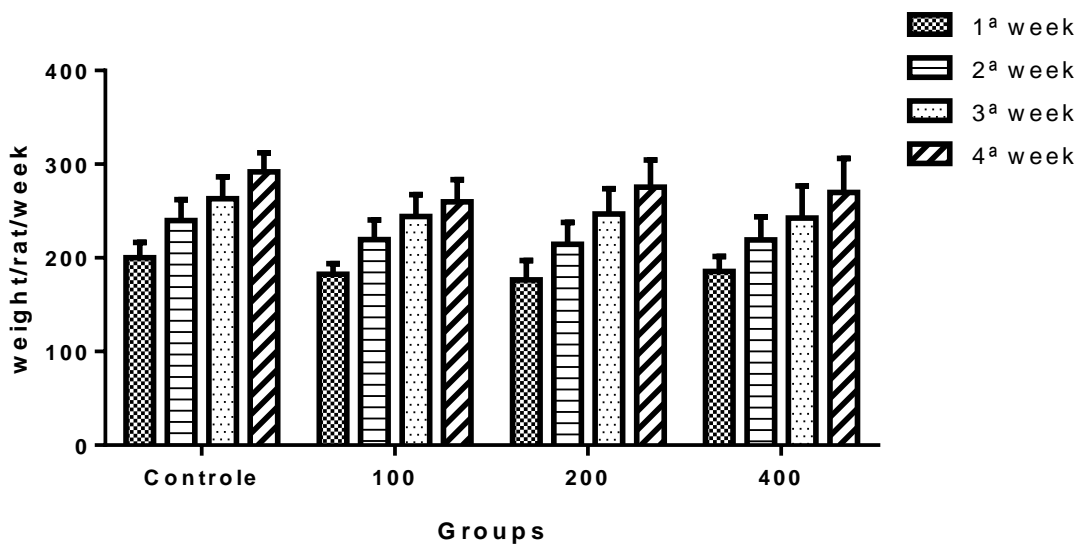


Figure 5. Weight evaluation of Wistar rats during subacute treatment with CEL. Data are expressed as mean \pm standard deviation.

In relation to the biochemical parameters described in Table 5, there is the increase of glucose in the groups treated with the dose of 200 and 400 mg/kg and increase cholesterol in the group treated at a dose 400 mg/kg. In contrast, there was a decrease of ASAT in the group treated with the highest dose of the plant. The other parameters evaluated as urea, creatinine and ALAT showed no changes in their levels compared different doses of *C. iguanaea* with the control group.

With regard to hematological findings in particular the red series (Table 6), the averages of erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit values as well as the erythrocyte indices (VCM, HCM and CHCM) and platelets, behaved within the established normal ranges in relation to the control. In relation to the average values oh white series, the variables are within normal limits, when correlated with the control group (Table 7).

Table 5. Effects of sub-acute administration of CEL for 28 days on biochemical parameters in rats.

Biochemical parameters	Study groups			
	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
GLU (mg/dL)	171.72 ± 8.34	175.00 ± 10.53	202.80 ± 9.31*	196.80 ± 4.76*
CHOL(mg/dL)	91.57 ± 5.28	84.33 ± 6.95	95.00 ± 8.98	102.71 ± 4.03*
URE (mg/dL)	49.01 ± 8.24	45.18 ± 8.93	38.24 ± 3.90	45.10 ± 4.74
CRE (mg/dL)	0.65 ± 0.10	0.70 ± 0.14	0.63 ± 0.18	0.80 ± 0.18
ASAT (U/L)	120.66 ± 8.33	107.80 ± 8.13	113.42 ± 3.73	107.71 ± 4.11*
ALAT (U/L)	49.11 ± 6.90	44.66 ± 4.90	48.00 ± 5.93	52.50 ± 6.69
PROT (g/dL)	6.07 ± 1.76	5.72 ± 0.36	5.34 ± 0.80	5.77 ± 0.21

Data are expressed as mean ± S. D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n=5). Blood sugar levels, total cholesterol (CHOL), blood urea nitrogen (URE), blood creatinine (CRE), aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotranferase (ALAT) and blood protein (PROT). Differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$. (*) Different from the control.

Table 6. Effects of the sub-acute administration of CEL for 28 days on erythrocytic parameters and platelets in rats.

Hematological parameters	Study groups			
	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
RBC ($\times 10^6$ /uL)	8.48 ± 0.28	7.71 ± 0.20	7.87 ± 0.33	8.12 ± 0.40
HBG (g/dL)	17.00 ± 0.62	16.00 ± 0.44	15.83 ± 0.15	16.30 ± 0.57
HCT (%)	46.53 ± 2.65	43.00 ± 0.62	43.16 ± 0.64	44.17 ± 1.83
MCV (fL)	54.87 ± 1.30	55.90 ± 1.64	54.96 ± 2.23	54.55 ± 1.09
MCH (pg)	15.71 ± 1.28	16.05 ± 0.75	14.98 ± 1.02	15.37 ± 1.35
MCHC (g/dL)	36.53 ± 1.75	37.20 ± 0.37	36.60 ± 0.65	36.77 ± 0.69
RDW (%)	14.56 ± 0.57	14.60 ± 1.02	13.20 ± 1.80	14.10 ± 1.62
PLT ($\times 10^3$ /uL)	1024.66 ± 147.65	1139.00 ± 67.45	1045.33±52.20	1083.00 ± 38.74

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate. Red Blood Cells counts (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Mean Cell Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Red cells Distribution Width (RDW) and Platelet (PLT). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

Table 7. Effects of the sub-acute administration of CEL for 28 days on white cells and differential leukocytes count in rats.

Hematological parameters	Study groups			
	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
WBC (x10 ³ /uL)	8.66 ± 1.51	10.90 ± 0.00	17.30 ± 10.39	13.27 ± 1.17
Lymphocytes (%)	75.66 ± 10.02	77.00 ± 0.00	74.33 ± 2.51	75.25 ± 7.13
Neutrophils (%)	23.00 ± 9.53	22.00 ± 0.00	23.00 ± 1.00	22.00 ± 6.98
Monocytes (%)	0.66 ± 1.15	1.00 ± 0.00	0.66 ± 1.15	2.00 ± 0.81
Eosinophils (%)	0.66 ± 0.57	0 ± 0	0 ± 0	0.75 ± 0.50

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n=5). Leukocytes (WBC). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3.3.1 Activity of δ -ALA-D renal and hepatic enzyme

In Figure 6, a δ -ALA-D liver activity was not affected at concentrations of 100 mg/kg and 200 mg/kg compared with the control groups. Moreover, the treated group at a dose of 400 mg/kg, we observed a significant increase in enzyme activity in the liver. As regards the activity of δ -ALA-D renal, there was no significant change in any of the dosages administered compared with the control group.

3.3.2 Renal and hepatic lipid peroxidation (TBARS)

Regarding the TBARS assay, were no significant difference in kidney tissue in animals treated with different doses of the plant. In the liver, there was as increase only in the group treated with 100 mg/kg of CEL (Figure 7).

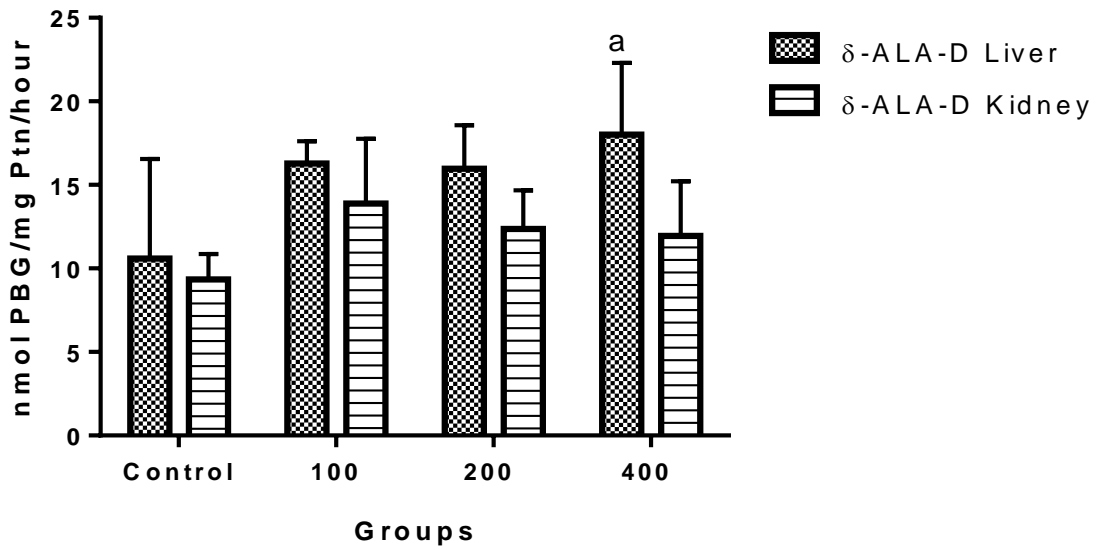


Figure 6. Effect of δ -ALA-D renal and hepatic activity in rats with sub-acute treatment with CEL at concentrations of 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg compared within the control group expressed in porphobilinogen nmol/hour ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SD *Different from the control group.

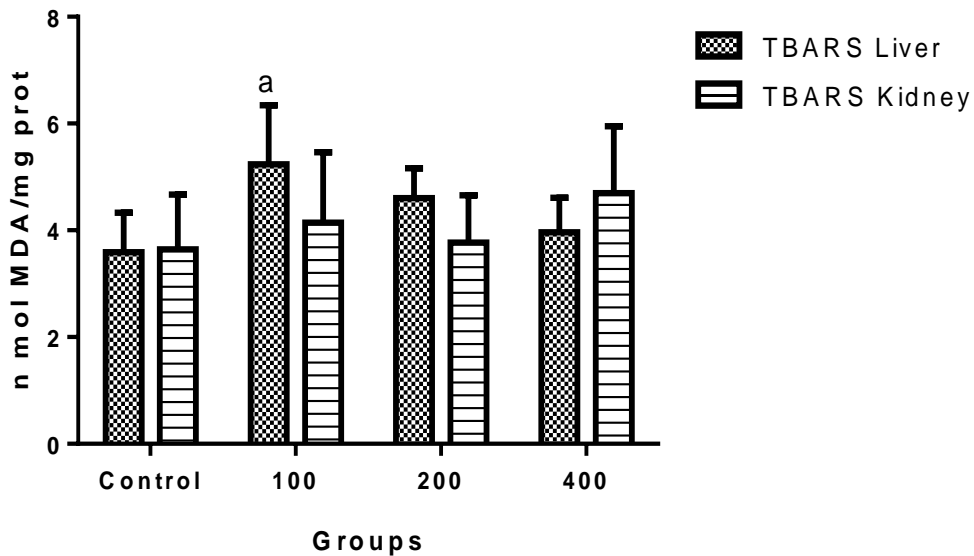


Figure 7. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in liver and kidney, expressed as nmol/mg protein of MDA after sub-acute treatment with CEL at concentrations of 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg compared to the control group ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SD. (a) Different from the control.

3.2.3 Renal and hepatic catalase enzyme

When evaluated the activity of CAT, there was no significant difference between the control group and treated groups with different doses of the plant. A decrease in CAT activity at a dose of 100 mg/kg and 400 mg/kg was noticed, however the results were not significantly different (Figure 8).

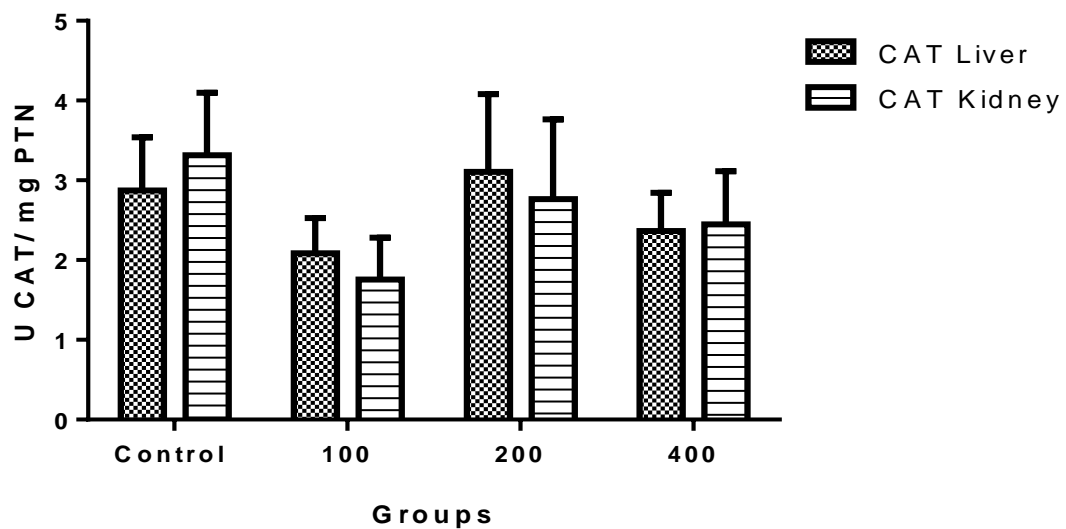


Figure 8. Effects of subacute administration of CEL on the catalase enzyme activity in liver and kidneys of rats. Data are expressed as mean \pm SD

3.2.4 Histological analysis

The histological analysis of the liver were approximately 5600 hepatocyte area and cell density of 300 courses. For all parameters, there were significant differences between group 400 mg/kg and the control group, 100 mg/kg and 200 mg/kg. There was an increase in average hepatocyte area with a reduction in the density of hepatocytes and Kupfer cells (Fig. 9C and 9D). This result indicates a significant increase in hepatic metabolism. As a result of increased hepatocyte metabolism, suggest a concomitant increase in the cytoplasmic area, justifying the reduction in the average nuclear density in the group 400 mg/kg .

In kidney statistics were analyzed approximately 900 glomerulus. For the parameters area, and nephrotic glomerular area was significant differences between group 400 mg/kg and

control groups, 100 mg/kg and 200 mg/kg (Figure 9A and 9B). In the overview, there was a compensatory reduction in nephron area and corpuscle, without change in the subcapsular area.

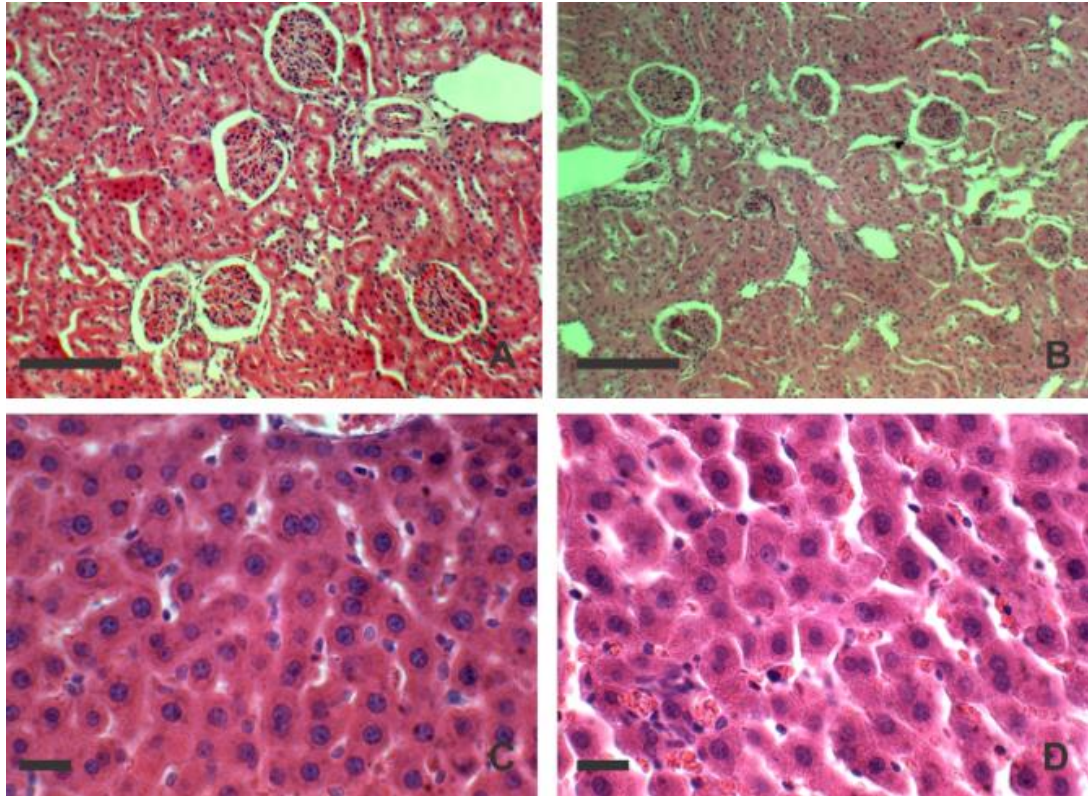


Figure 9. Photomicrography (A) Architecture of control's renal normal histology (B) Renal histology of a subject treated with 400 mg/kg *C. iguanaea* (C) Architecture of control's hepatic normal histology (D) Hepatic histology of a subject treated with 400 mg/kg *C. iguanaea*.

4 DISCUSSION

Much of consumed flora, including *C. iguanaea*, has little or no evidence of their pharmacological properties and toxic effects. Veiga et al. (2005) believes that the toxicity of medicinal plants is a serious public health issue, due to the fact that in addition to its adverse effects, its interaction with other drugs commonly occur and can lead to serious problems for consumers.

In Brazil, the use of medicinal plants by the population is widespread. The species *C. iguanaea*, popularly known as "esporão-de-galo" is a plant used for many therapeutic purposes (SOUZA et al, 2013). By observing the chromatographic analysis of CEL of *C. iguanaea* was possible to identify five mostly phenolic compounds present in the plant: gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, quercetin and rutin. The presence of these phenolic compounds is corroborated with the data present in studies conducted by Paula et al. (2010) and Trevisan et al. (2012).

In acute toxicity study of *C. iguanaea*, there was no mortality or morbidity. Furthermore, no change in food intake, neither changes in the weight were observed, and no signs of toxicity and change in behavior. Therefore, according to the guidelines established by the OECD 423, crude extract of *C. iguanaea* leaves can be included in the category 5 with a median lethal dose (LD₅₀) estimated between 2000 - 5000 mg/kg (OECD, 2001).

Blood is one of the major indices of the physiological and pathological state of the organism and changes in the hematological and biochemical serum parameters may indicate toxic effects of a test compound. After administration of 2000 mg/kg of the CEL, there was no significant change in hematological results. However, there was a significant decrease in platelet levels, which can be explained by the presence of phenolic compounds such as flavonoids (rutin and quercetin) in the crude plant extract, as described in Silva et al., (2014). According to Sabetghadam et al. (2013), the decrease in platelets levels may indicate a deficiency in the production, migration and platelet aggregation and may be related to the presence of flavonoids.

In most cases, kidney damage, such as acute renal failure, can be diagnosed by serum biochemical markers. The creatinine and urea concentrations are the tests used for the diagnosis of renal damage (BELLOMO et al., 2012). The rats subjected to acute toxicity *C. iguanaea* had a significant increase in urea levels when compared to control rats. However, creatinine was no significant difference between groups. The determination of urea in plasma, although widely used in clinical practice, alone is not a marker of some damage to the glomerular filtration rate. Around 40-70 % of urea filtered by the kidney may return to the circulation, and the fact that a high protein diet, gastrointestinal tissue destruction and corticosteroid therapy can lead to an increase in plasma urea levels (SODRÉ et al, 2007; BASTOS, KIRSZTAJN, 2011; BELLOMO et al., 2012). Moreover, the importance of the determination of serum urea to the clinic is your relationship with creatinine. The ratio between these two parameters that can indicate different renal disease states. Furthermore, it is important to note that to confirm that there was renal injury, it would be appropriate to

perform analysis of urine and quantify individuals proteins and, thus, establish whether was even a renal damage (SODRÉ et al., 2007). Therefore, there is no way to ensure that the dose given to rats caused renal damage.

Serum markers such as ALAT and ASAT are important indicators of liver damage. The ALAT is an enzyme found primarily in the cytosol of liver cells, while ASAT is not liver specific enzyme, as it is found in red blood cells, skeletal muscle and heart (REICHLING, KAPLAN, 1988). In animals treated with 2000 mg/kg of *C.iguanaea*, there was a significant decrease in ALAT . Udem et al. (2010) believe that the significant increase in transaminases (ALAT and ASAT) after high doses of an extract are capable of causing significant biochemical changes in the liver and myocardium, may cause necrosis in these tissues. Thus, the significant decrease of ALAT in treated animals can suggest a non-hepatotoxic effect, as it was also demonstrated in a study conducted by Atsamo and colleagues (2011).

Oxidative markers, such as lipid peroxidation and catalase enzyme activity, are linked to oxidative stress process, which is the overproduction of reactive oxygen species (eg, hydrogen peroxide and hydroxyl radical) generating an internal cell imbalance (VASCONCELOS et al., 2007). In related, these parameters corroborate that rats subjected to a single dose of CEL of *C. iguanaea* did not have a significant kidney damage. In addition, when these parameters were analyzed in the liver can be observed that animals treated had no statistical difference alterations. It can be inferred that the presence of phenolic compounds such as chlorogenic acid and flavonoids (rutin and quercetin) act as potent antioxidants (GARAMBONE et al., 2007).

The δ -ALA-D cytoplasmic enzyme participates in the biosynthetic route of tetrapyrrolic compounds (corrinas, bilinas, chlorophyll and heme). Thus, inhibition of this enzyme may impair biosynthesis of heme, a prosthetic group present in proteins oxygen carriers, responsible for transporting electrons, biotransform xenobiotics and protect against peroxides (SASSA, 1982; SOUZA, 2004) . In addition, the accumulation of ALA substrate may compromise critical system like the body's nervous system (MCGILLION et al., 1974). So, after acute dose administration of the CEL in animals showed no significant difference compared to the control group, indicating no toxic effect on the liver of treated rats.

In relation to the leukocyte parameters, we observed a significant proliferation of neutrophils. Responsible for the innate immune system, neutrophils are the immune cells that are in greater numbers in our circulation and their proliferation, according to Miller (1985), may be related to endogenous intoxication as increased circulating blood urea, parameter evidenced in mice treated with *C. iguanaea*.

Furthermore, the relationship between neutrophils and lymphocytes has been an important parameter to establish some cardiovascular diseases and some cancers. These studies were done in humans who already have a chronic disease affecting the body's defenses (GRAZIOSI et al, 2014; HORNE et al, 2005; PENG et al, 2014; WILLIAMS et al, 2013). If we look at this relationship in *Wistar* rats subjected to acute toxicity of *C. iguanaea*, we observed an increase that needs to be investigated. Other parameters could be required to confirm this hypothesis, for example, the dosage of interleukin 1 and 6, mediators of inflammatory response (ABBAS et al., 2011).

In subacute toxicity, systemic toxicity signals are defined from the reduction in body mass of experimental animals, as well as reduced weight gain. Systemic toxicity is manifested by reduction in water and food consumption, behavioral changes, apathy and poor coat condition, as the presence of the goose bumps, can also be expressed by changing the relative mass of the organs, hematological and biochemical changes (MELLO, 2001).

No significant differences were observed in the weight gain of rats treated with CEL at doses of 100, 200 and 400 mg/kg when compared to the control group. In the treated group with 100 mg/kg of *C. iguanaea* crude extract was not observed any changes in biochemical parameters. However, the doses of 200 and 400 mg/kg there was a significant increase in plasma glucose. One of the possibilities of this fact would be that *C. iguanaea* supposedly has some components that have hyperglycemic action. In the study of *Bixa orellana* L. known as “urucum”, it was detected a fraction inducing hyperglycemia, detailed studies have shown toxic effects on the pancreas and liver accompanied by hyperglycemia (MORRISON et al., 1991).

Transaminases represent an important group of liver enzymes and play an important role in the metabolism of amino acids, catalyze the transfer of an amino group of an amino acid into a keto acid. Alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) are transaminases of great importance in clinical diagnosis of various metabolic disorders (BOONE et al., 2005).

In the present study, there was a significant decrease of ASAT in the group treated with the dose of 400 mg/kg compared with the control group. This observation may indicate that the crude extract of *C. Iguanaea* have no toxic effect. The histological findings in the liver of animals treated with 400 mg/kg corroborate with decreasing ASAT, due to the fact that the increase in the average hepatocyte area indicates an increase in hepatic metabolism, suggesting that this dose the extract of *C. iguanaea* could have hepatoprotective effect.

The δ -ALA-D metal cytoplasmic protein is also known as porphobilinogen synthase, it has the function to catalyze the condensation of δ -aminolevulinic acid (5-aminolevulinic acid, ALA) to form the compound monopirrólico porphobilinogen (PBG). This reaction catalyzed by δ -ALA-D is part of the biosynthetic pathway of the compounds as chlorophyll and heme. In mammals, the tissues with the greatest activity of this enzyme are liver, kidney and hematopoietic tissue. Inhibition of δ -ALA-D may harm heme biosynthesis, resulting in pathological consequences. Furthermore, inhibition of this enzyme can result in accumulation of ALA substrate in the blood with a consequent increase in the urinary excretion of this compound (SASSA, FUJITA, KAPPAS, 1989).

In the group treated with CEL, the activity of δ -ALA-D kidney was unchanged compared with the control group. However, the activity of δ -ALA-D hepatic increased significantly in a dose of 400 mg/kg. This value, when correlated with decreasing in ASAT and findings of histological analysis, suggests absence of liver damage for the highest dosage.

The generation of free radicals and lipid peroxidation are extremely fast reactions. They are usually measured by their products, especially thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), including MDA. The increase in TBARS denotes a high lipid oxidative damage which promotes loss of the homeostatic equilibrium maintainability, causing changes in the vital functions of cells (LONG et al., 2004).

The CAT is a cytoplasmic heme protein which catalyzes the reduction of H_2O_2 producing a significant antioxidant effect in the body. It is considered the first line of defense against oxidative damage, protecting aerobic cells against oxidative stress caused by ROS (LLEDIAS, RANGEL, HANSBERG 1998). No significant changes occurred in either doses.

In the group treated with the crude extract of *C. iguanaea* at a dose of 100 mg/kg it was observed a significant increase in the production of MDA in the liver, while in groups 200 and 400 mg/kg there was no difference. Antunes et al. (2008) revealed that the highest TBARS concentration occurs when antioxidant levels are extremely low, indicating that the inability dismutation of H_2O_2 to water may be a first step in the installation of a frame oxidative stress, increased lipid peroxidation and decreased CAT activity represent an oxidative stress.

5 CONCLUSION

The present study showed that crude extract of *Celtis iguanaea* did not show significant toxicity in male *Wistar* rats after a single dose of 2000 mg/kg, thus it is considered safe by the OECD 423 and classified as category 5. When administered different doses for 28 days, we observed biochemical and histological alterations. At doses of 200 and 400 mg/kg caused an increase of glucose and may suggest toxic effects on the pancreas. The activity of δ -ALA-D liver had significant increases after administered of 400mg/kg and decreases in AST enzyme, suggesting that this dosage of *C. iguanaea* is not hepatotoxic, which was corroborated by histological analysis. However, more studies are necessary to confirm the safe of the plant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of CAPES and CNPq/Brazil.

REFERENCES

- ABBAS, A. K et al. **Imunidade inata**. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap 4, p. 55- 88, 2011.
- AEBI M. E. Catalase. In: Bergmeyer J, Grabl BM (eds) **Methods of Enzymatic Analysis. Enzymes oxidoreductases**, 3^o ed. Weinheim: Verlag-Chemie. v. 3, p. 273-286, 1995, 1995.
- ANTUNES, J. M. F. N.; SILVA, L. P.; MACEDO, P. Proteínas de Estresse “HSP70” Atuam como biomarcadoras de estresse oxidativo em ratos *wistar* submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de over reaching. **Brazilian Journal of Biomotricity**, v. 2, n. 3, p. 160-175, 2008.

ATSAMO, A. D. et al. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 134: 697–702, 2011.

BARBOSA, L. G.; MORAES G.; INOUE L. A. K. A. Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 255-260, 2007.

BARBOSA, N. V. et al. Effect of organic forms of selenium on daminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology** 149, 243–253, 1998.

BASTOS, M. G; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro Nefrologia** 33(1): 93-108, 2011.

BELLOMO, R. et al. Acute kidney injury. **Lancet** 380: 756–66, 2012.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum** 35, 2229–2239, 2013.

BOONE, L. et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 182-187, 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal peroxidation. **Methods Enzymology**. 52, 302–310, 1987

CASTRO, J. L. **Medicina vegetal: teoria e prática conforme a naturoterapia**. 2^o ed. Rio de Janeiro: Europa-América, 304p., 1981.

DIALLO, A. et al. In vivo and in vitro toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **J Ethnopharmacol**. 155(2):1214-8, 2014.

EL-ALFY, A. T.; AHMED, A. A.; FATANI, A. J. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 264-70, 2005.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquará** 18(2): 229-235, 2007.

GRAZIOSI, L., et al. Prognostic value of preoperative neutrophils to lymphocytes ratio in patients resected for gastric cancer. **The American Journal of Surgery**: In Press, 2014.

HORNE, B. D., et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? **Journal of the American College of Cardiology** 45(10), 2005.

LANFUMEY, L. et al. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 32, p. 1174-1184, 2008.

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 10630-10637, 1998.

LONG X., et al. Mitochondrial Ca²⁺ flux and respiratory enzyme activity decline are early events in cardiomyocyte response to H₂O₂. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 37, n. 1, p. 63-70, 2004.

MARTINS, J. L. R. M. et al. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 155, 1616-1624, 2014a.

MARTINS, J. L. R. et al. Anti-ulcerogenic and antisecretory effects of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent hexane leaf extract. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 16, 250–255, 2014.

MCGILLION, F. B.; THOMPSON, G. G.; GOLDBREG, A. The passage of delta-aminolevulinic acid across the blood brain barrier of the rat: effect of ethanol, **Biochemical Pharmacology** 23: 472 – 272, 1974.

MELLO F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana câmara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001.120f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MILLER, O. et al. **Hemograma – série branca**. In: Laboratório para o clínico. 5 ed. São Paulo: Atheneu. cap. 5, p. 90-102, 1985.

MORRISON, E. et al. Extraction of a hyperglycemic principle from the Annatto (*Bixa orellana* L.), a medicinal plant the West-Indies. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 43, p. 184-188, 1991.

OBOH, G.; et al. Phenolic compounds from sandpaper (*Ficus exasperata*) leaf inhibits angiotensin 1 converting enzyme in high cholesterol diet fed rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 157,p. 119-125, 2014.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1995. **Guideline 407**. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 468 Adopted by the Council on 27 th, July 1995.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. **Guideline 423**. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 470 Adopted by the Council on 17 th, December 2001.

PAPA, A., et al. Predictive value of elevated neutrophil–lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. **Clinica Chimica Acta** 395: 27–31, 2008.

PAULA, M. A. et al. Caracterização farmacognóstica da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. **Latin American Journal of Pharmacy** 29, 526–533, 2010.

PENG, W., et al. Neutrophil to lymphocyte ratio changes predict small hepatocellular carcinoma survival. **Journal of surgical research** 194: 402-408, 2014.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

REICHLING, J. J.; KAPLAN, M. M. Clinical Use of Serum Enzymes in Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**. 33(12): 1601-1614, , 1988.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme** 28, 133–145, 1982.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. **Genetic and chemical influences on heme biosynthesis**. In: KOTYK, A. SKODA, J. PACES, V., KOSTKA, V. (Eds.), Highlights of Modern Biochemistry, VSP, Utrecht, 1, p. 329-338, 1989.

SILVA, A. R. H. et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology** 153: 908–916, 2014.

SILVA, C. S. P.; PROENÇA, C. E. B. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasílica** 22, 481–492, 2008.

SODRÉ, F. L., et al. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 43(5): 329-337, , 2007.

SOUZA, F.B. Preliminary studies of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves (Ulmaceae). **Natural Product Research**. v. 27, 1102-1107, 2013.

SOUZA, J. P. D. Análise da atividade da enzima delta-aminulevulinato desidratase (δ -ALA-D) no diabetes mellitus e no hipotireoidismo. 2004. 139 f. **Tese (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)** – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

TREVISAN, R. R. et al. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**., Botucatu, v. 14, n. 3, 494-9, 2012.

UDEM, S. C., OBIDOA, O., ASUZU, I. U. Acute and chronic toxicity studies of *Erythrina senegalensis* DC stem bark extract in mice. **Comparative Clinical Pathology** 19: 275–282, , 2010

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, no. 5, 1323-1338, 2007.

VEIGA J. R., VALDIR F.; PINTO, A. C. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WILLIAMS, B. A.; MERHIGE, M. E. Association between neutrophil- lymphocyte ratio and impaired myocardial perfusion in patients with known or suspected coronary disease. **Heart & Lung** 42: 436-441, 2013.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde tempos antigos, os produtos naturais são utilizados pela humanidade. A busca por alívio e pela cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais. Embora de modo empírico ou intuitivo, com base em descobertas ao acaso, as sociedades antigas utilizavam as plantas para fins terapêuticos e, posteriormente, elas serviram de base para a Botânica, Química e Medicina. Atualmente, a OMS (Organização Mundial da Saúde) recomenda retomar a fitoterapia e apoia o estudo e o uso de plantas medicinais regionais como forma de baixar os custos dos programas de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

O uso popular das plantas medicinais contribui de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas destes vegetais. Suas potencialidades encontram-se longe de estar esgotadas. Novos conhecimentos e necessidades certamente encontrarão soluções no reino vegetal, uma vez que são produtoras de uma grande quantidade de metabólitos secundários com estruturas químicas diversificadas. Estes metabólitos estão sendo cada vez mais conhecidos através de isolamento, elucidação estrutural, testes farmacológicos e de toxicidade (BRASIL, 2009).

A revisão bibliográfica acerca de *Celtis iguanaea* despertou o interesse em estudar esta espécie, pois demonstrou-se promissora devido aos seus diversos usos populares e por ser comum na região Sul do Brasil, aliado a poucos estudos sobre esta planta. Este trabalho apresenta diferentes testes, utilizando duas partes da planta: raízes e folhas. No primeiro manuscrito, trabalhou-se com as raízes do vegetal, no qual avaliou-se a atividade antioxidante através de diferentes métodos, como sequestro do radical DPPH, diclorofluoresceína, TBARS, inibição da carbonilação de proteínas e poder de redução, além da quantificação de certas classes de metabólitos, como compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos e alcaloides. O potencial antimicrobiano da planta também foi avaliado, de modo a investigar a capacidade dos diferentes extratos de inibir o crescimento de bactérias e fungos causadores de infecções, informação relevante visto que as raízes são utilizadas na medicina popular em casos de infecção urinária.

O *screening* fitoquímico qualitativo realizado nas raízes de *C. iguanaea* apresentou resultados positivos para os grupos químicos antocianinas, grupo amino, flavonoides,

leucoantocianidinas, flavonas, triterpenoides, esteroides, compostos fenólicos, cumarinas e ácidos orgânicos. Estes resultados encontram-se em conformidade com estudo já realizado na espécie (PAULA et al. 2010). De acordo com Arantes et al. (2005) os flavonoides constituem um grande grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza que protegem as plantas contra infecções bacterianas e fúngicas. Silva et al. (2009) citam que compostos fenólicos podem apresentar atividade antibacteriana, podendo explicar, parcialmente, o uso popular das raízes em casos de infecção urinária.

A quantificação de polifenóis totais no extrato bruto (EB) e frações diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH) seguiu o método descrito por Chandra e Mejia (2004), utilizando como reagente o Folin-Ciocalteu, e ácido gálico (AG) como padrão. A maior concentração de polifenóis foi encontrada na fração AcOEt, com $221,55 \pm 0,28$ mg de equivalentes de AG por grama de fração. Cechinel Filho e Yunes (1998) afirmam que os compostos fenólicos em geral, quando se trabalha com frações de diferentes polaridades, costumam se concentrar na fração AcOEt, estando de acordo com o que foi encontrado neste trabalho. Quanto aos teores de flavonoides, avaliado pelo método do cloreto de alumínio, utilizando quercetina como padrão (WOISKY e SALATINO, 1998) e concentração de alcaloides seguindo metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003), a fração AcOEt também apresentou os maiores valores, $28,80 \pm 0,09$ mg/g fração e $3,96 \pm 0,32$ mg/g fração, respectivamente. Por outro lado, a fração BuOH se destacou com os maiores teores de taninos ($14,10 \pm 0,20$ mg/g fração) avaliado através do método da vanilina, utilizando o padrão catequina (MORRISON et al., 1995). Podemos notar que na prospecção fitoquímica não foi detectado taninos, visto que o método possui sensibilidade menor que o método de doseamento de taninos condensados. Quanto aos alcaloides, estes não foram pesquisados no screening inicial.

Diversos métodos são utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção de compostos que possam ser utilizados como fármacos. Dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a capacidade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente, devido aos diferentes tipos de radicais livres e de suas diferentes formas de atuação em organismos vivos (ALVES et al., 2010). As plantas produzem uma variedade de antioxidantes necessários para as mesmas se protegerem dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo imposto pelos raios solares e exposição ao oxigênio (SCARTEZZINI, SPERONI, 2000).

Os polifenóis são amplamente distribuídos no reino vegetal. São efetivos doadores de hidrogênios e seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição de grupamentos hidroxila, bem como, da sua habilidade em suportar a deslocalização dos elétrons no anel aromático. (MALLACRIDA, MOTTA, 2005).

A ausência de estudos químicos sobre o potencial antioxidante de *C. Iguanaea* motivou a avaliação desta espécie, visto a importância da relação existente entre esta atividade e a prevenção do envelhecimento precoce, doenças neurodegenerativas e câncer.

A capacidade antioxidante *in vitro* foi realizada para o EB e frações de *C. Iguanaea*, através do método do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) (CHOI et al., 2002). Este ensaio é baseado na medida da capacidade de uma substância antioxidante em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina e com mudança simultânea da coloração para amarelo (ALVES et al, 2010). A fração AcOEt foi a que apresentou a melhor capacidade antioxidante através deste método, apresentando um valor de IC₅₀ (concentração necessária para inibir o radical DPPH em 50%) de $27.97 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$, sendo que o padrão ácido ascórbico apresentou IC₅₀ de $15.98 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$. Alguns autores tem descrito a existência de uma correlação positiva entre o teor de polifenóis e capacidade antioxidante, justificando, assim, a maior inibição do radical DPPH pelas frações que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos (AcOEt e BuOH) (BOLIGON et al. 2013; BRUM et al. 2013; ZADRA, 2012). Adedapo e colaboradores (2009), estudando a capacidade antioxidante do extrato metanólico das folhas e galhos de *Celtis africana*, observou que na maior concentração utilizada (0,1 mg/mL) a capacidade de reduzir o DPPH foi maior com o extrato dos galhos (89,69%) do que das folhas (64,96%) da planta em relação ao padrão ácido ascórbico, fato que foi atribuído a presença de polifenóis e flavonoides.

Um método muito utilizado para determinar o estresse oxidativo em células, devido a alta sensibilidade, é o da diclorofluoresceína (DCFH), utilizando sua forma diacetato (DCFH-DA). Após hidrólise na célula do composto DCFH-DA, a DCFH é liberada e, ao reagir com radicais livres produzidos pelo metabolismo celular normal, forma o composto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), cuja intensidade é medida (ROTA, CHIGNELL e MASON, 1999; BONINI et al., 2006). Desta forma, na quanto maior a concentração de substâncias antioxidantes que neutralizem os radicais livres, menor será a formação de DCF e, conseqüentemente, menor intensidade de fluorescência é observada.

O EB e frações de *C. Iguanaea* foram testados em diferentes concentrações, utilizando o sobrenadante do cérebro de ratos como meio e ácido ascórbico como padrão. As frações CH₂Cl₂ nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e AcOEt em 200 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de

reduzir a oxidação da DCF de modo significativo. De modo semelhante, Zadra et al. (2012) e Brum et al. (2013) avaliaram a capacidade de remoção de EROs dos extratos de *Solanum Guaraniticum* e *Vitex megapotamica*, respectivamente, os quais foram capazes de reduzir, significativamente, a oxidação de DCFH e, desta forma, reduzir o estresse oxidativo observado em células de cérebro de ratos, quando comparado ao grupo basal, demonstrando pronunciada capacidade antioxidante.

O dano oxidativo a macromoléculas biológicas é reconhecido como um importante desencadeante de doenças inflamatórias. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado por um radical livre, podendo formar radicais que propagam a reação peroxidativa e carbonilas tóxicas, como o malondialdeído, que são citotóxicas e podem lesar o DNA (ESTERBAUER, 1993).

Afim de avaliar o efeito de inibição da peroxidação lipídica pelo EB e frações das raízes de *C. Iguanaea*, foi realizado o teste de TBARS, baseado na medida espectrofotométrica de um subproduto da peroxidação lipídica, o MDA. De acordo com a metodologia descrita por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), FeSO_4 é adicionado em amostras de cérebro de ratos, estimulando o dano oxidativo. Com a adição dos extratos da planta em diferentes concentrações, a atividade protetora exercida pelos compostos pode ser, então, mensurada. As frações CH_2Cl_2 e AcOEt foram capazes de reduzir a formação de MDA de modo significativo, sendo que a fração AcOEt apresentou o menor IC_{50} ($42,03 \pm 4,55 \mu\text{g/mL}$). Provavelmente, esta atividade se deva as maiores quantidades de compostos fenólicos, flavonoides e taninos encontrados na fração. Flavonoides são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica e lipooxigenase *in vitro* (BOLIGON et al., 2009; HUNG e YEN, 2001; PEREIRA et al., 2009).

A inibição da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas realizados por compostos antioxidantes são uma importante ferramenta na inibição e/ou impedimento da progressão de uma série de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Proteínas carboniladas, resultantes da reação de cadeias laterais de lisina, arginina, prolina, treonina e ácido glutâmico com radicais livres, podem acumular na célula conduzindo à morte por necrose ou apoptose, originando processos patológicos (MAHESHWARI et al., 2011).

A capacidade de inibição da oxidação de proteínas pelo EB e frações foi avaliada através da quantificação de grupamentos carbonil em proteínas, pelo método descrito por Morabito e colaboradores (2004), utilizando soro humano e dano induzido por H_2O_2 . Todas as frações, assim como o EB do esporão-de-galo, foram capazes de reduzir o conteúdo de proteína carbonil significativamente em relação ao controle induzido, de maneira dose-

dependente, sendo que na maior concentração utilizada (200 µg/mL), os extratos reverteram completamente o dano causado, não apresentando diferença significativa com relação ao controle negativo.

Apesar dos enormes avanços da medicina, as doenças infecciosas, causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas, ainda são uma ameaça à saúde pública. Produtos naturais continuam sendo uma das principais fontes de novos agentes terapêuticos, incluindo para doenças infecciosas (COS et al., 2006). Tendo em vista o uso popular das raízes da espécie *C. iguanaea* e o estudo realizado por Silva e Proença (2008), no qual houve uma concordância de uso popular maior que 50% em casos de infecção urinária utilizando as folhas/raízes na forma de decocção, motivou-se a avaliar a atividade de seus extratos frente a bactérias e fungos. Desta forma, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, o qual fornece a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos. Porém, apenas o fungo *Sacharomyces cerevisiae* mostrou-se sensível aos extratos CH₂Cl₂ e AcOEt, enquanto que os outros microorganismos estudados apresentaram CIM > 1,00 mg/mL. O resultado encontrado pode sugerir que a forma de extração utilizada no nosso estudo (maceração à frio) não extraiu os compostos com possível atividade antimicrobiana, já que na medicina popular é comum a forma de decocção – a qual utiliza calor – para extração.

Muitos produtos de origem vegetal quando consumidos de forma inadequada podem estar relacionados com etiologia de injúrias hepáticas, renais e cardíacas. A toxicidade de plantas ocorre quando a ingestão de chás, extratos e tinturas é realizada sem indicação clínica e de forma indiscriminada. Sabendo da ampla variedade de indicações populares do esporão-de-galo e escassos estudos na literatura sobre seus efeitos tóxicos, motivou a realização do segundo manuscrito, que teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda e subaguda das folhas de *C. iguanaea*.

Borges e colaboradores (2013) investigaram uma possível citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do extrato aquoso das folhas em três concentrações (100, 300 e 500 mg/kg) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos. Os autores puderam concluir que o extrato não apresentou efeitos citotóxicos e genotóxicos, e sim, ação antigenotóxica e anticitotóxica sobre as condições experimentais aplicadas neste estudo. A atividade antigenotóxica e anticitotóxica do extrato aquoso das folhas foi associada a presença de flavonoides, que exercem proteção por capturar radicais livres, reduzir a alquilação e/ou outros mecanismos antioxidantes. Por outro lado, os autores ressaltaram que, devido a complexidade de extratos de plantas, há maior probabilidade dos resultados encontrados

serem devido ao sinergismo, antagonismo e outras interações entre os compostos biologicamente ativos.

A toxicidade aguda do extrato bruto (EB) das folhas da planta seguiu as diretrizes estabelecidas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 423 (2001), com algumas modificações. Segundo a OECD 423, o estudo da toxicidade aguda permite avaliar quais e como serão os efeitos em um organismo em um curto período de tempo (até 2 semanas), quando ele é exposto apenas uma vez à administração de um composto ou extrato de uma planta medicinal, por exemplo. O grupo teste (três machos *Wistar*) recebeu uma única dose de 2000 mg/kg de extrato e o grupo controle recebeu apenas água destilada. Os animais foram observados durante 14 dias. Durante o protocolo experimental, não houve mortes em nenhum dos grupos e tampouco alterações significativas no peso corporal. O conteúdo de malondialdeído (MDA) e a atividade da enzima CAT e da enzima δ -ALA-D nos tecidos hepáticos e renais tiveram seus valores semelhantes aos encontrados no grupo controle, concluindo que uma única dose de EB não é capaz de alterar as defesas antioxidantes dos tecidos. Em relação aos parâmetros hematológicos, não houve alteração significativa. Por outro lado, a concentração de plaquetas demonstrou diminuição significativa. Este resultado pode indicar uma deficiência na produção, migração e agregação plaquetária (Sabetghadam et al. 2013) e pode estar relacionada com a presença de flavonoides (rutina e quercetina) no EB das folhas de *C. iguanaea*. De acordo com Barreca et al. (2009), o consumo de comidas e bebidas ricas em flavonoides pode estar associado com a redução da agregação plaquetária.

Na avaliação dos valores médios da série branca, observou-se que o EB alterou o número de neutrófilos e linfócitos em relação ao grupo controle. A diminuição do número de linfócitos sugere efeito imunodepressor do extrato, mas por outro lado, o aumento no número de neutrófilos, pode sugerir atividade imunoestimulante. Parente et al. (2009) obteve resultados semelhantes quando analisou a toxicidade das flores de calêndula (*Calendula officinalis*). Os autores sugeriram que, como as alterações em relação ao número de neutrófilos e linfócitos encontram-se dentro dos valores hematológicos normais para a espécie animal (ratos *Wistar* machos) (BIRCHARD e SHERSING, 2002), as modificações encontradas podem ser consideradas irrelevantes nesse caso. A mesma interpretação seria válida para os resultados encontrados neste trabalho.

Analisando os parâmetros bioquímicos, os grupos tratados apresentaram diferença significativa em relação a uréia e a enzima ALAT. Apesar da concentração de ureia sanguínea ter apresentado um aumento, os níveis de creatinina não modificaram significativamente entre

os grupos. Desta forma, não podemos indicar que houve algum dano renal apenas com estes dados, pois a importância da dosagem da uréia sérica para a clínica é a sua relação com a creatinina. Já os níveis de ALAT apresentaram diminuição em relação ao grupo controle, demonstrando um possível efeito protetor do extrato da planta na dose utilizada neste estudo, assim como descrito por Atsamo e colaboradores (2011).

O guia OECD 423 não permite calcular a dose letal média (LD₅₀) precisamente, mas por outro lado, utiliza poucos animais de cada sexo, já que testes de LD₅₀, geralmente, utilizam um grande número de animais (VALADARES, 2006). Assim, dependendo da mortalidade e/ou morbidade dos animais, em média 2-4 repetições, podemos avaliar a toxicidade aguda da substância ou extrato em teste.. A ausência de sinais de morbidade e mortalidade após a administração aguda do extrato de *C. iguanaea* é uma possível indicação da segurança relativa da administração da planta a curto prazo (BAFOR e IGBINUWEN, 2009; SILVA et al., 2014).

No ensaio de toxicidade subaguda, 20 ratos da raça *Wistar* foram divididos em quatro grupos: controle, e os grupos de animais que receberam por via intragástrica as doses de 100, 200 e 400 mg de EB das folhas por kg de peso corporal. Todos receberam uma única dose diária de água ou extrato nas diferentes concentrações, durante 28 dias. No nosso estudo, a administração subaguda do extrato da planta não causou mortalidade /ou morbidade, nem alterou o ganho de peso e consumo de comida no período estudado.

Em relação as defesas antioxidantes, houve um aumento significativo na atividade da enzima δ -ALA-D hepática no grupo tratado com 400 mg/kg de extrato e, também, um aumento na produção de TBARS no grupo tratado com 100 mg/kg. Como a inibição da δ -ALA-D está ligada à consequências patológicas, uma vez que prejudica a biossíntese do heme (SASSA e KAPPAS, 1983), o aumento da atividade deste enzima pode indicar um possível efeito protetor do extrato na maior dose utilizada.

Quando analisados os parâmetros hematológicos, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos testes e o grupo controle, seja na série vermelha, concentração de plaquetas e perfil leucocitário de ratos *Wistar* submetidos ao tratamento subagudo com *C. iguanaea*.

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados, houve diferença significativa na dosagem do colesterol entre os grupos controle e 400 mg/kg e glicemia entre os grupos controle e 200 e 400 mg/kg. Diallo e colaboradores (2014) também verificaram um aumento da glicose sanguínea na avaliação da toxicidade de *Ageratum conyzoides* em ratos *Wistar*. Os autores sugeriram que tal fato pode ocorrer devido a destruição do pâncreas ou a uma falha no

armazenamento da glicose. Outros autores sugerem que a hiperglicemia ocasiona um aumento na quantidade de EROS presentes nas células betas pancreáticas, levando a disfunção celular e uma menor expressão de enzimas antioxidantes (EL-ALFY, 2005). Porém mais estudos seriam necessários para verificar possíveis mecanismos de ação deste efeito hiperglicêmico do extrato da planta, assim como o efeito hipercolesterolêmico.

A ASAT é considerada um sensível indicador de dano hepatocelular e dentro dos limites pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (AL-HABORI et al., 2012). O presente estudo sugere que o uso do extrato da planta pode não ser hepatotóxico, uma vez que foi observada uma diminuição significativa na ASAT na dose de 400 mg/kg, sugerindo que o composto pode induzir um efeito hepatoprotetor (COSTA et al., 2012). Este resultado corrobora com o aumento significativo encontrado na atividade da enzima δ -ALA-D hepática no grupo tratado com 400 mg/kg, assim como com a análise histológica do fígado, que demonstrou um aumento no metabolismo hepático, através de um aumento na área média dos hepatócitos, sugerindo, mais uma vez, o efeito hepatoprotetor do extrato.

Os dois ensaios realizados neste trabalho indicam que de maneira geral, o extrato bruto das folhas de *C. iguanaea* é seguro. Através do estudo de toxicidade aguda, o extrato foi classificado na categoria 5 (2000 - 5000 mg/kg). Quando administrado por 28 dias, o extrato causou aumento da glicose sanguínea, sugerindo um possível efeito tóxico no pâncreas. Por outro lado, a diminuição da ASAT hepática, assim como o aumento da δ -ALA-D hepática e os resultados da histologia, puderam, em conjunto, indicar um provável efeito hepatoprotetor do extrato da planta.

6 CONCLUSÕES

- A análise fitoquímica preliminar do extrato bruto das raízes de *Celtis iguanaea* indicou a presença de antocianinas, grupo amino, flavonoides, leucoantocianidinas, flavonas, triterpenoides, esteroides, compostos fenólicos, cumarinas e ácidos orgânicos;
- Na análise das principais classes de metabólitos secundários presentes nas raízes, verificou-se que a fração AcOEt possui as maiores quantidades de polifenóis, flavonoides e alcaloides, enquanto que a fração BU apresentou os maiores valores de taninos;
- A análise por CLAE revelou a presença de Ácido gálico nas raízes da planta, encontrado em maior quantidade na fração AcOEt; enquanto que no extrato bruto das folhas foram detectados e quantificados os compostos Ácido gálico, Ácido clorogênico, Ácido elágico, Rutina e Quercetina, sendo o Ácido elágico encontrado em maior concentração.
- Na avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH e da inibição da peroxidação lipídica pelo TBARS, a fração AcOEt se destacou com o menor IC₅₀, demonstrando a melhor capacidade antioxidante; também apresentou menor EC₅₀ pelo teste de poder de redução, mas sem diferença significativa em relação aos outros extratos;
- Através do ensaio da DCFH-DA, as frações AcOEt e CH₂Cl₂ foram capazes de remover radicais livres de modo significativo, corroborando com os bons resultados encontrados para a fração AcOEt nos outros testes antioxidantes;
- Todos os extratos, menos a fração CH₂Cl₂, foram capazes de reverter completamente o dano oxidativo através do ensaio da proteína carbonil;
- Na avaliação da atividade antimicrobiana, apenas o fungo *Sacharomyces cerevisiae* foi suscetível aos extratos (AcOEt e CH₂Cl₂);
- No estudo da toxicidade aguda das folhas de *C. iguanaea* não houve mortalidade ou morbidade, nem mudanças na ingestão de comida, água ou peso corporal, deste modo, apesar de terem sido verificadas algumas alterações hematológicas e bioquímicas, o extrato foi classificado na categoria 5 (LD₅₀ entre 2000-5000 mg/kg), de acordo com o Guia OECD 423;
- Na avaliação da toxicidade subaguda, verificou-se um aumento na glicemia dos animais em estudo, o que pode indicar uma possível toxicidade pancreática; por outro lado, alterações enzimáticas e a análise histológica indicaram um possível efeito hepatoprotetor na maior dose de extrato utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDAPO, A. A. et al. Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis africana*. **Rec. Nat. Prod.** 3:1 (2009) 23-31

ALASALVAR, C. F. et al. Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.).2.lipid characteristics and oxidative stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, 3797-805, 2003.

AL-HABORI M. et al. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol.** 83(3):209-17, 2012.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova.** 33(10):2202-10, 2010.

ARANTES, V. P. et al. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.26, n.3, p.195-198, 2005.

ARAÚJO, P. W. B. et al. Flavonóides e Hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.12, n.3, 188-189, 2005.

ATSAMO, A. D. et al. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 134: 697–702, 2011.

BAFOR, E. E., IGBINUWEN, O. Acute toxicity studies of the leaf extract of *Ficus exasperata* on haematological parameters, body weight and body temperature. **Journal of Ethnopharmacology** 123, 302–307, 2009.

BARON-RUPPERT, G.; LUEPKE, N. P. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET). **Phytomedicine**, 8 (2): 133-138, 2001.

BARRECA, D. et al. Influences of flavonoids on erythrocyte membrane and metabolic implication through anionic exchange modulation. **Journal of Membrane Biology**, 230, 163–171, v. 18, 2007.

BIRCHARD, S. J.; SHERSING, R. G. “**Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**”. Rocca, São Paulo, 2002.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, 2229-2239, 2013.

BOLIGON, A. A. et al. Analysis of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity in *Nasturtium officinale*. **International Journal of Food Properties**, 16:61–69, 2013.

BOLIGON, A. A. et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, 100, 6592-6598, 2009.

BONINI, M.G. et al. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 968-975, 2006.

BORGES, F. F. V. et al. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 85(3): 955-963, 2013.

BRASIL. **Decreto Nº 5.813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em: 20 de nov. 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48**, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial República Federativa do Brasil, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria 971**, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 04 mai. 2006. Sessão 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos** – Série C, 140p. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRAZ FILHO, R.. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. Vol.33, No 1, 229-239, 2010.

BRENNEISEIN, R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents in: M. A. ElSohly (ed). Marijuana and the cannabinoids. **Humana Press**. 2006.

BRUM, T. F. et al. HPLC Analysis of phenolics compounds and antioxidante capacity of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Molecules** 18, 8342-8357, 2013.

CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. V. 2, p. 261-279, 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Quim. Nova**, 21, 99-105, 1998.

CHANDRA, S. e MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparision to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHO, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydralyl radical. **Phytomedicine**, v.10, 544-551, 2003.

CHOI, C. W. et al. Antioxidante activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, 1161-1168, 2002.

COLOMBO. Introdução a fitoterapia: utilizando adequadamente as plantas medicinais. Colombo: **Herbarium Lab. Bot. Ltda.** 92p, 2008.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e exóticas cultivadas**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, v. 6, 465-6, 1984.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proofof- concept'. **J Ethnopharmacol**, 106: 290-302, 2006.

COSTA, E. A. et al. Efeito gastroprotetor do extrato aquoso de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão de galo). In: **III FeSBE regional**, Fortaleza, 2008.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Av. De Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 38-58, 2005.

CUNHA, L.C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 19, p.403-411, 2009.

CUPP, M. J. Toxicology and clinical pharmacology of herbal products. Totowa: **Humana Press**; 325p, 2000.

DANTAS, F.G. Epilepsy and marijuana – a review. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, 11(2), p. 21, 2005.

DEMIR, F. et al. Nutritional and physical properties of hackberry (*Celtis australis* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 54, 241-247, 2002.

DI MAMBRO, V.M; FONSECA, M.J.V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, 287 – 295, 2005.

DIALLO, A. et al. In vivo and in vitro toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **J Ethnopharmacol.**;155(2):1214-8, 2014.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, 197–201, 2007.

EL-ALFY, A. T.; AHMED, A. A.; FATANI, A. J. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 264-70, 2005.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipidoxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 57, p. 779-785, 1993.

FRIMMEL, A. E.; et al. Vitexin, paprazine and terpenoids from *Trema micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v 28, 495-496, 2000.

GALICIA, E. H. et al. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. **Western Pharmacology Society**, v. 45, 118-124, 2002.

GILANI, A. H.; ATTA, U. R. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, 43-49, 2005.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, v. 4, 265272, 1996.

GROSS, D. W. et al. Marijuana use and epilepsy. Prevalence in patients of a tertiary care epilepsy center. **Neurology**; 62:2095-7, 2004.

HATANO, T. et al. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, v. 66, 2047–2055, 2005.

HUNG, C.Y., YEN, G.C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tso (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v.34, p.306-311, 2001.

HWANG, B. Y. et al. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, 197-201, 2003.

COSTA, J. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**;33(3):421-428, 2012.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal, enfoque filogenético**. 3a ed. Artmed, Porto Alegre. 632p, 2009.

KUO, W. L. et al. Chemical constituents of *Trema orientalis*. **Chinese Medical Journal**, BeiJing-China, v. 18, n. 1,2, 27-36, 2007.

LIM, K. H. et al. Seco-tabersonine alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. **Phytochemistry**, v. 70, 424-429, 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 869, 1999.

MAHESHWARI, D.T. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2422-2428, 2011.

MARQUES, F. C. **Fito 2000** – Boletim da Associação catarinense de Plantas Mediciniais, 2001.

MARTINS, J. L. R. M. et al. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 155, 1616-1624, 2014a.

MARTINS, J. L. R. et al. Anti-ulcerogenic and antisecretory effects of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent hexane leaf extract. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 16, 250–255, 2014.

MCPARTLAND, J. M.; CLARKE, R. C.; WATSON, D. P. Hemp Diseases and Pests: Management and Biological Control. **CABII** 278 p., 2000.

MORABITO, F. et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. **Mediators of Inflammation** 13, 381–383, 2004.

MOREL, F. A. et al. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, 2571–2576, 2005.

MORRISON, I. M. et al. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. **Annals of Botany** 76, 287–290, 1995.

MOURA-COSTA, G. F. et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on a indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 143, 631-638, 2012.

NAIR, V. D. P.; KANFER, I; HOOGMATTENS, J. Determination of stigmasterol, β -sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, 731-737, 2006.

OHKAWA, H., OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** 95, 351–358, 1979.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1995. **Guideline 407**. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 468 Adopted by the Council on 27 th, July 1995.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. **Guideline 423**. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 470 Adopted by the Council on 17 th, December 2001.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. Brasília: Thesaurus, 373, 1994.

PANGHAL, M.; KAUSHAL, V.; YADAV, J. P. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 10:21, 2011.

PARENTE, M. L. et al. *Calendula officinalis*: Efeito Depressor Central e Toxicidade Subaguda. **Lat. Am. J. Pharm.** 28 (6): 907-13, 2009.

PAULA, M. A. et al. Caracterização farmacognóstica da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 4, 526-33, 2010.

PAULA, M. A.. Caracterização farmacognóstica e atividade gastroprotetora do Extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

PEDERNEIRAS, L. C. et al. Ulmaceae, Cannabaceae e Urticaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, 62 (2): 299-313, 2011.

PEPPING, J. P. Kawa: *Piper methysticum* Alternative therapies. **American Journal of Healthy-System Pharmacy**. V. 56, n. 10, p. 957-958, 960, 1999.

PEREIRA, K. C. S. et al. Ausência de efeito genotóxico do extrato de esporão-de-galo em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Resumo do 54º Congresso Brasileiro de Genética**. Salvador (BA), 2008.

PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical research**, v. 34, p. 973-983, 2009.

PERVEEN, S. et al. Antioxidant and urease inhibitory C-glycosylflavonoids from *Celtis africana*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, No. 9, 799-804, 2011.

PIO, C. M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931.

RAO, A. V.; JANEZIC, S. A. The role of dietary phytosterols in colon carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 18, 43-52, 1992.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

RODRIGUES, V. E. G. **Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto do Rio Grande, MG.** Lavras. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ROTA, C.; CHIGNELL, C.F.; MASON, R.P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 7/8, p. 873-881, 1999.

SABETGHADAM, A. et al. Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of *Mitragynas peciosa*, in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 146,815–823, 2013.

SANTOS, A. B. dos. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcionamento da densidade.** Tese (Doutorado em Física Aplicada a Medicina e Biologia) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. São Paulo, 2006.

SANTOS, S. S. et al. Determinação da concentração letal média (CL₅₀) do extrato da folha de esporão-de-galo (*Celtis iguanaea*) para o *Poecilia reticulata* e análise histopatológica da pele. **63ª Reunião Anual da SBPC**, Goiânia, GO, 2011.

SASSA, S.; KAPPAS, A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. **The Journal of Clinical Investigation**, V. 71, n. 3, p. 625-634, 1983.

SATTARIAN, A. Contribution to the biosystematics of *Celtis* L. (Celtidaceae) with special emphasis on the African species. **PhD Thesis** Wageningen University, Wageningen, 2006.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, 1191, 2011.

SCHENKEL, E. P. Cuidado com os medicamentos: as plantas medicinais, os chás e os fitoterápicos. Porto Alegre: Saga, Delluzzata, 1995.

SCHOENFELDER, T.; CIRIMBELLI, C. M; ZANETTE, V. C. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 107, 456-459, 2006.

SILVA, A. R. H. et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology** 153: 908–916, 2014.

SILVA, C. S. P.; PROENÇA, C. E. B. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 22, n. 2, 481-492, 2008.

SILVA, J.G. et al. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.19, n.3, p.790-794, jul./set. 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2010.

SINITOX, **Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região**. Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf>. Acesso em: 24 out. 2014.

SMALL, E.; CRONQUIST, A. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. **Taxon** 25: 405-435, 1976.

SOMMAVILLA, V. et al. Seasonal variation in phenolics in leaves of *Celtis australis* (Cannabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, 110-114, 2012.

SOUZA, F. B. et al. Preliminary studies of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves (Ulmaceae). **Natural Product Research**, v. 27, 1102-1107, 2013.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em *APG II*. Ed. 2. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP, 2008.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**, 86, 1124–1127, 2003.

TENE, V. et al. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe, Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 111, 63-81, 2007.

TREVISAN, R. R. et al. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu, v. 14, n. 3, 494-9, 2012.

TSUDA, T. et al. Radical scavenger effect of *Boschniakia rossica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, 85-90, 1994.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.42, no.2, 2006.

VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. **Electronic Journal of Pharmaceutics**, 3, 93–98, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, no. 5, 1323-1338, 2007.

VEIGA J. R., VALDIR F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v.29, n.2, p.326-337, 2006.

WOISKY, R. G. SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research** 37, 99–105, 1998.

WOOLTORTON, E. Herbal kava: reports of liver toxicity. **Canadian Medical Association Journal**, v. 166, n.6, p. 777, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Vol. 1. Geneve, 2003.

ZADRA, M. et al. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. S St.-Hil. **Molecules**, 17, 12560–12574, 2012.

ZIELINSKA, M.; GÜLDEN, M.; SEIBERT, H.; Effects of quercetin and quercetin-3-Oglucosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, 47-53, 2003.