

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

Raphaela Maleski Borges

**EXTRATOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Syzygium cumini* (L.)
Skeels PROTEGEM OS LINFÓCITOS DO DANO OXIDATIVO**

**Santa Maria, RS
2017**

Raphaela Maleski Borges

**EXTRATOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels
PROTEGEM OS LINFÓCITOS DO DANO OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Moretto

Santa Maria, RS, Brasil

2017

Raphaela Maleski Borges

**EXTRATOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels
PROTEGEM OS LINFÓCITOS DO DANO OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 20 de janeiro de 2017:

Maria Beatriz Moretto, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Karine Santos de Bona Libardoni , Dra (URI-Santo Ângelo)

Daniele Rubert Nogueira Librelotto, Dra (UFSM)

Santa Maria, RS.
2017

Aos meus amados pais Jorge e Rosana, que hoje são estrelas no céu e sempre serão os meus maiores exemplos de vida.

*“É sobre saber que em algum lugar
Alguém zela por ti.”*

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me guia e ilumina os meus caminhos, que nem sempre são fáceis, mas a fé Nele me mantém firme para enfrentar os obstáculos mais difíceis e que não me permite desistir, pois confio nos Seus planos para minha vida.

Àquela que foi meu grande exemplo de força e luta pela vida, mesmo diante de todas as adversidades, nunca deixou de ser alegre e positiva, mostrando sempre um sorriso no rosto independente da situação. Ensinou-me e dedicou a vida para que a minha fosse a melhor possível. Mãe, tu foste uma grande guerreira, és minha inspiração! Espero, um dia, ter um pouquinho da coragem que tu tiveste! Àquele que foi meu grande amigo, meu maior professor da vida e que “segurou as pontas” ficando responsável pela maior parte da educação de duas meninas, o que não é uma tarefa fácil! Pai, obrigada por comemorar cada conquista minha e me ensinar que o estudo é a única coisa que ninguém nos tira. O senhor foi meu herói, meu exemplo. Vocês foram os melhores pais que eu poderia querer. Sou muito grata a vocês, pois o discernimento e o caráter que possuo hoje foram graças aos ensinamentos de vocês. Sinto tanto por terem ido cedo demais!

Àquela que me acolheu sempre e se tornou um pouquinho minha mãe, zelando e cuidando de mim, minha querida irmã Jozana. Um dos amores mais verdadeiros e sinceros é o amor de irmãs. Além disso, me proporcionou os meus maiores tesouros, meus sobrinhos lindos que eu amo e que enchem a casa de alegria e amor. Ao meu cunhado Fábio, obrigada pelo empenho em ajudar em qualquer situação. Fico muito feliz em saber que sempre me receberão de portas-abertas e sempre terei para onde voltar. Obrigada por me apoiarem nas escolhas que fiz e por estarem sempre ao meu lado!!!!

Àos meus pequenos, meus sobrinhos amados, Jorge Lucas e Helena. Cada ida a Cruz Alta meu coração se enche de amor ao vê-los. Vocês são tudo pra mim. Pelo fato de serem tão pequenos, talvez, nem tenham noção ainda, mas estar com vocês me fortalece para enfrentar os maiores obstáculos da vida.

Ao Matheus, meu sobrinho de coração, muito obrigada pelos momentos alegres!

Àquele que se fez sempre presente e que só de estar ao meu lado me acalma para enfrentar todos os desafios. A pessoa que escolhi para ficar para sempre do meu lado, que encontrei forças e incentivos para continuar sempre. O meu melhor

amigo, meu porto seguro, meu namorado, meu noivo: Angelo. Obrigada por ser essa pessoa tão essencial e acreditar em mim sempre, até mais que eu mesma. Aprendo todos os dias contigo a me tornar uma pessoa melhor. Te amo muito!!!!

Aos meus sogros queridos, Lena e Josué, por me receberem tão bem em sua família fazendo eu me sentir parte dela. Obrigada pelo carinho e amor de sempre!

À minha orientadora, Maria Beatriz Moretto, eu agradeço pela oportunidade de realizar iniciação científica durante a graduação e pela orientação deste trabalho durante o mestrado. Serei eternamente grata pela paciência, dedicação, comprometimento e confiança depositada, e por todo o aprendizado científico adquirido. Obrigada por me conduzir ao caminho do sucesso, e pela amizade que surge nessa trajetória.

Aos professores Daniele Rubert Nogueira Librelotto, Karine De Bona e Guilherme Vargas Bochi pela disponibilidade em compor a banca examinadora desta dissertação. Certamente as opiniões e sugestões serão importantes para o aprimoramento desse trabalho.

Àquelas que, além de colegas de laboratório, se tornaram grandes amigas. Paula e Carolina... Muito obrigada por todo incentivo e apoio, tenho certeza que ter vocês nos meus dias fez tudo ocorrer de maneira mais leve e fácil. Paula, obrigada por tudo, mesmo, de coração, do início ao fim, desde o planejamento e execução dos experimentos, ideias e pensamentos científicos até mesmo o apoio, conselhos, puxões de orelhas e risadas... Carol, obrigada pela disponibilidade de sempre para as coletas de sangue para a realização desse trabalho, afinal, elas foram fundamentais e por toda a ajuda na execução dos experimentos. Acima de tudo, obrigada pela amizade de vocês, vou levar para sempre!

Ao professor Rafael Moresco e alunos pela colaboração e amizade. Muito obrigada!

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas obrigada pela disposição em contribuir para a realização deste trabalho e pelas doações de sangue...muito obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à UFSM pelas oportunidades.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

EXTRATOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels PROTEGEM OS LINFÓCITOS DO DANO OXIDATIVO

AUTORA: Raphaela Maleski Borges
ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Beatriz Moretto

A utilização de plantas medicinais para fins de tratamento/prevenção de doenças é prática comum entre a população, e tem sido associada a um menor risco para o desenvolvimento de diversas patologias. Dentre estas plantas, destaca-se o *Syzygium cumini* (L.) Skeels (*S. Cumini*), popularmente conhecido como jambolão, cujas folhas, sementes e frutos são bastante utilizados devido às suas relevantes atividades farmacológicas, como: hipolipidêmica, antioxidante, hipoglicemiante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Considerando os poucos estudos sobre *S. cumini* em relação a alterações oxidativas em linfócitos e a crescente utilização das plantas medicinais pela população, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e o efeito protetor de extratos aquosos de folhas e sementes de *S. cumini* (LASC, SASc, respectivamente) bem como do ácido gálico (GA) utilizado como padrão positivo em um modelo de estresse oxidativo promovido pelo 2,2 azobis-2 - amidinopropano (AAPH) em linfócitos humanos, *in vitro*. A atividade antioxidante dos extratos e do GA foi avaliada através do poder redutor de ferro (FRAP), atividades scavenging contra 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), óxido nítrico (NO), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), além da atividade thiolperoxidase-like. Os linfócitos obtidos a partir de amostras de sangue de doadores saudáveis foram incubados com LASC e SASc (50, 100 e 500 µg/mL) e GA (100 µM) durante 30 min a 37°C seguidos ou não por incubação com AAPH (1 mM) durante 2 h a 37°C. Após, foram avaliados as atividades enzimáticas, parâmetros de estresse oxidativo e citotoxicidade. Nossos resultados sugerem que, além de LASC e SASc exibirem atividade antioxidante frente aos radicais livres testados, estes extratos também foram capazes de prevenir o aumento da atividade de Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDase), da adenosina deaminase (ADA) e a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) promovidos pelo AAPH. Além disso, LASC, SASc e GA protegeram os grupos proteicos (P-SH) da oxidação, diminuíram a lipoperoxidação, a produção de óxido nítrico (NO) e melhoraram a viabilidade celular nos linfócitos testados. Desta forma, é possível sugerir que LASC e SASc são capazes de atuar sobre o sistema purinérgico e imune, sendo capazes de modular a atividade das enzimas NTPDase, ADA, AChE. Desta forma, os extratos de *S. cumini* demonstraram grande importância na manutenção de níveis de ATP, adenosina (Ado) e acetilcolina (ACh), exibindo uma possível propriedade anti-inflamatória.

Palavras-chave: *S. cumini*. Citotoxicidade. Linfócitos. AAPH. Acetilcolinesterase. NTPDase.

ABSTRACT

EXTRACTS FROM LEAVES AND SEEDS OF *Syzygium cumini* (L.) Skeels PROTECT OXIDATIVE DAMAGE LYMPHOCYTES

AUTHOR: Raphaela Maleski Borges

ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Maria Beatriz Moretto

The use of medicinal plants for the purpose of treatment / prevention of diseases is common practice among the population, and has been associated with a lower risk for the development of several pathologies. Among these plants, *Syzygium cumini* (L.) Skeels (*S. Cumini*) stands out, popularly known as jabolão, whose leaves, seeds and fruits are widely used due to their relevant pharmacological activities such as: hypolipidemic, antioxidant, hypoglycemic, anti-inflammatory and antimicrobial. Considering the few studies on *S. cumini* in relation to oxidative changes in lymphocytes and the increasing use of medicinal plants by the population, the objective of this work was to evaluate the antioxidant activity and the protective effect of aqueous extracts of leaves and seeds of *S. cumini* (LASc, SASc, respectively) as well as gallic acid (GA) used as a positive standard in an oxidative stress model promoted by 2,2-azobis-2-amidinopropane (AAPH) in human lymphocytes in vitro. The antioxidant activity of extracts and GA was evaluated by iron reducing power (FRAP), scavenging activities against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) besides, thiol-peroxidase-like activity. Lymphocytes obtained from blood samples from healthy donors were incubated with LASc and SASc (50, 100 and 500 µg/mL) and GA (100 µM) for 30 min at 37 ° C followed or not by incubation with AAPH (1 mM) for 2 h at 37 ° C. Afterwards, enzymatic activities, oxidative stress parameters and cytotoxicity were evaluated. Our results suggest that, in addition to LASc and SASc exhibit antioxidant activity against the free radicals tested, these extracts were also able to prevent the increased activity of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase), adenosine deaminase (ADA) and inhibition of Acetylcholinesterase activity (AChE) promoted by the AAPH. In addition, LASc, SASc and GA protected the protein (P-SH) groups from oxidation, decreased lipoperoxidation, nitric oxide (NO) production, and improved cell viability in the lymphocytes tested. In this way, it is possible to suggest that LASc and SASc are able to act on the purinergic and immune system, being able to modulate the activity of the enzymes NTPDase, ADA, AChE. In this way, the extracts of *S. cumini* showed great importance in maintaining levels of ATP, adenosine (Ado) and acetylcholine (ACh), exerting a possible anti-inflammatory property.

Keywords: *S. cumini*. Cytotoxicity. Lymphocytes. AAPH. Acetylcholinesterase. NTPDase..

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Árvore de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	17
Figura 2 – Estrutura química básica dos flavonoides.....	20
Figura 3 – Fórmula estrutural do ácido gálico.....	22
Figura 4 – Dano oxidativo em macromoléculas biológicas.....	24
Figura 5 – Estrutura química do AAPH.....	25
Figura 6 – Componentes da sinalização purinérgica.....	29
Figura 7 – Vias de síntese, degradação e recaptção de Ado.....	32
Figura 8 – Degradação de nucleotídeos e nucleosídeos.....	33
Figura 9 – Membros da família das E-NTPDases.....	34
Figura 10 – Estrutura da enzima ADA.....	35
Figura 11 – Estrutura da enzima AChE.....	39

MANUSCRITO

Figure 1 - Antioxidant activities of LAsC, SASc and GA. (a) DPPH assay (b) Hydrogen peroxide scavenging activity (c) Ferric reducing antioxidant power, (d) NO scavenging.....	67
Figure 2 - (a) Thiol peroxidase-like activity of LAsC, SASc and GA in the absence or (b) presence of H ₂ O ₂	68
Figure 3 - Effect of GA, LAsC and SASc in (a) ATP and (b) ADP hydrolysis in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH, <i>in vitro</i>	69
Figure 4 - Effect of GA, LAsC and SASc in (a) ADA activities in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH, <i>in vitro</i> (b) Lymphocytes suspensions after incubation with EHNA.....	70
Figure 5 - In vitro effect of GA, LAsC and SASc on AChE activity in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.....	71
Figure 6 - In vitro effect of LAsC, SASc and GA on TBARS levels in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.....	72
Figure 7 - In vitro effect of LAsC, SASc and GA on P-SH levels in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.....	73
Figure 8 - In vitro effect of LAsC, SASc and GA on NOx production in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.....	74

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Partes de <i>S. cumini</i> e suas atividades farmacológicas.....	17
Tabela 2 - Compostos fitoquímicos identificados no <i>S.cumini</i>	17

MANUSCRITO

Table 1 - In vitro effect of LAsC, SASc and GA on MTT assay in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH	75
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis-2-amidinopropano dicloridrato
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADA	Adenosina deaminase
ADP	Adenosina difosfato
Ado	Adenosina
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BuChE	Butirilcolinesterase
ChAT	Colina-acetiltransferase
DM	Diabetes mellitus
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
E-NTPDase	Família das Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder redutor do ferro
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN γ	Interferon γ
IL-2	Interleucina 2
LASc	Extrato aquoso das sementes de <i>S. cumini</i>
MDA	Malondialdeído
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NOS	Óxido nítrico sintase
NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases(CD, 39)
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO [·]	Peroxila
P-SH	Tióis proteicos
RL	Radicais livres
RO	Alcooxila
ROO	Peroxila
<i>S. cumini</i>	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels
SAH	S-adenosilhomocisteína
SASc	Extrato aquoso das folhas de <i>S. cumini</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
5'NT	Ecto-5'-nucleotidase
5'-AMP	5' monofosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	14
1.2 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL	15
1.2.1 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	16
1.2.1.1 <i>Compostos fitoquímicos presentes no Syzygium cumini (L.) Skeels</i>	18
1.3 COMPOSTOS FITOQUÍMICOS.....	19
1.3.1 Flavonoides	19
1.3.2 Ácidos fenólicos	20
1.4 MODELO DE ESTUDO <i>IN VITRO</i>	22
1.5 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
1.6 LINFÓCITOS E ESTRESSE OXIDATIVO	26
1.7 SISTEMA PURINÉRGICO	27
1.7.1 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	32
1.7.1.1 <i>Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase, E.C 3.6.1.5, CD39)</i> ...	33
1.7.1.2 <i>Adenosina deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4)</i>	35
1.8 SISTEMA COLINÉRGICO.....	37
1.8.1 Acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7).	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MANUSCRITO	41
3.1 Leaves and seeds of <i>Syzygium cumini</i> extracts produce significant attenuation of 2,2 azobis-2-amidinopropane-dihydrochloride-induced toxicity via modulation of ectoenzymes and antioxidant activities	41
4 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	94

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** é feita uma abordagem geral sobre o tema desta Dissertação de Mestrado.

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO** estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO** e representa a íntegra deste estudo.

Por fim, a seção **REFERÊNCIAS** disposta no final desta dissertação refere-se somente às citações do item **INTRODUÇÃO**.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde tempos remotos, o homem tem utilizado os recursos naturais para a sua sobrevivência, especialmente, os vegetais, seja para uso nutricional ou medicinal. Registros datados de 2000 a.C são considerados os mais antigos, que demonstraram a utilização das plantas para fins medicinais já pelas primeiras civilizações (BOTSARIS, 1995) e que, por séculos, representou a base da terapêutica medicamentosa para o homem. No século XIX, além da importância na medicina tradicional, as plantas, com o desenvolvimento da química, passaram a constituir a primeira fonte de substâncias necessárias para a produção de medicamentos alopáticos pela indústria farmacêutica (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; ZARONI et al., 2004; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Atualmente, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). No caso de certas classes de medicamentos, como os antitumorais e antimicrobianos esses valores podem chegar a 60% (OMS, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) apesar de toda a evolução da indústria farmacêutica no desenvolvimento de inovações terapêuticas, nos países em desenvolvimento cerca de 60-85% da população ainda depende da utilização das plantas ou preparações a partir destas para o cuidado primário à sua saúde, seja para prevenir ou combater algum tipo de patologia. Isso pode ser atribuído à dificuldade de acesso aos centros de atendimento hospitalares, obtenção de exames e medicamentos por falta de recursos dessa população, associado ao frequente aumento no custo dos medicamentos sintéticos (VEIGA Jr; PINTO; MACIEL, 2005; OMS, 2011).

Esses motivos, aliados à fácil obtenção, grande tradição do uso popular das plantas medicinais, bem como, os efeitos colaterais apresentados por alguns medicamentos, contribuem para o crescente interesse na fitoterapia (PARENTE; ROSA, 2001). Sendo que, muitas vezes a utilização das plantas medicinais advém apenas do conhecimento popular empírico passado entre gerações (AGRA et al., 2008). Assim, para obter um melhor aproveitamento das potencialidades dessa

utilização, a comunidade científica tem se interessado cada vez mais por pesquisas envolvendo plantas medicinais, com a finalidade de aumentar as informações etnobotânicas, terapêuticas, de segurança e eficácia dessas plantas (HEINRICH, 2000). A forma de uso, a frequência e a quantidade são aspectos muito importantes para sua utilização. Além disso, para ter um aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta é exigido o preparo correto. Para cada parte vegetal a ser usada, para cada princípio ativo a ser extraído ou doença a ser tratada, existe forma de preparo e uso mais adequados (ARNOUS et al., 2005).

1.2 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

No Brasil, os primeiros relatos acerca do uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica foram realizados por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil em 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Quando os primeiros médicos portugueses chegaram ao Brasil, ao observarem a escassez de remédios, perceberam a importância da utilização das plantas medicinais como medicamento pelos indígenas (VEIGA Jr, 2002). Portanto, o conhecimento das propriedades de plantas medicinais é uma das maiores riquezas deixadas pela cultura indígena (GASPAR, 2008).

Desde então, as espécies utilizadas na cultura popular têm sido objeto de estudo e se tornado uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas na busca por alívio e tratamento de doenças. Atualmente, associado ao desejo de adotar um estilo de vida “natural”, a facilidade de obtenção e ao baixo custo de produção tem levado à utilização crescente de novas formas de terapia. Neste contexto, em 2005, o Brasil através do Sistema Único de Saúde (SUS), propôs a inclusão das plantas medicinais e da fitoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde, contanto que esses produtos a base de plantas atendessem a legislação vigente (BRASIL, 2006).

A partir disso, foi implantada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com a finalidade de contribuir no desenvolvimento de toda a cadeia produtiva relacionada à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Além da função de guiar estudos e pesquisas que possam auxiliar na elaboração da Relação

Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (RENAFITO), e também. desenvolvimento e inovação na área de pesquisa com plantas medicinais e fitoterápicos (CARVALHO, 2008).

No ano de 2012, o Ministério da Saúde lançou o Caderno de Atenção Básica intitulado por: “Plantas medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica”, nele constam informações sobre o histórico das políticas nacionais e informações sobre normas, serviços e produtos relacionados à fitoterapia na Estratégia Saúde da Família/Atenção Básica. O mesmo busca estruturar e fortalecer a atenção em fitoterapia, com ênfase na Atenção Básica/Saúde da Família (BRASIL, 2012).

Desta forma, nota-se que o Ministério da Saúde tem incentivado constantemente o desenvolvimento de estudos envolvendo plantas medicinais tradicionais bem como a utilização destas. Segundo dados divulgados por esse órgão, no ano de 2013, 6 mil pessoas buscavam por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo SUS, já no ano de 2015, esse número passou para 16 mil pessoas, o que demonstra que os índices de interesse pela fitoterapia mais que dobrou: o crescimento foi de 161% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.2.1 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Syzygium cumini (L.) Skeels (*S. cumini*) (sinônimos: *Eugenia jambolana*, *Syzygium jambolanum*, *Eugenia cumini*) pertence à família Myrtaceae. É uma árvore de grande porte (Figura 1) com aproximadamente 15 metros de altura originária da Índia, popularmente conhecida como jambolão, jamelão, jambu, jambul, azeitona-do-nordeste, ameixa-roxa, murta, baga-de-freira, guapê, jambuí e azeitona-da-terra, dentre outros nomes. Pode ser encontrada em várias regiões do Brasil, inclusive no Rio Grande do Sul e cresce muito bem em vários tipos de solos, nas planícies litorâneas, nas serras e nos planaltos (BRAGANÇA, 1996; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

O *S. cumini* é conhecido por suas diversas atividades farmacológicas já apresentadas, como hipoglicemiante, antioxidante, hipolipidêmica, antiúlcera, hepatoprotetor, antialérgica, anti-inflamatória, antiartrítico, antibacteriana. Tem sido demonstrado que extratos das diferentes partes da planta são utilizados para esses fins medicinais, justificando a grande tradição na medicina popular (BRITO et al.,

2007; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; SIANI et al., 2013) conforme demonstrado na Tabela 1.

Figura 1 – Árvore de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



Fonte: Adaptado de Vizzoto; Pereira, 2008.

Tabela 1- Partes de *S. cumini* e suas atividades farmacológicas

Partes da planta	Atividades farmacológicas	Referências
Frutos	Atividade antioxidante, efeito anticarcinogênico, antimutagênico e atividade hipoglicemiante	Reynertson et al., 2008, Aqil et al., 2012.
Folhas	Propriedades protetoras em pacientes diabéticos e hiperglicêmicos <i>in vitro</i> , ação hipoglicemiante, atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante	Pepato et al., 2001; Teixeira; Fuchs 2006; Bopp et al., 2009; De Bona et al., 2010, 2011, 2014; Mohamed; Ali; El-baz, 2013;; Srivastava; Chandra, 2013; Siani et al, 2013; Saxena; Sharma, 2013.
Flores	Atividades antibióticas	Miglitato et al., 2006.
Casca do caule	Ação anti-inflamatória	Muruganandan et al., 2001.
Semente	Ação hipoglicemiante, anti-inflamatória antibacteriana, diurética	Kumar et al., 2009; Baliga, 2011.

O fruto, a casca, a semente e a folha são frequentemente utilizados na medicina popular e são preparados na forma de infusões, decocções, macerações, sucos e extratos (PEPATO, 2001). Sendo que a forma mais comum de consumo

pela população é uma decocção ou infusão preparada com as folhas em água (2,5g de folhas secas/L aproximadamente, com variações) em substituição ao consumo de água (TEIXEIRA et al., 1992). Por este motivo, para trabalhos científicos, a escolha da utilização de extratos aquosos pode ser justificada pelo fato de ser uma fração de extrato isenta de resíduos/solventes químicos provenientes de extração, além de se aproximar mais das formas comumente utilizadas pela população.

1.2.1.1 Compostos fitoquímicos presentes no *Syzygium cumini* (L.) Skeels

O *S. cumini* possui uma rica composição em ácidos fenólicos e flavonoides nas diferentes partes da planta, que é frequentemente relacionada aos seus efeitos benéficos à saúde (SAGRAWAT; MANN; KHARYA, 2006) (Tabela 2) que são relatados na literatura, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* (DE BONA et al., 2011; ISLAM; PARVIN; ISLAM, 2012).

Tabela 2- Compostos fitoquímicos identificados no *S.cumini*

Partes da planta	Constituintes fitoquímicos identificados	Referências
Frutos	Ácido málico com traços de ácido oxálico, ácido gálico, taninos, cianidina	Ramya et al., 2012
Folhas	Ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico ácido ferúlico), flavonoides (quercetina, canferol, rutina, isoquercitrina)	Mahmoud, 2001; Williamson et al., 2002; Cargnelutti et al., 2015; De Bona et al., 2015.
Flores	Canferol, flavonoides (miricetina, isoquercetina, quercetina) Ácidos fenólicos (ácido elágico), eugenol, ácido oleanólico.	Baliga et al., 2011; Ramya et al., 2012
Casca do Caule	β -sitosterol eugenina, flavonoides (quercetina, Miricetina, canferol), terpenos (ácido betulínico) ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico), astragalina.	Timbola et al., 2002; Baliga et al., 2011; Ramya et al., 2012.
Semente	β -sitosterol, taninos, ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico e ácido ferúlico), flavonoides (rutina, quercetina), monoterpénoides	Williamson et al., 2002; Kapoor, 2001; Sharma, 2008; Karthic, et al., 2008.

1.3 COMPOSTOS FITOQUÍMICOS

Os compostos fitoquímicos são compostos bioativos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, os quais estão envolvidos em diversas funções: propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), crescimento, processos germinativos e defesa contra insetos, entre outras. Além disso, em animais e humanos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos. Englobam carotenoides (β e α -caroteno, licopeno, etc); alcalóides; compostos azotados; compostos organosulfurados e compostos fenólicos. Dentre esses, os compostos fenólicos são os mais amplamente distribuídos no reino vegetal, que ainda, são subdivididos em: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e cumarinas (FERREIRA; ABREU, 2007).

Os compostos polifenóis têm despertado o interesse de estudo por serem responsáveis por diversas atividades biológicas (NETO; LOPES, 2007), sobretudo por apresentarem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outras, que são relacionadas ao seu poder redutor e à sua estrutura química. Esses compostos podem reagir com os radicais livres (RL), neutralizando-os ou sequestrando-os, inibindo a cadeia de iniciação ou interrompendo a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas por estes (PODSEDEK, 2007).

Acredita-se que, além do consumo de frutas e verduras, a suplementação da dieta com plantas medicinais que contenham altas concentrações desses compostos medicinais capazes de neutralizar os RL sejam de grande efeito, uma vez que o estresse oxidativo provocado pelo excesso dessas substâncias está relacionado à patogênese de diversas doenças (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005).

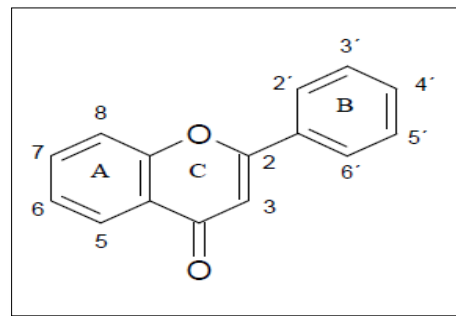
1.3.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química, sendo conhecidos mais de 6000 tipos de flavonoides (MARCHAND, 2002). Podem ser encontrados em frutas, vegetais, grãos, flores, chás e vinhos (NIJVELDT, 2001). Os flavonoides são descritos como potentes antioxidantes devido às suas propriedades seqüestradoras de RL, quelantes de íons metálicos que previnem a formação de radicais livres e ativadores de enzimas antioxidantes de fase 2 como GSH S-transferases (glutathiona peroxidase – GPx)

protegendo os tecidos e as células da ação dos RL e da lipoperoxidação. Além disso, esses compostos já apresentaram atividades: anti-inflamatória, antialérgica, anticarcinogênica (ZUANAZZI, 2002). Dentre eles, destacam-se a rutina e a quercetina.

As propriedades medicinais dos flavonoides estão relacionadas à estrutura química fenólica variável caracterizada pela presença das hidroxilas ligadas aos seus anéis aromáticos que conferem atividade antioxidante à molécula (Figura 2) (COOK; SAMMAN, 1996; ANGHILERI; THOUVENOT, 2000).

Figura 2- Estrutura química básica dos flavonoides



Fonte: Adaptado de Simões, 2004.

Embora os flavonoides apresentem propriedades antioxidantes importantes na prevenção de doenças, alguns estudos têm demonstrado uma atividade pró-oxidante *in vitro*, sugerindo que as mesmas características estruturais que aumentam a capacidade antioxidante, ou seja, os grupamentos hidroxilas, podem também exacerbar o estresse oxidativo. Hanasaki e colaboradores (1994) relataram que uma série de mono e dihidroxiflavonoides não apresentaram atividade pró-oxidantes, enquanto moléculas com vários grupamentos hidroxilas, especialmente no anel B, aumentaram significativamente a produção de radical hidroxila num sistema de Fenton. Esse comportamento indica que, em certas condições, eles podem oferecer mais riscos oxidativos do que benefícios antioxidantes (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; UEDA et al., 2002).

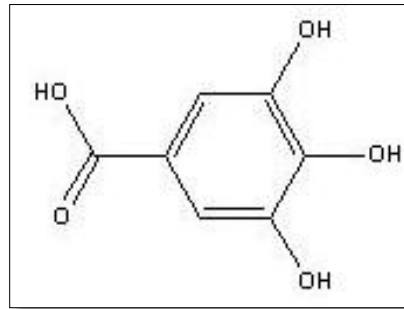
1.3.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico, presentes em sementes, frutas e legumes, dentre os quais se destacam o ácido cafeico e o ácido clorogênico ambos com conhecidas atividades farmacológicas (GONTHIER et al., 2006) e os derivados do ácido hidroxibenzóico que são compostos que possuem um anel benzeno, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo, principalmente, propriedade antioxidante, que é determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula (RAJALAKSMI; NARASIMHAN, 1995). Podem funcionar também como sequestradores de RL, e algumas vezes como quelantes de metais (TOVANI BENZAQUEM, 2009).

Dentre esse último grupo de compostos, destaca-se o ácido gálico (Figura 3), um ácido fenólico de ocorrência natural, amplamente presente no reino vegetal, inclusive nos extratos de diferentes partes de *S. cumini* (CARGNELUTTI et al., 2015; BITENCOURT et al., 2015) Esse fitoquímico é responsável por atividades antioxidantes importantes (PADMA et al., 2011), atividade anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana (CHUYSINUAN et al., 2009; ISUZUGAWA et al., 2001; LU et al., 2006).

Estudos utilizando extratos de plantas contendo ácido gálico na composição apresentaram efeitos antioxidantes, antidiabéticos e também foram capazes de reduzir a incidência de infarto agudo do miocárdio, assim como minimizar os danos oxidativos nos rins e fígado de ratos (JADON et al., 2007; KIM, 2007; PRINCE et al., 2011). O ácido gálico também exerceu efeito protetor sobre o cérebro de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, por modular a atividade de enzimas de sinalização dependentes de equilíbrio redox como bomba Na⁺/K⁺ ATPase, enzimas purinérgicas e acetilcolinesterase (AChE), atenuando o estresse oxidativo (KADE; ROCHA, 2013). Além disso, o ácido gálico apresentou seletiva citotoxicidade *in vitro* contra uma variedade de tumores celulares (OHNO et al., 1999; YOSHIOKA et al., 2000).

Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido gálico



Fonte: Adaptado de Simões, 2004.

1.4 MODELO DE ESTUDO *IN VITRO*

Os testes *in vitro*, especialmente, os métodos utilizando células são utilizados por diversas áreas das ciências em estudos científicos para identificação e monitorização dos efeitos tóxicos de compostos e pode ser utilizado como um preditor na definição de mecanismos e impactos causados por essas substâncias, antes da possibilidade de transpor para estudos *in vivo* (KURODA et al., 1992; HARBELL et al., 1997; RISS; MORAVEC; NILES, 2011).

1.5 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies radicalares conhecidas como RL são átomos ou moléculas que apresentam em sua órbita mais externa, um ou mais elétrons desemparelhados que transformam as estruturas em compostos altamente reativos, tornando-os capazes de reagir com qualquer substância próxima a sua órbita mais externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (SLATER, 1984; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Quando esses elétrons desemparelhados encontram-se centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados, respectivamente, espécies reativas de oxigênio (EROS) ou espécies reativas de nitrogênio, (ERNs) (VISIOLI; KEANEY; HALLIWELL, 2000; PIETTA, 2000). As principais EROS dividem-se em dois grupos, as radicalares: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}); e as não-radicalares: oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entre outras. Dentre as ERNs, incluem-se peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nítrico (NO), etc (DRÖGE et al., 2002).

O NO, um RL gasoso bastante reativo, é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) através da oxidação da L-arginina na presença de oxigênio. São três as principais isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), com diferentes expressões e atividades (ESTÉVEZ; JORDÁN, 2002; LEONG; RUAN; ZHANG., 2002). Além de essa molécula estar relacionada com alterações oxidativas, também está associada à inflamação aguda e crônica (MacMICKING; XIE; NATHAN, 1997; SENA; PEREIRA; SEICA, 2013), podendo ser considerada uma importante molécula reguladora do sistema imune, pelo fato de que a iNOS pode ser liberada em quantidades significativas por macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa, linfócitos e por outras células do sistema imune após estímulos causados por bactérias ou por citocinas pró-inflamatórias. Evidências propõem um papel essencial do NO diretamente na função de células imunes como os linfócitos, podendo atuar como um modulador bifuncional capaz de estimular ou inibir a apoptose (YOON et al., 2002; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

A produção de radicais livres ocorre de maneira contínua e fisiológica, cumprindo papéis fundamentais para o organismo, como na respiração e fagocitose. Os RL, formados durante as reações de oxi-redução, podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados ou podem receber o elétron e serem reduzidos. Essas reações podem ocorrer no citoplasma, mitocôndria ou na membrana celular e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e molécula de DNA) está relacionado ao seu local de formação (MANACH, 2004). Sendo que a mitocôndria constitui a principal fonte de formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, já que durante o processo de obtenção de energia, ocorrem liberações sucessivas de espécies reativas, tais como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e radical OH^{\bullet} . Outra liberação endógena de espécies reativas é a fagocitose, processo no qual os fagócitos ao destruírem uma célula infectada por bactérias ou vírus acabam liberando oxidantes como: NO, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , constituindo a defesa imune primária (VALKO, 2006).

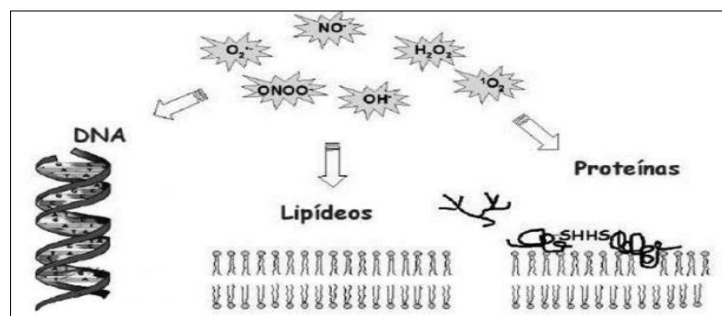
Porém, em algumas condições patológicas, como nos processos inflamatórios crônicos, a produção de EROS pode aumentar substancialmente, resultando em estresse oxidativo (SCHMATZ, 2011). Uma característica comum nesses processos é o recrutamento e ativação de células efectoras, tais como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, células epiteliais e linfócitos, que liberam mediadores capazes de promover uma inflamação adicional (THANNICKAL et al., 2004).

A concentração dos RL é mantida pelo balanço entre sua produção e sua depuração por antioxidantes (DRODGE, 2002). Sendo que, quando há um aumento nos níveis de oxidantes associado à diminuição nos níveis de antioxidantes desenvolve-se o estresse oxidativo, que pode causar redução na resistência celular e consequente dano oxidativo às biomoléculas e seus componentes como: proteínas, lipídeos e à molécula de DNA (Figura 4), levando à mudanças nas funções biológicas e, por vezes à injúria celular (POLI et al., 2004).

O dano aos lipídeos induz o processo de lipoperoxidação que acontece quando os RL gerados decorrentes do estresse oxidativo reagem com os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, resultando em modificações na permeabilidade, perda da seletividade (SLATER, 1984; VALKO et al., 2006) e liberação do conteúdo de organelas. Um dos mais conhecidos produtos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA), que é o produto final de degradação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005; CHERUBINI et al., 2005) e seus altos níveis apresentam um papel fundamental na patogênese de diversas doenças (KASHYAP et al., 2005).

O estresse oxidativo tem sido relacionado na fisiopatologia de várias doenças incluindo as crônicas, como: o *Diabetes mellitus* (DM), doenças cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio e aterosclerose), câncer, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer) e doenças inflamatórias (artrite reumatoide) além do processo de envelhecimento (KOVACIC; JACINTHO, 2001; VALKO et al., 2006). Sendo que, nas últimas décadas, as doenças crônicas passaram a liderar as causas de óbitos no Brasil, e representam cerca de 66% das enfermidades (MACHADO et al., 2006).

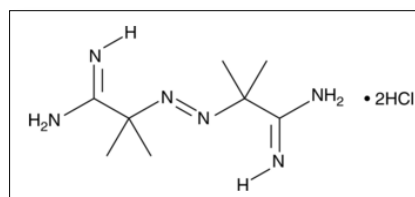
Figura 4 - Dano oxidativo em macromoléculas biológicas



Fonte: Adaptado de Torres, 2003.

Sabe-se que boa parte dos danos oxidativos em sistemas biológicos são causados por radicais peroxila que facilmente penetram nas membranas celulares e possuem um tempo de meia-vida maior em relação aos radicais hidroxilas (ARUOMA,1999; HU; KITTS, 2001). Os radicais peroxila são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio. Nesse contexto, para a produção de radicais peroxila, alguns estudos têm utilizado o 2,2' azobis (2-amidinopropano dihidrocloro , AAPH) (Figura 5), um azo composto hidrossolúvel dependente de temperatura (37°C), gerador de radicais peroxila a taxa constante ($1,36 \times 10^{-6}$ AAPH mol/litro/segundo) durante as primeiras horas em solução, apresentando meia-vida de 175 horas em pH neutro (NIKI, 1990). Durante as três primeiras horas do processo de decomposição, tem-se uma redução da concentração do AAPH inferior a 3% por hora (STEFEEK et al., 2005), gerando assim produtos estáveis. Além disso, é uma substância que induz a oxidação das células de forma mais semelhante aos eventos fisiológicos do organismo (KRISKO; KVEDER; PIFAT, 2005).

Figura 5. Estrutura química do AAPH



Fonte: Adaptado de Niki, 1990.

O excesso de RL no organismo pode ser combatido por um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes produzidas pelo organismo (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase (GPx) que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização dos radicais livres (VALKO et al., 2006). Os antioxidantes não-enzimáticos podem ser de origem endógena ou exógena. Dentre os compostos

sintetizados de maneira endógena, destacam-se a glutathiona reduzida (GSH), tioredoxinas, ácido úrico, bilirrubina e a ubiquinona. Dentre os compostos obtidos de maneira exógena destacam-se as vitaminas C, E, β -caroteno e compostos fenólicos (VASCONCELOS et al., 2007). A GSH, presente na maioria das células, pode estar livre ou ligada às proteínas, sendo o grupamento tiol (-SH) abundante no meio intracelular. O -SH reativo de sua cisteína determina sua capacidade redutora, também encontrado em proteínas (tióis proteicos – PSH), demonstrando importante papel contra a geração de estresse oxidativo pela direta detoxificação das EROS, participando como cofator para outras enzimas antioxidantes como a GPx (ARTEEL; SIES, 2001).

1.6 LINFÓCITOS E ESTRESSE OXIDATIVO

O funcionamento normal do sistema imune é imprescindível para a saúde devido à proteção que exerce frente às doenças. As células imunocompetentes mais relevantes nesse contexto são os linfócitos, por auxiliarem os fagócitos na defesa, na inativação e retirada de agentes invasores do organismo, além de representarem grande importância para as respostas imune e inflamatória devido à capacidade de gerar especificidade antigênica e memória imunológica, além de desempenharem um papel importante no equilíbrio pró-oxidante e antioxidante da atividade dessas células (LORENZI, 2003; GAUTAM et al., 2010).

Quanto à morfologia, os linfócitos são células simples, desprovidas de granulações citoplasmáticas. Podem ser encontrados na corrente sanguínea em percentagem dependente das condições fisiológicas (idade, sexo) ou patológicas (estímulos antigênicos, proliferações benígnas e malignas). Os linfócitos não são formados exclusivamente na medula óssea como as demais células sanguíneas, podem ser encontrados também nos tecidos linfoides (gânglios linfáticos, amígdalas, adenoides, timo, baço, placas de Peyer) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Eles correspondem a 30% dos leucócitos e dividem-se em duas categorias: os linfócitos B que são responsáveis pela resposta imune humoral e produção de anticorpos e os linfócitos T que correspondem a 60-80% dos linfócitos sanguíneos e que são responsáveis pela imunidade celular (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

Os linfócitos são células bastante sensíveis às alterações provocadas pelas EROS, o que pode levar à mudança no estado redox, tornando-as mais sensíveis a

agentes oxidantes, assim apresentando danos maiores do que em outras células como neutrófilos e monócitos (SEAGER et al., 2012). Um acúmulo de RL no meio intracelular pode contribuir para a perda da função celular (HU; KWOK; KITTS, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que a formação intracelular de EROS nos linfócitos é essencial para a função adequada dos linfócitos T e B (GELDERMAN et al., 2006, GHEZZI; BONETTO; FRATELLI, 2005; HULTQVIST et al., 2009), pois essa formação parece regular a proliferação, ativação e secreção de citocinas pelos linfócitos-T (COPE, 2002). O balanço entre a imunidade e a tolerância é importante para manter a homeostase. No entanto, quando há uma formação excessiva de EROS ocorre uma desregulação da homeostase nessas células imunes que pode resultar em alterações severas nas funções imunes, aumentando a suscetibilidade à infecções e ao câncer, bem como favorecendo o desenvolvimento de doenças crônicas e auto-imunes. Isso por ser atribuído ao fato que as EROS podem atacar os componentes da célula levando a danos celulares, funções inadequadas, e também limitando a sua viabilidade celular (PEREZ DE CASTO et al., 2004; GALBIATI; MITJANS; CORSINI, 2010).

Os estudos ainda são restritos quanto à exposição dos linfócitos ao AAPH na geração de radicais livres, por isso nosso grupo de pesquisa tem investido nessa linha de pesquisa. Após a exposição dos linfócitos a diferentes substâncias, sejam provenientes de fontes naturais ou sintéticas ou ainda de compostos geradores de radicais livres, podem ser realizados testes *in vitro* para determinar a sua viabilidade celular. Um desses ensaios muito utilizados com essa finalidade é o teste de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) que emprega corantes vitais. O método baseia-se no fato de que o MTT é um sal tetrazólico solúvel em água que é convertido a cristais de formazan insolúveis de cor roxa através da clivagem do anel tetrazólico pela enzima succinato desidrogenase no interior da mitocôndria. A quantidade de formazan formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

1.7 SISTEMA PURINÉRGICO

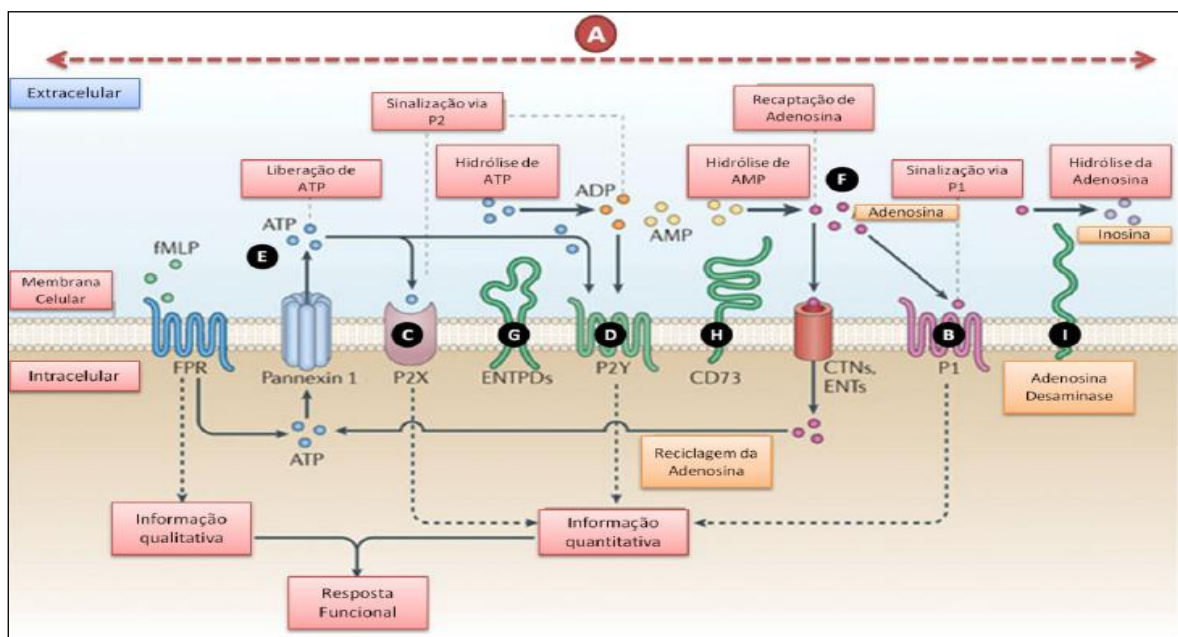
O sistema purinérgico constitui uma importante via de sinalização para diversos processos biológicos (BURNSTOCK, 2006). Três componentes principais fazem parte desse sistema: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina, receptores através dos quais eles exercem seus efeitos e as ectoenzimas responsáveis pela regulação dos níveis extracelulares dessas moléculas (YEGUTKIN, 2008) (Figura 6). Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina (Ado) são considerados importantes moléculas sinalizadoras devido ao seu papel na modulação de muitos processos biológicos, incluindo muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, respostas imunes e inflamatórias, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006; 2007).

Em condições fisiológicas, os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina estão presentes no meio extracelular em baixas concentrações, normalmente em quantidades nanomolares de acordo com diversos fatores como: a quantidade liberada, situações de lise celular, mecanismos de recaptção, efeito da diluição no espaço extracelular e a presença de enzimas como as ectonucleotidases (RATHBONE et al., 1999; MALMSJO; EDVINSSON; ERLINGUE, 2000). No entanto, em condições patológicas, inclusive em condições de estresse oxidativo, podem ocorrer distúrbios no metabolismo celular, havendo alterações nas concentrações extracelulares dessas moléculas que podem chegar a quantidades micromolares (SCHMATZ et al., 2013; CASTILHOS et al., 2015). Os efeitos dessas moléculas são mediados através de receptores purinérgicos localizados na superfície celular (ILLES; RIBEIRO, 2004; SCHETINGER et al., 2007).

Os receptores purinérgicos foram definidos pela primeira vez em 1976 (BURNSTOCK, 1976) e, dois anos depois, foi proposta a base para a distinção de dois tipos de receptores, identificados como P1 (para a Ado) e P2 (para ATP/ADP). Esses receptores podem ser ativados pela ligação dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina permitindo a essas moléculas o exercício de seus efeitos. Os receptores P1 ativados por Ado são metabotrópicos, isto é receptores ligados à proteína G, sendo, que quatro diferentes subtipos foram clonados e caracterizados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, membros da superfamília de receptores ligados e estão presentes em várias espécies animais e em vários tecidos distribuídos de maneira bastante irregular (FREDHOLM et al., 2011). Os receptores A₁ e A_{2A} são ativados por concentrações

de Ado na faixa de nanomolar, enquanto os subtipos A_{2B} e A_3 tornam-se ativos somente quando os níveis extracelulares de Ado se elevam na faixa de micromolar, como durante períodos de inflamação, hipóxia ou isquemia (OLAH; STILES, 1995; BARALDI; BOREA, 2000).

Figura 6- Componentes da sinalização purinérgica (A) Receptor do tipo P1 (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D); ATP liberado extracelularmente (E); Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD 73 (F); E-NTPDase (ou CD39) (G); 5' nucleotidase (ou CD 73) (H); e ADA (I).



Fonte: Adaptada de JUNGER, 2011.

Os purinoreceptores P2 são ativados por ATP e divididos em dois grupos bem distintos: os receptores ionotrópicos P2X, que são canais iônicos com seus domínios carboxi e aminoterminal voltados para o meio intracelular e compreendem sete subtipos nomeados de P2X1-7 (DI VIRGILIO et al., 2001), e os receptores metabotrópicos P2Y, que são acoplados à proteína G, apresentando sete regiões transmembrana com a porção aminoterminal voltada para meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático compreendendo 14 subtipos os quais foram nomeados de P2Y1-14 (YEGUTKIN, 2008). A sinalização purinérgica é finalizada, então, pela ação de ectoenzimas que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos, no meio extracelular de modo a manter seus níveis em concentrações fisiológicas (ZIMMERMANN, 2001).

Os nucleotídeos, especialmente as moléculas de ATP, atuam como sinalizadoras de dano celular, desencadeando uma resposta do sistema imune (ZHANG; MOSSER, 2008). Estudos revelam que o ATP está envolvido em diversas funções no sistema imune: nos linfócitos T, a liberação de ATP através dos canais de panexina-1 é capaz de mediar a resposta imune atuando como um agente pró-inflamatório, por estimular a proliferação de linfócitos e potencializar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2 e o IFN- γ (LANGSTON et al., 2003; BOURS et al., 2006); nos monócitos circulantes, o ATP está envolvido no recrutamento destes para os tecidos-alvo (VENTURA; THOMOPOULOS, 1995); nas células dendríticas, o ATP induz migração e diferenciação (LA SALA et al., 2003); nos macrófagos, estimula a produção de IL-1 β (ELSSNER et al., 2004) e do fator de necrose tumoral α (TNF α) (GUERRA et al., 2003).

A função sinalizadora do ATP extracelular está intimamente ligada à Ado, o produto final de sua hidrólise, sendo que a concentração de ATP extracelular é regulada pela enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (EC 3.6.1.5, E-NTPDase, CD 39). Curiosamente, dependendo das concentrações extracelulares, tipo de receptor e local de ação envolvido, o ATP é capaz de induzir dois efeitos antagônicos: ação anti-inflamatória, controlando a proliferação de células T, quando em baixas concentrações, e ação pró-inflamatória, quando em altas concentrações, com a formação de grandes poros na membrana plasmática, podendo levar a morte celular via necrose ou apoptose (ADINOLFI et al., 2005; DI VIRGILIO, 2005; BOEYNAEMS; COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO et al., 2009). Quando o ATP está em baixas concentrações extracelulares, aumenta a sua afinidade por receptores do tipo P2Y, localizados na superfície dos linfócitos, que, quando estimulados promovem uma “*downregulation*” e levam à liberação de citocinas anti-inflamatórias, promovendo um efeito protetor contra injúrias teciduais excessivas (BOURS et al., 2006). Desta forma, é indispensável a modulação dessa via purinérgica para controlar a resposta inflamatória frente às diversas patologias.

Embora o papel do ATP sobre os linfócitos, durante os processos de inflamação, esteja em parte elucidado, as funções do ADP não estão perfeitamente esclarecidas (LUTHJE, 1989), muito embora este nucleotídeo seja o principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular, enquanto que a Ado possui efeitos inibitórios sobre esta agregação (MARCUS et al., 2003; ROZALSKI et al., 2005). Além dessa ação antitrombótica, a

Ado é uma molécula que desempenha papel no sistema nervoso central como na neuromodulação da transmissão sináptica por regular a liberação de vários neurotransmissores, agindo tanto pré quanto pós-sinápticamente e na neuroproteção por limitar o dano causado pela excitotoxicidade desses neurotransmissores (PURVES et al., 2005; FREDHOLM et al., 2007).

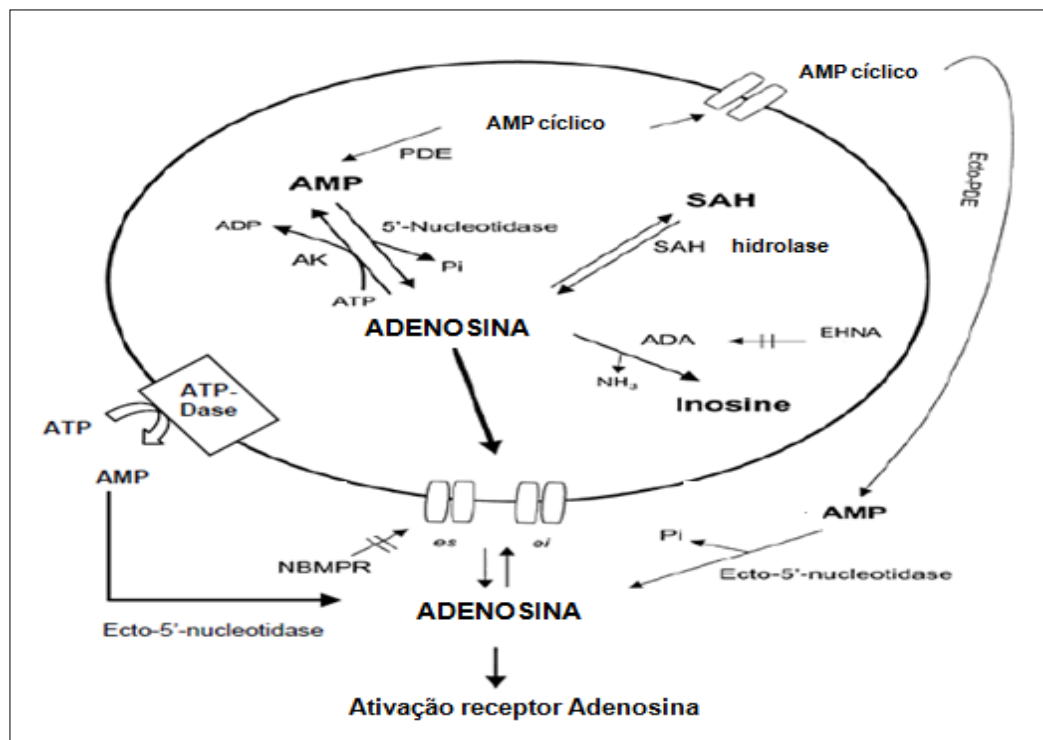
Além desse papel neurotransmissor e neuromodulador, têm surgido evidências relacionando funções da Ado no sistema vascular e imunológico, como uma molécula sinalizadora de dano celular, mediando ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, tais como: inibição da adesão de linfócitos a respostas inflamatórias, inibição da proliferação de linfócitos e da produção de citocinas pró-inflamatórias e, além de atuar como um regulador endógeno da imunidade inata e em lesão tecidual excessiva associada à inflamação (RATHBONE et al., 1999; ODASHIMA et al., 2005; BOURS et al., 2006, DESROSIERS et al, 2007; GESSI et al., 2007; HASKÓ et al., 2009). Em condições fisiológicas, a Ado, presente no espaço extracelular em baixas concentrações na faixa nanomolar, ativa os receptores A_1 e A_2A , uma vez que ela é continuamente formada tanto intracelularmente quanto extracelularmente (FREDHOLM, 2007). Entretanto, em condições patológicas, de estresse metabólico, como em períodos de inflamação, hipóxia ou isquemia, seus níveis extracelulares aumentam expressivamente para faixa de quantidades micromolares, resultando na ativação de receptores A_2B e A_3 (OLAH; STILES, 1995; BARALDI; BOREA, 2000), através desse aumento local da sua concentração, a Ado age como um freio natural de funções celulares imunológicas, limitando assim as respostas inflamatórias exacerbadas a esses insultos (GESSI et al., 2008).

Os níveis atingidos pela adenosina na biofase de seus receptores são regulados por mecanismos dinâmicos, como biossíntese intracelular e extracelular, transporte e metabolismo (ANTONIOLI et al., 2008). Sendo que, a fonte mais importante para o aumento dos níveis de Ado extracelular durante as situações de estresse metabólico é a liberação de ATP intracelular, seguido do catabolismo extracelular desse nucleotídeo, até a geração de Ado por ação das ectonucleotidases (HASKÓ; PACHER, 2008).

A regulação dos níveis de Ado ocorre através do seu transporte bi-direcional (Figura 7). A principal via de produção de Ado no meio extracelular é através da atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase (5'NT) que converte adenosina 5'-

monofosfato (5'-AMP) em Ado. Já no meio intracelular, a adenosina pode ser formada através da quebra de 5'-AMP pela 5'NT. Outra via de formação intracelular de Ado é a hidrólise de S-adenosilhomocisteína (SAH) pela ação da enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (LLOYD et al., 1988; PAK et al., 1994). Entretanto, essa via não possui uma grande importância na produção deste nucleosídeo (PAK et al., 1994). Finalmente, a Ado pode ser transformada em AMP pela adenosina kinase ou metabolizada em inosina através da ação da adenosina deaminase (LATINI; PEDATA, 2001).

Figura 7 - Vias de síntese, degradação e recaptção de Ado.



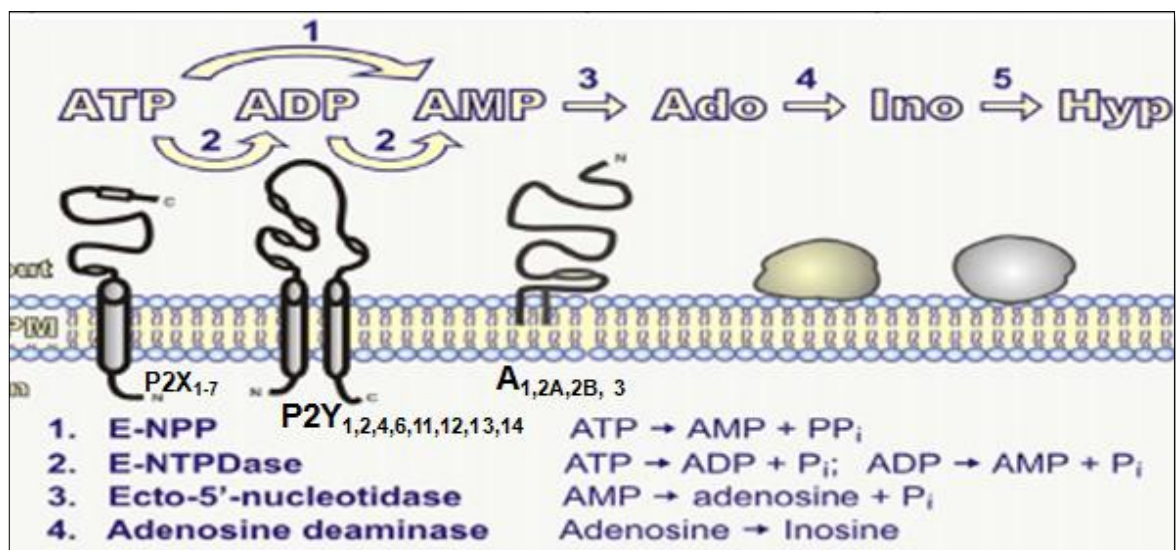
Fonte: Adaptado de LATINI; PEDATA, 2001.

1.7.1 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

As concentrações dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares são reguladas pela ação de enzimas ancoradas à membrana celular, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas enzimas hidrolisam as moléculas extracelulares e dentre elas estão: as E-NTPDases, que catalisam a hidrólise dos nucleotídeos tri e/ou difosfatados ATP em ADP e ADP a AMP, na presença de

cátions divalentes como cálcio e magnésio e controlam a disponibilidade dessas moléculas para se ligarem ao seu receptor e a enzima que degrada os nucleosídeos de adenina é representada pela adenosina deaminase (ADA), que participa da degradação das purinas por catalisar a conversão de adenosina em inosina, seu metabólito inativo (ZIMMERMANN, 1996; BIGONNESSE et al., 2004; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ROSEMBERG et al., 2010) (Figura 8).

Figura 8- Degradação de nucleotídeos e nucleosídeos



X

Fonte: Adaptado de Yegutkin, 2008.

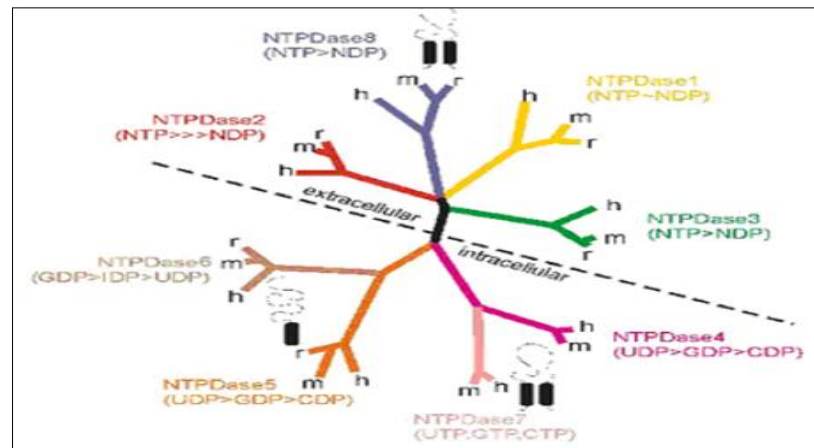
1.7.1.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5, CD39)

As E-NTPDases fazem parte do grupo de enzimas constituído pelas famílias das ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), 5'NT, fosfatases alcalinas (CD73, E.C.3.1.3.5) e ADA sendo denominado ectonucleotidases. As enzimas desse grupo estão ancoradas na membrana celular com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular e controlam a disponibilidade de ligantes para os purinoreceptores (ZIMMERMANN, 2011).

A NTPDase é um membro da família das E-NTPDases, a qual inclui oito membros da família (NTPDase 1 a 8), sendo que cada uma delas difere entre si quanto à especificidade ao substrato, localização celular e distribuição tecidual (BIGONNESSE et al., 2004). Quatro dessas enzimas, as NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na membrana celular com seu sítio catalítico voltado para o meio

extracelular sendo as principais responsáveis pela metabolização dos nucleotídeos no meio extracelular. Já, as outras quatro, NTPDase 4, 5, 6 e 7 estão localizadas no meio intracelular (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006) (Figura 9).

Figura 9- Membros da família das E-NTPDases



Fonte: Adaptado de ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006.

Estudos demonstram que a NTPDase-1 é uma enzima amplamente distribuída, inclusive em plantas, parasitas, insetos e em vários tecidos e células, como por exemplo, em córtex cerebral, linfócitos, células endoteliais e plaquetas (SARKIS et al., 1995; PILLA et al., 1996; WANG; GUIDOTTI, 1998; LEAL et al., 2005) dependendo da localização tecidual essa atividade enzimática possui diferentes papéis fisiológicos (BONAN et al., 2001). Como consequência disso, a atividade da NTPDase têm sido estudada em diferentes patologias e condições experimentais (LEAL et al., 2005, SPANEVELLO et al., 2009; THOME et al., 2012).

Essa enzima é capaz de hidrolisar ATP e ADP, em iguais proporções, e é reconhecida como um marcador da ativação de linfócitos (MALISZEWSKI et al., 1994), desempenhando importante controle na função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras dessas células (FILIPPINI et al., 1990), além da capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KACZMAREK et al., 1996). Portanto, nos processos inflamatórios mediados por linfócitos a regulação da atividade da NTPDase poderia ser usada como marcador de ativação dos mesmos durante a resposta imune (BARANKIEWICZ; DOSCH; COHEN, 1988).

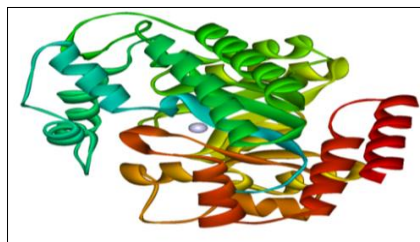
1.7.1.2 Adenosina deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4)

A ADA é uma enzima monomérica (40kDa) composta por 363 resíduos (Figura 12) de aminoácidos e representa a principal via de degradação da Ado, promove a desaminação hidrolítica irreversível de adenosina a inosina e 2'-desoxiadenosina em 2'-desoxinosina, regulando os níveis extracelulares desse nucleosídeo (YEGUTKIN, 2008).

Essa enzima é encontrada no citosol e também pode ser expressa na superfície celular como uma ectoenzima. A ADA está presente em plantas, bactérias, invertebrados, vertebrados e mamíferos (DADDONA, 1981; LUPIDI et al., 1992), sendo que sua distribuição varia entre os tecidos humanos. Apesar de a ADA estar presente em todos os tipos de células, sua atividade é mais alta no timo, tecidos linfoides e em linfócitos periféricos, desempenhando um papel importante no sistema imune, sendo que nos linfócitos está relacionada à ativação dessas células (CHECHIK et al., 1981; IBIS et al., 2007).

A deficiência congênita da ADA no sistema imune está diretamente relacionada com a síndrome da imunodeficiência severa combinada (SIDSC), caracterizada pela ausência de linfócitos T e B funcionais em indivíduos afetados, ocasionando lesões e problemas funcionais de muitos órgãos (MORTELLARO et al., 2006). Os pacientes afetados com essa síndrome clinicamente podem apresentar severas infecções recorrentes, as quais podem ser fatais. Além disso, a ausência da ADA também leva a problemas neurológicos, como déficit cognitivo, audição e deficiência visual (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976).

Figura 10 - Estrutura da enzima ADA



Fonte: Adaptado de KINOSHITA et al., 2005.

Duas isoenzimas distintas da família da ADA são conhecidas: ADA1 e ADA2. ADA1 pode ser encontrada tanto no citosol quanto na membrana celular de todas as células, especialmente em linfócitos e monócitos. Essa isoforma possui duas formas moleculares principais: um monômero e um dímero complexado com proteínas, tendo um alto peso molecular (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005). Além disso, ela desempenha um papel fundamental no sistema imunológico por sua atividade controlar a inibição mediada pela Ado na proliferação de células T (GORRELL; GYSBERS; McCAUGHAN, 2001). Já, a ADA2 existe apenas na forma de um monômero estando presente em menor parte em monócitos, macrófagos e de maneira abundante no soro (VAN DER WEYDEN ; KELLEY, 1976; CRISTALLI et al., 2001).

Os efeitos da ADA na modulação das funções do sistema imune/inflamatório corroboram com a hipótese de que as alterações no metabolismo da adenosina poderiam afetar a atividade das células imunológicas e com o conceito de que a sinalização desse nucleosídeo representa um passo importante no processo de decisão molecular, controlando a inflamação (HASKÓ; CRONSTEIN, 2013).

Estudos do nosso laboratório reportaram a alteração da atividade dessa enzima em diferentes condições, tecidos e células. Em intoxicações por Metilmercúrio foi demonstrado um aumento na atividade da ADA não somente no hipocampo, mas também no fígado e nos rins de ratos recém nascidos (ABDALLA et al., 2011; ABDALLA et al., 2012). Em modelo experimental de intoxicação aguda por etanol observou-se um aumento da atividade da ADA no soro e nos linfócitos do baço de ratos (CARGNELUTTI et al., 2015). O aumento da atividade da ADA também foi investigado na Síndrome Metabólica e em condições de estresse oxidativo em linfócitos (DE BONA et al., 2012; DE BONA et al., 2013; DE BONA et al., 2015).

Especialmente nas patologias em que a etiologia é o estresse oxidativo, inclusive no DM, observa-se um aumento na atividade dessa enzima tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DE BONA et al., 2010; DE BONA et al., 2011; BELLÉ et al., 2011; SCHMATZ et al., 2013; BELLÉ et al., 2014; DE BONA et al., 2014; BITENCOURT et al., 2015). Ainda, o aumento da atividade enzimática da ADA foi verificado em doenças inflamatórias (CONLON; LA, 2004; SCHETINGER et al., 2007). Diante disso, têm se buscado vias de modulação do sistema purinérgico frente a alterações promovidas pelo excesso de RL.

Nesse contexto, o extrato das folhas de *S. cumini* já demonstrou diminuir a atividade da ADA de membranas de eritrócitos de pacientes com DM 2, sugerindo um efeito citoprotetor pelo possível aumento nos níveis de Ado (DE BONA et al., 2010; DE BONA et al., 2011). Enquanto as sementes de *S. cumini* foram capazes de prevenir o aumento da atividade da ADA em rim e soro de ratos submetidos a um modelo de DM, sugerindo que essa planta pode aumentar os níveis de Ado com consequente benefício das ações farmacológicas desse nucleosídeo frente a complicações dessa patologia (BITENCOURT et al., 2015).

1.8 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico é composto por: acetilcolina (ACh), colina-acetiltransferase (ChAT), o transportador de colina (CHT), o transportador de acetilcolina vesicular (vAChT), os receptores muscarínicos e nicotínicos e as colinesterases (SARTER; PARIKH, 2005). Esse sistema desempenha um papel crucial na modulação do sistema nervoso central (SNC) e periférico em diversos processos vitais, como o aprendizado, a memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM et al., 2002). Além disso, há alguns anos surgiu uma nova propriedade para a via colinérgica: a via colinérgica anti-inflamatória na qual tem sido demonstrada uma ampla expressão desse sistema em tecidos não neuronais, como as células do sistema imunológico e sanguíneo (DAS, 2007; ALMEIDA; SALDANHA, 2010). Devido ao fato de essas células possuírem um completo sistema colinérgico não neuronal independente que está envolvido na regulação da função imune (KAWASHIMA; FUJII, 2003).

A ACh, um neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras, tem sido encontrada também na circulação sanguínea devido a sua produção pelos linfócitos T e endotélio vascular (WESSLER et al., 2007; WESSLER; KIRKPATRICK, 2008) e, portanto, modula tanto a resposta imune como a neurotransmissão (RAMIREZ et al., 1997). A ACh circulante, quando liberada pelos linfócitos, é capaz de induzir influxo de cálcio extracelular e liberação de cálcio intracelular no citoplasma, pelo aumento do inositol, regulando diversos processos fisiológicos, incluindo modulação do sistema imune e inflamação (TAYEBATI et al., 2002). Quando essa molécula é encontrada em altas concentrações no sangue, ela atua como um agente anti-inflamatório capaz de regular a liberação das citocinas pró-inflamatórias como o

TNF- α e IL-1 (RAMIREZ, 1997; RAO; GUMPENY; DAS, 2007; ALMEIDA; SALDANHA, 2010).

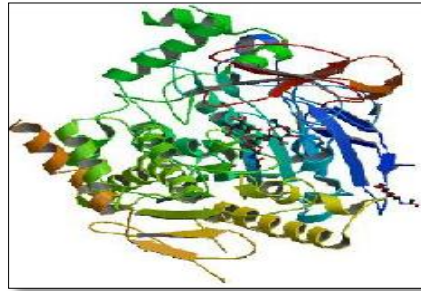
Entretanto, os níveis de acetilcolina no espaço extracelular são controlados pela ação das colinesterases que são classificadas em dois tipos, de acordo com as suas propriedades catalíticas, especificidade pelo substrato, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual. A AChE (E.C 3.1.1.7), também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, encontrada predominante nos linfócitos, eritrócitos e gânglios do sistema nervoso autônomo, hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, como a ACh. Já, a butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8) ou pseudocolinesterase, hidrolisa ésteres como a butirilcolina e pode estar presente no soro, rins e intestino (LUNKES et al., 2006).

1.8.1 Acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7)

A AChE (Figura13) possui uma importante função na modulação da ação da ACh, promovendo a rápida hidrólise desse neurotransmissor nas sinapses colinérgicas e também nas junções neuromusculares (GRISARU et al.,1999). Além disso, essa enzima contribui na regulação das respostas inflamatórias através da modulação dos níveis extracelulares de ACh (KAWASHIMA;FUJII, 2000; TAYEBATI et al., 2002). Essa enzima age especificamente sobre o substrato ACh, levando a hidrólise dessa molécula a partir de sua ligação ao resíduo de serina no sítio ativo da enzima, o que leva à formação do intermediário acetil-AChE e liberação de colina. Em sequência, há a hidrólise desse intermediário, liberando acetato e permitindo o “turnover” da enzima (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

A avaliação da atividade das colinesterases, pode sugerir os níveis de ACh, mesmo que de maneira indireta, podendo servir como um marcador no processo inflamatório, devido seu importante papel na supressão do processo inflamatório (DAS, 2007). Nesse sentido, têm sido desenvolvidos estudos com o objetivo de determinar o efeito de algumas plantas medicinais sobre a atividade das colinesterases, especialmente, sobre a AChE. De fato, várias espécies têm demonstrado a capacidade de interferir na atividade dessa enzima, sugerindo uma manutenção nos níveis de ACh no espaço extracelular que pode atenuar a inflamação, como na Doença de Alzheimer (TREVISAN et al., 2003).

Figura 11 - Estrutura da enzima AChE



Fonte: Kryger; Silmann; Sussman, 1999.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas e sementes de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e do ácido gálico bem como o possível efeito protetor desses compostos sobre atividades enzimáticas, parâmetros de estresse oxidativo e viabilidade celular em linfócitos humanos expostos ao 2,2 azobis-2-amidinopropano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Em um sistema livre de células, avaliar a capacidade antioxidante dos extratos das folhas e sementes de *S.cumini* (LASc e SASc, respectivamente) e do ácido gálico (GA) através de:

- a) Scavenging de peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- b) Scavenging de radical óxido nítrico (NO);
- c) Scavenging de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH);
- d) Atividade mimética da enzima tiol-peroxidases;
- e) Capacidade redutora do ferro (FRAP).

2.2.2 Avaliar o efeito do LASc, SASc e GA em amostras de linfócitos humanos expostos ao AAPH sob condições *in vitro*, através de:

- a) Atividades enzimáticas: NTPDase, AChE. ADA e identificar sua principal isoforma;
- b) Parâmetros de estresse oxidativo: nível de lipoperoxidação, através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); grupamentos tióis proteicos (P-SH) e produção de NOx;
- c) Viabilidade celular através do método de MTT.

3 MANUSCRITO

3.1 Leaves and seeds of *Syzygium cumini* extracts produce significant attenuation of 2,2 azobis-2-amidinopropane dihydrochloride-induced toxicity via modulation of ectoenzymes and antioxidant activities

Manuscrito submetido no periódico **Journal of Applied Pharmaceutical Science**

----- Forwarded message -----

From: Journal of Applied Pharmaceutical Science <japs@ejmanager.com>

Date: 2016-12-15 15:33 GMT-02:00

Subject: Submission Confirmation

To: beatriz@smail.ufsm.br

Dear Maria Beatriz Moretto,

Your submission entitled *Leaves and seeds of Syzygium cumini* extracts produce significant attenuation of 2,2 azobis-2-amidinopropane dihydrochloride-induced toxicity via modulation of ectoenzymes and antioxidant activities (Manuscript Number: JAPS-2016-12-975) has been received by Journal of Applied Pharmaceutical Science.

You could follow status of your manuscript by login to your author account at www.ejmanager.com.

Thank you for submitting your work to our journal.

Best regards,

Editor
Journal of Applied Pharmaceutical Science
<http://japsonline.com/index.php>

Leaves and seeds of *Syzygium cumini* extracts produce significant attenuation of 2,2 azobis-2-amidinopropane dihydrochloride-induced toxicity via modulation of ectoenzymes and antioxidant activities

Authors

Raphaella M. Borges¹, Paula E. R. Bitencourt¹, Carolina S. Stein¹, Guilherme V. Bochi³,
Aline Boligon², Rafael Noal Moresco¹, Maria Beatriz Moretto^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

²Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

³ Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

*Corresponding author: Maria Beatriz Moretto. Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima Avenue 1000, 97105-900, Santa Maria, Brazil.

Tel +55 55 32208749. Email: beatriz@smail.ufsm.br

ABSTRACT

Syzygium cumini has shown many pharmacologic properties including anti-inflammatory. Here, we analyzed the antioxidant activity of leaves and seeds from aqueous extracts of *S. cumini* (LAsC, SASc, respectively) as well as their effect in a 2,2 azobis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) induced model of oxidative damage in human lymphocytes, *in vitro*. It was evaluated the ferric reducing power (FRAP), scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nitric oxide, hydrogen peroxide radicals and thiol peroxidase-like activity from both extracts. Lymphocytes obtained from blood samples of healthy volunteers were incubated with LAsC and SASc (50, 100 and 500 µg/mL) and gallic acid (GA) (100µM) followed or not by incubation with AAPH (1mM). Afterwards, enzymatic activities, oxidative parameters and cytotoxicity were evaluated. This study indicates that extracts of *S. cumini* (i) exhibiting antioxidant activity; (ii) prevented the increase of ectonucleotidase and adenosine deaminase (ADA) activities; (iii) prevented inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity; (iv) protected P-SH groups, decreased lipoperoxidation and NO production; (v) improved the cellular viability in AAPH-induced model of lymphocytes. *S. cumini* extracts modulate ectonucleotidase, ADA, AChE activities maintaining levels normal of ATP, adenosine (Ado) and acetylcholine (ACh) and markedly attenuate inflammatory process. In conclusion, *S. cumini* has protective and immunomodulatory effects on AAPH-induced damage in lymphocytes, *in vitro*.

KEYWORDS:

NTPDAses activities; inflammation; cytotoxicity; AAPH-induced oxidative damage; lymphocytes; medicinal plant

INTRODUCTION

Natural products have been accepted as an important tool to obtain bioactive compounds with therapeutically effective medicines in the prevention and/or treatment of a number of diseases, but the mechanisms involved in it have not been completely understood yet. *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Myrtaceae family is a worldwide *medicinal* popular *plant*, commonly known as jambolan or jamun, possesses a wide range of medicinal properties such as anti-inflammatory, antioxidant, hypoglycemic and anti-microbial activities, as well as hepatoprotective and cardioprotective effects which have been attributed to the presence of bioactive molecules in different parts of the plant (Ayyanar and Subash-Babu, 2013; Cargnelutti et al., 2015). In Brazil, the leaves and seeds are the parts of the plant most used by the population in folk medicine (Vizzoto and Pereira, 2008).

The *S. cumini*'s leaves and seeds have been reported to be rich in phenolic compounds, which contribute for the scavenging of free radicals with significant antioxidant activity and protective effect on antioxidant enzymes (Ravi et al., 2004a; Ravi et al., 2004b; Bajpai et al., 2005). Among this class of compounds, gallic acid stands out, a phenolic acid, widely present in extracts from different parts of *S. cumini* (De Bona et al., 2011; Cargnelutti et al., 2015) which have already reported antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities (Kim et al., 2006; Padma et al., 2011; Borges et al., 2013).

Oxidative stress is characterized by the imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants which are formed as a result of normal cellular aerobic metabolism but during pathophysiological conditions can be produced at an elevated rate (Roberts et al., 2010). Accumulating evidence suggests that high levels of ROS may cause oxidative changes to DNA, protein and lipids and additionally are involved in several diseases pathogenesis of, including changes in the immune system (Brigelius-Flohe and Flohe 2011; Ray et al. 2012). The immune system changes are critical for its normal functioning, mainly for lymphocytes, the most important cells involved in this system (Delves et al., 2006). In general, exposure to high levels of free radicals has a negative impact on this system and is linked to a loss of T-cell homeostasis and antioxidant defense, lymphocytes activation, cell damage and limited viability (Cope, 2002; Perez de Castro et al., 2004).

The inflammatory process involves activation of the immune system and interaction between several components (Rock et al., 2005), including molecules of a purinergic and cholinergic system that contribute to their responses (Bours et al., 2006; Kawashima and Fujii, 2003). Thus, one of the ways in which lymphocyte function may be regulated is by a

member of the of the ectonucleoside triphosphate phosphohydrolase (E-NTPDase) family characterized as marker of lymphocyte activation, the NTPDase (EC 3.6.2.5, CD39). The NTPDase is an ectoenzyme that hydrolyzes extracellular nucleotide (preferably ATP and ADP) (Leal et al., 2005) and the sequential hydrolysis of nucleotide generates ADP, AMP, and adenosine (Ado) that are involved in the regulation of immune defenses (Burch, 2006). The extracellular ATP acts as a pro-inflammatory molecule and stimulates the release of pro-inflammatory cytokines from activated lymphocytes (Langston et al., 2003).

Conversely, the breakdown product of ATP, the Ado, exhibits potent anti-inflammatory activity and has the ability to alter the lymphocyte activation and cytokine production (Gessi et al., 2007). The adenosine levels are regulated by the adenosine deaminase activity (ADA, E.C 3.5.4.4) an enzyme from the purine metabolism that catalyzes the deamination of Ado and deoxyadenosine into inosine and deoxyinosine, respectively (Spychala, 2000). Two ADA's different isoenzymes designated as ADA1 and ADA2 have been reported in mammals. ADA1 isoenzyme is found in higher activity in lymphocytes and monocytes, whereas ADA2 is the predominant isoenzyme in the serum (Ungerer et al., 1992). In fact, in the inflammatory process ADA activity is increased (Schetinger et al., 2007). Also, in this context, nitric oxide (NO), in addition to being a highly reactive radical is also a pro-inflammatory mediator that contributes to the development of a variety of inflammatory diseases (Kim et al., 2010).

In addition, another important enzyme in the immune regulation is the acetylcholinesterase (AChE). The lymphocytes possess a complete cholinergic system consisting of acetylcholine (ACh), muscarinic and nicotinic receptors, choline acetyltransferase, and AChE (EC 3.1.1.7). This enzyme is a hydrolase that catalyzes the rapid hydrolysis of ACh (Gabrovska et al., 2008) that is the main circulating molecule involved in cholinergic functions that may regulate several physiological functions, including immune modulation (Tayebati et al., 2002).

In previous studies of our group we observed that leaves extracts from *S. cumini* protect the lymphocytes against *in vitro* oxidative stress (De Bona et al., 2015) and different parts of *S. cumini* demonstrated beneficial effects against diabetes mellitus *in vitro and in vivo* (De Bona et al., 2014; Bitencourt et al., 2015). Therefore, aqueous seeds and leaves extracts of *S. cumini* are potential candidates to analyze its effects. As a result of the importance of this plant in traditional Brazilian medicine and in order to extend these observations to further investigate its antioxidant properties using AAPH, a water-soluble azo compound that is thermally decomposed to generate peroxy radicals at a constant rate, this study was carried

out to evaluate the antioxidant activity as well as the effects of LAsC and SASc on the cytotoxicity and enzymatic activities on 2,2 azobis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) exposure in human lymphocytes by scientifically validated *in vitro* techniques.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Acetylthiocholine iodide, 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 2,2azobis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), the substrates ATP, ADP and adenosine, Gallic acid and Ficoll–Histopaque™ plus were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and highest purity.

Plant material and aqueous extracts of *S. cumini* preparation

S. cumini seeds and leaves were collected (29°43'22"S and 53°43'47"W) in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil and identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Federal University of Santa Maria (voucher number SMDB 14.001). For the preparation of the aqueous seeds extract (SAsC), eighty grams of the seed powder were extracted with 400 mL of distilled water during 1h under reflux (Prince et al., 1998). For the preparation of the aqueous leaves extract (LAsC), they were dried in a greenhouse with air circulation at 40 °C for approximately 48h. Then, they were ground in a knife mill and submitted to extraction until exhaustion (Eidi et al., 2006).

The presence of 11 antioxidant compounds in both extracts, namely gallic, caffeic and ellagic acids, chlorogenic, catechin, quercetin, epicatechin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin were investigated by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The chemical characterization of the extracts was determined in recent studies as described in Bitencourt et al. (2016) and Cargnelutti et al. (2015). The HPLC fingerprinting of both extracts revealed that the gallic acid (GA) is the major component of the extracts. Then, the antioxidant activities of the LAsC and SASc were compared with the antioxidant activity of GA used as a positive standard in the *in vitro* tests.

Antioxidant activities of extracts

Free radical scavenging ability by the use of a stable DPPH radical

DPPH free radical scavenging activity was determined as reported earlier (Joshi et al., 2011). LAsC, SASc and GA at the concentrations of 25, 50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL, were added to an ethanolic DPPH solution (6 mM). The mixture was incubated at room temperature for 30 min and determined the absorbance at 518 nm. The percent inhibition was calculated. The dark color of the DPPH radical solution becomes lighter when it is incubated with an antioxidant and the decrease in color indicated the scavenger potential of the antioxidant compounds in relation to ability to donate a hydrogen or electron.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was used to measure the reducing antioxidant power of LAsC, SASc and GA at the concentrations 25, 50, 100, 200, 400 e 800µg/mL (Benzie and Strain, 1996). The results were presented as µM Fe²⁺/mL of extract.

Thiol Peroxidase-Like Activity of Extracts

The catalytic effect of LAsC, SASc and GA on the reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) by reduced glutathione (GSH) was assessed using the rate of GSH oxidation. Different concentrations of extracts were incubated in the medium containing GSH (1mM) with and without H₂O₂ (0.3 mM). At 120 min, aliquots of the reaction mixture (200 µL) were checked for the amount SH groups according to Ellman (1959) and the values were expressed in percentage of control (Souza et al., 2009).

Nitric Oxide-Scavenging Assay

The scavenging effect of aqueous extracts on nitric oxide (NO) was measured according to the method of Sreejayan and Rao (1997). For the assay, sodium nitroprusside (10mM), was mixed with LAsC, SASc and GA (50, 100, 200, 400 and 800µg/mL), incubated for 150 min and then mixed with 0.5 mL of Griess reagent and measured at 546 nm. In the control, sample extract was substituted by PBS. The capability of scavenging NO was calculated using the following equation: Scavenging effect (%) = [1 - (A sample/A control)] × 100.

Hydrogen peroxide-Scavenging Assay

The ability of the extracts and GA to scavenge hydrogen peroxide was determined according to the method of Ruch et al. (1989). LAsC, SASc (5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) were added to a hydrogen peroxide solution (0.6 mL, 40mM). The absorbance of hydrogen peroxide at 230 nm was determined 10 minutes later against a blank solution containing the phosphate buffer without hydrogen peroxide. The percentage of hydrogen peroxide scavenging of the extracts were calculated: % Scavenged $[H_2O_2] = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 was the control absorbance and A_1 the absorbance in the presence of extract or standard.

Sample collection and isolation of lymphocytes from human blood

Lymphocytes were isolated from blood taken from healthy volunteers, after informed consent was obtained, and collected in Vacutainer tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ) containing lithium–heparin or EDTA (only NTPDase activity) as anticoagulant and separated on Ficoll–Histopaque™ plus density gradients, according to the technique described by Böyum (1968). Cell number and viability were determined by Trypan blue exclusion. More than 95% of the cells were found to be viable. The final cell suspensions were performed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) or in saline solution (for NTPDase activity) and 3×10^6 cells/mL were used for each analysis. All experiments were performed at least three times using lymphocytes obtained at different occasions and a total of eight samples were used for everyone incubation performed. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, which approved the experimental protocol 54224316.1.0000.5346.

In vitro experimental design

Primarily, lymphocytes suspensions were preincubated with different concentrations of LAsC, SASc (50, 100 and 500 µg/mL) and GA (100 µM) at 37°C for 30 min, followed by incubation in oxidative stress condition with AAPH (1 mM) at 37°C for 2h. Also, were observed the *per se* effect of LAsC, SASc and GA. The choice of the concentrations of the extracts and GA for the experiments was made based on the development of a concentration curve (data not shown) and also earlier studies (De Bona et al., 2015). All the procedures for enzymatic assays, oxidative stress parameters and viability assays were the same as described below.

Enzymatic assays in lymphocytes suspensions

NTPDase activity

After obtaining the lymphocytes suspension, NTPDase activity was determined according to the method of Leal et al. (2005). Protein content of all samples were adjusted to 0.1-0.2 mg/mL and 20 μ L of intact cells suspended in saline solution were added to a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at a final volume of 200 μ L and preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP substrate at a final concentration of 2 mM and incubation proceeded for 70 min. After the incubation time, 200 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) was added to the medium to stop the reaction. The samples were chilled on ice for 10 min before testing for the release of inorganic phosphate (Pi) as described by Chan et al. (1986) using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls with the addition of the enzyme preparation (intact lymphocytes) after the addition of TCA were used to correct for non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The results were expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

ADA activity

ADA activity in lymphocytes suspension was estimated spectrophotometrically using the method as described by Giusti and Gakis (1984) which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when ADA acts in excess of adenosine. The activities of total ADA in the presence and absence of erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) were measured. Lymphocytes were treated with 100 μ M EHNA, a potent ADA1 inhibitor. ADA1 activities were calculated by subtracting the activity of ADA2 from that of total ADA. The protein content used for the assay was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. The results were expressed as units per liter (U/L).

AChE activity

AChE activity in lymphocytes was performed by the colorimetric method described by Ellman et al. (1961). Two hundred microliters of intact cells was added to a reaction mixture composed of 1 mM acetylthiocholine (AcSCh), 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), and 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0). Immediately, the absorbance was read on a

spectrophotometer at 412 nm, before and after incubation for 30 min at 27°C. The results are expressed as $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein. Physostigmine, a classic inhibitor, in the concentration of $100\mu\text{g/mL}$ was used as a positive control of inhibition enzymatic activity (Hassan et al., 2013).

Oxidative stress parameters

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipoperoxidation was estimated in lymphocytes by measurement of TBARS according to the method of Ohkawa et al. (1979). Lymphocytes were mixed with 8% SDS solution and incubated for 5 min at room temperature. Glacial acetic acid (20%) was added to the reaction mixture and incubated for 2–5 min at room temperature. Finally, 0.8% TBA solution was added to the reaction mixture followed by incubation for 1 h in a boiling water bath. The reaction mixture was cooled, centrifuged and the absorbance of the supernatant was measured spectrophotometrically at 532 nm. The results were expressed in nmol MDA/mL .

Protein thiol (P-SH) groups

P-SH groups in lymphocyte suspensions were determined by the method of Boyne and Ellman (1972), modified by Jacques-Silva et al. (2001), which consisted of the reduction of DTNB in 0.3 M phosphate buffer (pH 7.0) measured at 37 °C and at 412 nm. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate P-SH group. The results were expressed as $\text{nmol P-SH/mg protein}$.

Oxide nitric (NO) measurement

NO was determined indirectly by quantifying in lymphocytes. NO was measured by the modified Griess method using the Cobas MiraTM automated analyzer as described by Tatsch et al. (2011). The results were expressed as $\mu\text{M/L}$.

Cell viability

Tetrazolium salt method (MTT)

The viability assay was performed by the colorimetric MTT method. 1.2 mM of MTT has added cell suspension following by incubation at 25 °C for 60 min. The formazan product obtained during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and quantified by spectrophotometer at 560 nm (Moretto et al., 2007). Only viable cells are able to reduce MTT, therefore, each value obtained is proportional to the percentage of cell viability in relation to control considered as 100 % of viability.

Protein determination

Protein concentration was measured according to the method of Lowry et al. (1951) using serum albumin as standard.

Statistical Analysis

The analyses were performed using STATISTICA for Windows, version 6.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA). All data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

RESULTS

Antioxidant activities of extracts

DPPH

Radical scavenging activity of *S. cumini* extracts and GA against stable DPPH^{*} (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) demonstrated high radical scavenging activity ($p < 0.001$) and LAsC (400 μ g/mL) had a greater effect than SASc (Fig. 1a).

Hydrogen peroxide-Scavenging Assay

The free radical scavenging activity of LAsC, SASc and GA was also examined by using hydrogen peroxide free radical (Fig. 1b). LAsC, at lower concentrations (5 and 10 $\mu\text{g/mL}$), exhibited greater H_2O_2 scavenging activity than SASc. But, this scavenging ability became similar at high concentrations (25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). Even, at the elevated concentration tested (100 $\mu\text{g/mL}$), the LAsC and SASc scavenging capacity presented equally to GA.

FRAP

The GA and the extracts' reducing ability to convert ferric ions to ferrous showed that LAsC and SASc at 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ had a similar reduction power in the FRAP assay (Fig. 1c) and LAsC (400 $\mu\text{g/mL}$) presented higher reducing power than SASc ($p < 0.001$).

Nitric Oxide-Scavenging Assay

The NO radical scavenging property of the extracts and GA is represented in the Fig.1d. The extracts had a similar scavenging ability in the most of the concentrations tested, except at the concentration 100 $\mu\text{g/mL}$, where LAsC exhibited higher ($p < 0.001$) scavenging potential than SASc.

Thiol Peroxidase-Like Activity

Thiol peroxidase-like activities from both extracts and GA are shown in fig. 2a. None of the extracts were able to promote the consumption of GSH in the absence of H_2O_2 in the concentrations tested. However, we can observe a decrease in SH groups when LAsC, SASc and GA were incubated in the presence of H_2O_2 at all concentrations tested (Fig. 2b).

In vitro effect of LAsC, SASc and GA in AAPH-induced oxidative stress in the peripheral lymphocytes

Enzymatic activities in the peripheral lymphocytes

NTPDase, ADA activities assays

Fig. 3 shows that the *in vitro* effect of NTPDase on ATP (a) and ADP (b) hydrolysis and ADA activities (Fig. 4w) after AAPH exposure in lymphocytes was significantly increased compared with the control ($p < 0.01$). LAsC and SASc at all concentrations tested prevented the increase in NTPDase activity (ADP and ATP substrates) induced by AAPH ($p < 0.0001$; $p < 0.01$; $p < 0.0001$). Similarly, results were found concerning ADA activity for both the extracts tested.

Otherwise, LAsC and SASc (500 $\mu\text{g/mL}$), *per se*, reduced ATP and ADP hydrolysis compared to control ($p < 0.0001$). The *per se* effect was also observed in relation to ADA activity (Fig. 4a) with LAsC (100 and 500 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$), SASc (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$; $p < 0.05$).

Furthermore, when only the lymphocytic suspension was incubated with EHNA (100 μM) a markedly reduction of ADA1 activity *in vitro* was observed (77, 83%). This reveals that the isoform 1 is predominant in the tested lymphocytes, and therefore, this isoform is the main responsible for the enzymatic activity observed in all assays (Fig. 4b).

AChE activity

LAsC (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) and SASc (50 $\mu\text{g/mL}$) were able to prevent the strong inhibition of enzymatic activity promoted by AAPH ($p < 0.05$). The seeds and leaves effects were different as shown in Fig. 5, according to the concentration analyzed. However, LAsC at 500 $\mu\text{g/mL}$ exhibited a synergistic effect with AAPH.

Oxidative stress parameters

TBARS levels

As shown in Fig. 6, the incubation of the lymphocytes in the presence of AAPH promoted a significant increase in lipoperoxidation levels compared with the control ($p < 0.0001$). Only GA and the SASc at 50 $\mu\text{g/mL}$ were able to protect the cells by reducing TBARS levels generated by AAPH ($p < 0.01$). Unexpectedly, we observed that LAsC (500 $\mu\text{g/mL}$) *per se* and in the presence of AAPH caused a lipoperoxidation increase ($p < 0.0001$).

P-SH groups

As expected, a decrease in P-SH groups was observed when the lymphocytes suspensions were incubated with AAPH ($p < 0.0001$, Fig. 7). LAsC and SASc tested were able to protect the lymphocytes by increasing P-SH groups levels in presence of AAPH, wherein LAsC had a greater ability than SASc at all concentrations tested.

NO_x production

The AAPH and aqueous extracts' effects on NO_x production by lymphocytes are summarized in Fig. 8 and it reveals that the LAsC (50 and 100 µg/mL) and SASc at all concentrations tested protected the cells by decreasing NO_x levels promoted by AAPH.

Cell viability

In vitro exposure of lymphocytic suspension to AAPH caused a marked reduction of cell viability (41%) and LAsC at all concentrations tested and SASc (100 and 500 µg/mL) were able to protect MTT levels. Besides, LAsC revealed better effect than SASc at all concentrations (Table 1).

DISCUSSION

Different approaches have been developed to analyze anti-inflammatory and antioxidant activities of medicinal plants (Madhulika et al., 2016; Mireille, 2001). In the same manner, with the current and growing interest in oxidative damage mechanisms, azo compounds have frequently been used as convenient free radical initiators. The results of this study clearly indicate the high antioxidant activities and free radical scavenging effect of *S. cumini* extracts that are linked to their phytochemical composition marked by the presence of polyphenolic compounds that are known to have several pharmacological activities (Ushida et al., 2008).

The LAsC, SASc and GA have potent antioxidant activity against *in vitro* oxidative systems, since they showed effectiveness as scavengers of DPPH, NO and H₂O₂, reductive ability Fe⁺³ to Fe⁺², thiol peroxidase-like activity that mimic the properties of glutathione peroxidase (GPx). These *in vitro* assays indicate LAsC and SASc as a significant source of natural antioxidant, possibly due to their ability to scavenge the free radicals and to reduce the intracellular ROS generation which might be helpful in preventing the oxidative stress progress.

Also, the exposure of lymphocytes to AAPH was capable of increasing the activities of the ADA and NTPDases, lipoperoxidation and NO production and reduces AChE activity, P-SH and MTT levels. These results can be assigned on the ability of the hydrophilic radical generator of this azo compound to generate peroxy radicals, thereby oxidizing lymphocytic suspension (Frei and Gaziano, 1993). Likewise, concerning ectoenzymes, AAPH exposure causes a raise in lymphocytic NTPDases (hydrolyzing ATP and ADP), increasing the release of ATP from stressed cells to extracellular space during inflammation (Virgilio et al., 2009) and ADP may have been formed as consequence of inflammatory process (Bours et al., 2006). Sequentially, the increase in ADA activity could be attributed to an attempt of the organism to compensate the high levels of ATP released, which may affect adenosine levels available for adenosine receptors stimulation expressed on the T-cell surface, leading to impairment of immune regulation and inflammatory process (Mandapathil et al., 2010). Subsequently, the reduction in Ado levels contributes to release of pro-inflammatory cytokines and NO production (Haskó and Cronstein, 2004). Taking into account our results, they suggest that an increase of nucleotide hydrolysis and adenosine deamination in AAPH-induced can lead to inflammatory and immune alterations in lymphocytes. Moreover, it indicates that when ROS levels are generated in excess, cells redox homeostasis is disturbed affecting the redox-

sensitive signal transduction cascades, leading to an unbalanced purinergic and immunologic systems and an immune cells activation (Smale, 2011). These immunobiochemical pathways may potentially be altered in the pathological state including infections, autoimmune syndromes, malignant disease, neurodegeneration and cardiovascular disorders (Schetinger et al., 2007; Becker et al., 2014).

Importantly in this study was that both LAsC and SASc protected the lymphocytes against the NTPDase and ADA activities increase by preventing AAPH-induced toxicity that may result in an increase of ATP in order to enhance Ado levels production, which has anti-inflammatory effects. Thus, Ado becomes available to exert its anti-inflammatory function by activating receptors present on the cells surfaces, regulating the release of molecules involved in the immune system and also inhibiting the release of NO (Haskó and Cronstein, 2004).

Another important aspect to be discussed here is the AAPH effect on the cholinergic system in lymphocytes. For the first time to our knowledge, this peroxy radicals initiator was tested in lymphocytes AChE activity causing strong inhibition which affect the acetylcholine levels acting as a compensatory mechanism in order to attenuate the intensity of the progression of inflammatory processes since ACh exhibits the anti-inflammatory effect. Notwithstanding, the pretreatment with LAsC (100 µg/mL) and SASc (50µg/mL) prevented this strong inhibition reestablishing the AChE activity. This prevention would minimize the effects generated by exposure to the peroxy radical initiator, thus, it would decrease the load on the AChE activity.

Although SASc (50µg/mL) and GA have protected lymphocytes against lipoperoxidation, LAsC was not able to do it, corroborating with previous study our group (De Bona et al., 2015). Nevertheless, LAsC and SASc in all concentrations tested were able to protect levels of P-SH groups indicating that antioxidants compound work against ROS in order to protect the sulfhydryl groups cells from the deleterious effects of oxidative stress (Pandey and Rizvi, 2011) favoring to the proper function of lymphocytes (Knight, 2000).

Furthermore, the pretreatment with LAsC and SASc improved cell viability, a cytoprotective effect, and suggested its potential application against ROS-mediated cell damage (Veigas et al., 2008). In fact, AAPH easily penetrates the lymphocytes cellular membrane and accumulated inside these cells, changing the biomembrane composition, potentially leading to an interference with cell-signaling pathways and even to the loss of cell function and viability (Hu et al., 2005), as it can be observed in MTT assay.

We suggest that the differential protective effect exerted by LAsC and SASc in some parameters can be linked to the bioactive molecules present in them, since phytochemical

characterization previously published (Cargnelutti et al., 2015, Bitencourt et al., 2016) revealed that GA is present in high quantities in both extracts but, LAsC exhibits also high concentration of quercetin and caffeic acid. In fact, quercetin has already been able to modulate AChE activity in rats' lymphocytes orally exposed to Cadmium (Abdalla et al., 2014) and an extract containing significant amounts of caffeic acid increased the viability of lymphocytes exposed to H₂O₂ (Sagrillo et al., 2015) also, caffeic acid contributed to the antioxidant defense system of HepG2 cells (Razali et al., 2015). Regarding SASc, which presented high concentrations of chlorogenic acid and rutin, it has recently been shown that the *Scutia buxifolia* Reissek extract with a similar composition was able to inhibit NTPDase in rats lymphocytes (Boligon et al., 2015) while rutin significantly reduced ADA activity in rats induced by carrageenan (Arruda-Silva et al., 2014). Moreover, chlorogenic acid brought TBARS levels in diabetic rats down to normal values (Stefanello et al., 2014). The basis for these distinct effects may be attributed to their structure-dependent physicochemical interactions with biologic membranes which would explain these differential results to the extracts (Böhm et al., 2012).

The results of our study still deserve some considerations. When exposure *per se* and/or in the presence of AAPH, LAsC (500 µg/mL) increased lipoperoxidation. In the same way, it had a synergistic effect with AAPH that led to strong inhibition of AChE activity. These effects may be attributed to the ability of the flavonoids to act as antioxidants/prooxidants under *in vitro* system to be dependent on a number of factors such as concentration, structure, the test system (Procházková et al., 2011) and also, it is thought to be directly proportional to the total number of hydroxyl groups (Cao et al., 1997). This suggests that a molecule with the same chemical structure may optimize antioxidant capacity and it can also exacerbate oxidative stress and damage the cellular molecules (Heim et al., 2002).

CONCLUSION

In conclusion, the results of the present investigation indicate that the exposure to AAPH caused changes in the purinergic and cholinergic system's enzymes, as well in parameters of oxidative stress that possibly contributes to decrease viability cellular and to the inflammation process in lymphocytes. Mainly, the ADA1 was affected in the model tested. Of particular importance, our findings indicated that the *S. cumini*'s leaves and seeds extract were able to generate significant effects, preventing these changes across modulation of the ectonucleotidases activities, probably preserving the ATP and Ado levels, which could lead to

an anti-inflammatory status. Besides, the extracts can regulate the AChE activity leading to immune system control carried out by the lymphocytes. Such effects may be a consequence of the compounds in higher concentration present in the medicinal extract preparations investigated.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Pq303245/2014-0). The first author acknowledges the fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

Abdalla, FH, Cardoso AM, Schmatz R, Gonçalves JF, Baldissarelli J, Martins CC, Zanini D, De Oliveira LS, Da Costa P, Pimentel VC, Pereira LB, Lhamas CL, Schetinger MR, Morsch VM, Mazzanti CM. Protective effect of quercetin in ecto-enzymes, cholinesterases, and myeloperoxidase activities in the lymphocytes of rats exposed to cadmium. *Mol Cell Biochem*, 2014; 396: 201-211.

Ali Hassan SH, Fry JR, Abu Bakar MF. Phytochemicals content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition properties of indigenous *garcinia parvifolia* fruit, *Biomed Res Int*, 2013; 31:138950.

Arruda-Silva F, Nascimento MV, Luz AB, Venzke D, Queiroz GS, Fröde TS, Pizzolatti MG, Dalmarco EM.. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation. *Int Immunopharmacol*, 2014; 19(2): 334-341.

Ayyanar M, Subash-Babu P, Ignacimuthu S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. *Complement. Ther Med*, 2013; 21: 232-43.

Bajpai, M., Pande A, Tewari SK, and Prakash D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr*, 2005; 56: 287-291.

Becker K, Schroecksnadel S, Gostner J, Zaknun C, Schennach H, Überall F, Fuch D. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine* 2014; 2: 164– 171.

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*, 1996; 239: 70-76.

Bitencourt PER, Ferreira LM, Cargnelutti LO, Denardi L, Boligon A, Fleck M, Brandão R, Atahyde ML, Cruz L, Zanette RA, Alvez SH, Moretto MB. A new biodegradable polymeric

nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and in vivo toxicity. *Ind Crops Prod*, 2016; 83: 400-407.

Bitencourt PER, De Bona K, Cargnelutti L, Bonfanti G, Pigatto A, Boligon A, Athayde ML, Pierezan F, Zanette RA, Moretto MB. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates adenosine deaminase activity and biochemical parameters but does not alter insulin sensitivity and pancreas architecture in a short-term model of diabetes. *J Complem Integr Med*, 2015; 12: 1–7.

Böhm F, Edge R, Truscott G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. *Mol Nutr Food Res*, 2012; 56: 205-216.

Boligon AA, Pimentel VC, Bagatini MD, Athayde ML. Effect of *Scutia buxifolia* Reissek in nucleotidase activities and inhibition of platelet aggregation. *J Nat Med*, 2015; 69: 46-54.

Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb Drug Resist*, 2013; 19(4): 256-265.

Bours, MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 2006; 112: 358–404.

Boyne, AF, Ellman GL.. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*, 1972; 46:639–65.

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968; 97: 77–89.

Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*, 2011; 15: 2335–2381.

Burch LH, Picher M. E-NTPDases in human airways: regulation and relevance for chronic lung diseases. *Purinergic Signal* 2006; 2: 399–408.

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*, 1997; 22: 749–760.

Cargnelutti LO, Bitencourt PER, Bochi G, Duarte T, Boligon A, Pigatto AS, Athayde ML, Moresco RN, Moretto MB. Syzygium cumini Leaf Extract Protects Against Ethanol Induced Acute Injury in Rats by Inhibiting Adenosine Deaminase Activity and Proinflammatory Cytokine Production. *Res J Phytochem*, 2015; 9: 56-67.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*, 1986; 157: 375-380.

Cope AP. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 2002; 4:197–211.

De Bona KS, Bonfanti G, Bitencourt PER, Borges RM, Boligon, A, Pigatto A, Athayde ML, Moretto MB. Protective effect of gallic acid and Syzygium cumini extract against oxidative stress-induced cellular injury in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*, 2015; 39(3): 256–263.

De Bona KS, Bonfanti G, Bitencourt PE, Cargnelutti LO, Da Silva PS, Da Silva TP, Zanette RA, Pigatto AS, Moretto MB. Syzygium cumini is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. *J Physiol Biochem*, 2014; 70(2): 321–330.

Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt's essential immunology, 2006; 11th ed. Hoboken (NJ): Wiley–Blackwell.

Di Virgilio, F, Ceruti S, Bramanti P, Abbracchio MP. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci* 2009, 32: 79–87.

Eidi A, Eidi M, Esmacili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 2006; 13: 624–629.

Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961; 7: 88-95.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*, 1959; 82(1): 70–77.

Frei, B., Gaziano JM. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation. *J Lipid Res*, 1993; 34: 2135-2145.

Gabrovska K, Marinov I, Godjevargova T, Portaccio M, Lepore M, Grano V, Diano N, Mita DG.. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. *Int. J. Biol. Macromol*, 2008; 43: 339–345.

Gessi S, Varani K, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, Mac-Lennan S, Borea PA. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal*, 2007.3: 109–116.

Giusti G, Galanti B, 1984. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, 315–23.

Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*, 2004; 25: 33-39.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The J Nutr Biochem*, 2002; 13(10): 572–584.

Hu C, Kwok BHL, Kitts DD. Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) scavenge free radicals and inhibit intracellular oxidation, *Food Res*, 2005; 38: 1075–1085.

Jacques-Silva, MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacol Toxicol*, 2001; 88:119–125.

Joshi R, Poonam Gulati A. Biochemical attributes of tea flowers (*Camellia sinensis*) at different developmental stages in the Kangra region of India. *Sci.Hortic*, 2011; 130, 66–74.

Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci*, 2003; 74: 675-696.

Kim, KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn G, Yi TH. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-kappa B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol*, 2010; 649: 369–75.

Kim, SH, Jun CD, Suk K , Choi BJ, Lim H, Park S, Lee SH, Shin HY, Kim DK, and Shin T. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci*, 2006; 91:123–131.

Knight JA. Review: free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*, 2000; 30:145–158.

Langston, HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL-2 and IFN-, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol*, 2003; 170: 2962–70.

Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MRC. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1721: 9–15.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-75.

Madhulika Pradhan et al. Phytochemistry, Pharmacology and Novel Delivery Applications of *Syzygium cumini* (L.). *Ijppr.Human*, 2016; 7(1): 659-675.

Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. Generation and accumulation of immunosuppressive

adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Biol Chem*, 2010; 285: 7176–7186.

Mireille C. Le guide du préparateur en pharmacie d'Afrique noire. In. Edited by Ngcom, 2001; E. Paris 68.

Moretto, MB, Thomazi AP, Godinho G, Roessler TM, Nogueira CW, Souza DO, Wofchuk S, Rocha JB. Ebselen and diorganylchalcogenides decrease in vitro glutamate uptake by RAT brain slices: prevention by DTT and GSH. *Toxicol In vitro*, 2007; 21: 639–645.

Ohkawa H, Oshishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95: 351–358.

Padma VV, Sowmya P, Arun Felix T. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food chem toxicol*, 2011; 49: 991–998.

Pandey, KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2011; 155 (2): 131-6.

Perez de Castro I, Bivona TG, Philips MR, Pellicer A. Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol*, 2004; 24: 3485–3496.

Prince PS, Menon VP, Pari L.. Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 1998; 61: 1-7.

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 2011; 82(4): 513–523.

Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull*, 2004; 27: 1212-1217.

Ravi, K., Ramachandran B, Subramanian S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin induced diabetes in rats. *Life Sci*, 2004; 75: 2717-2731.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 2012; 24: 981–990.

Razali N, Mat Junit S, Ariffin A, Ramli NS, Aziz AA. Polyphenols from the extract and fraction of *T. indica* seeds protected HepG2 cells against oxidative stress. *BMC Complement and Altern Medi*, 2015; 18: 15:438.

Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicol*, 2010; 276:85–94.

Rock KL, Hearn A, Chen CJ, and Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathology*, 2005; 26: 231–246.

Ruch, RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 1989; 10: 1003-1008.

Sagrillo MR, Garcia LFM, Souza Filho OC, Duarte MMMF, Ribeiro EE, Cadona FC, Cruz IBM. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chem*, 2015; 173: 741-748.

Schetinger, MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. *BioFactors*, 2007.31(2): 77–98.

Smale ST. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. *Nat. Immunol*, 2011; 12: 689–694.

Souza, ACG, Luchese C, Santos Neto JS, Nogueira CW. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. *Life Sci*, 2009; 84: 351–357.

Spychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*, 2000; 87: 161–173.

Sreejayan N, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol*, 1997; 49: 105–107.

Stefanello N, Schmatz R, Pereira LB, Rubin MA, Da Rocha JB, Facco G, Pereira ME, Mazzanti CM, Passamonti S, Rodrigues MV, Carvalho FB, Da Rosa MM, Gutierrez JM, Cardoso AM, Morsch VM, Schetinger MR. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 2014; 388: 277-286.

Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Agertt VA, De Campos MM, Gomes P, Duarte MM, and Moresco RN. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*, 2011; 44: 348–350.

Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. Immunological and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 2002; 132:147–155.

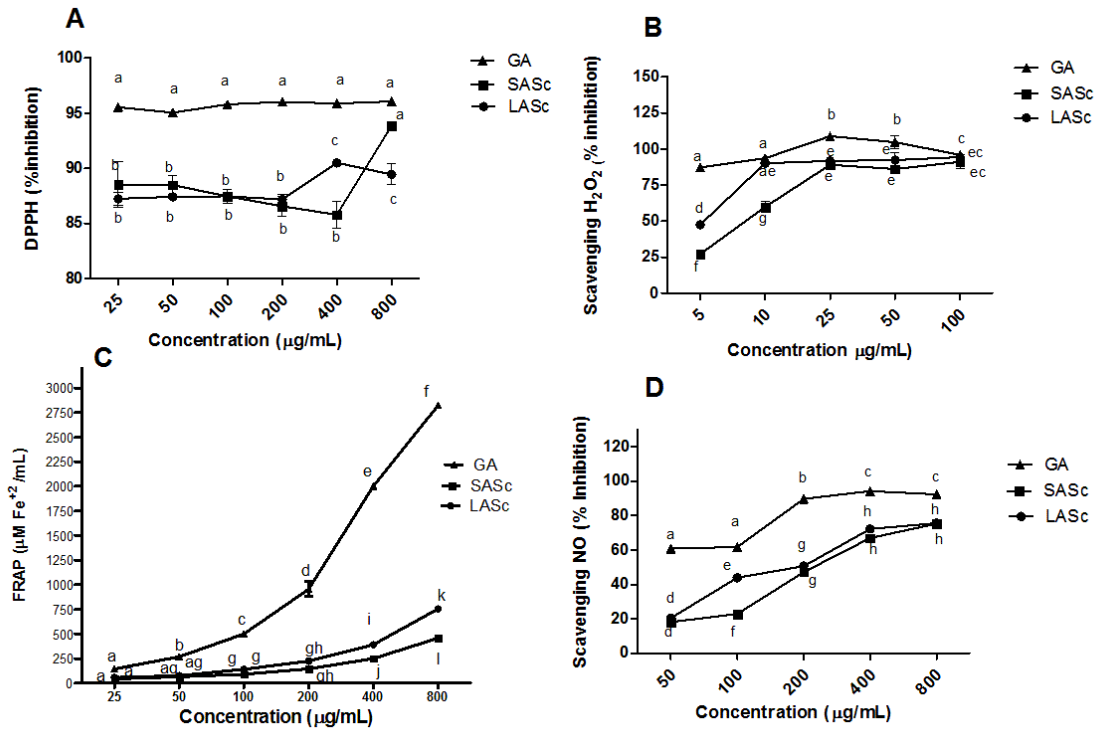
Ungerer JP, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJ. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin Chem*, 1992; 38: 1322-1326.

Ushida Y, T. Matsui M, Tanaka K, Matsumoto H, Hosoyama A, Mitomi Y, Sagesaka Y, Kakuda T. Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutin-free tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta. *J Nutr Biochem*, 2008; 19: 700–707.

Veigas JM, Shrivasthava R, Neelwarne B. Efficient amelioration of carbon tetrachloride induced toxicity in isolated rat hepatocytes by *Syzygium cumini* Skeels extract. *Toxicol In Vitro*, 2008; 22:1440–1446.

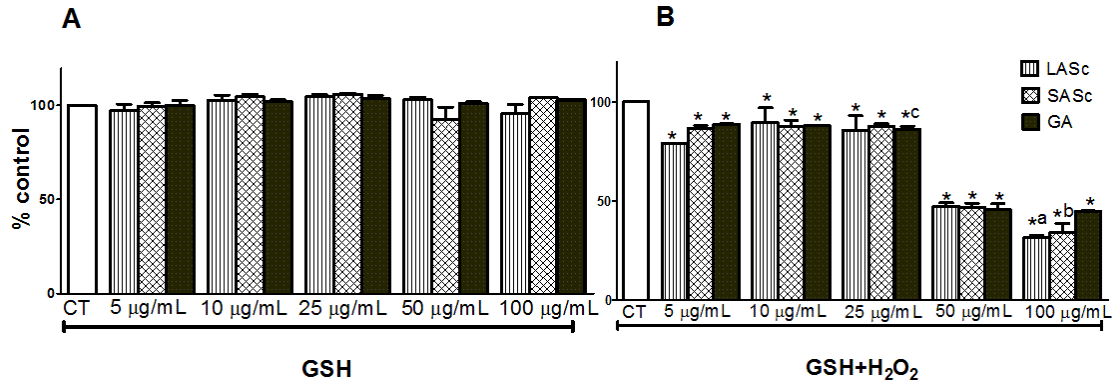
Vizzotto M C, Pereira M C. Caracterização das propriedades funcionais do jambolão. Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2008; 79: 1-26.

Figure 1. Antioxidant activities of LASc, SASc and GA. (a) DPPH assay (b) Hydrogen peroxide-Scavenging activity, (c) Ferric reducing antioxidant power, (d) NO scavenging.



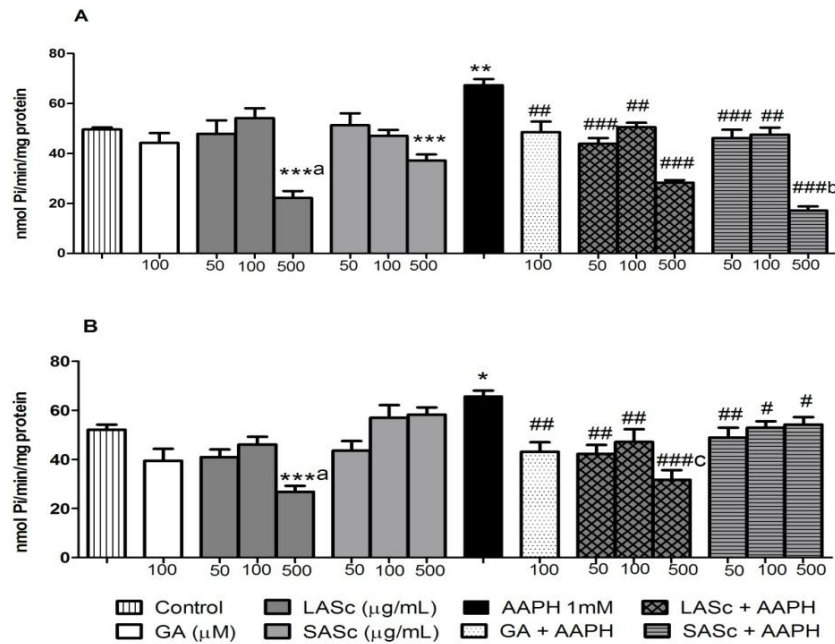
Each value is expressed as mean±SEM, n=3. Different letters are significantly different $p<0.001$. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparison post hoc test.

Figure 2 (a) Thiol peroxidase-like activity of LAsc, SASc and GA in the absence or (b) presence of H₂O₂.



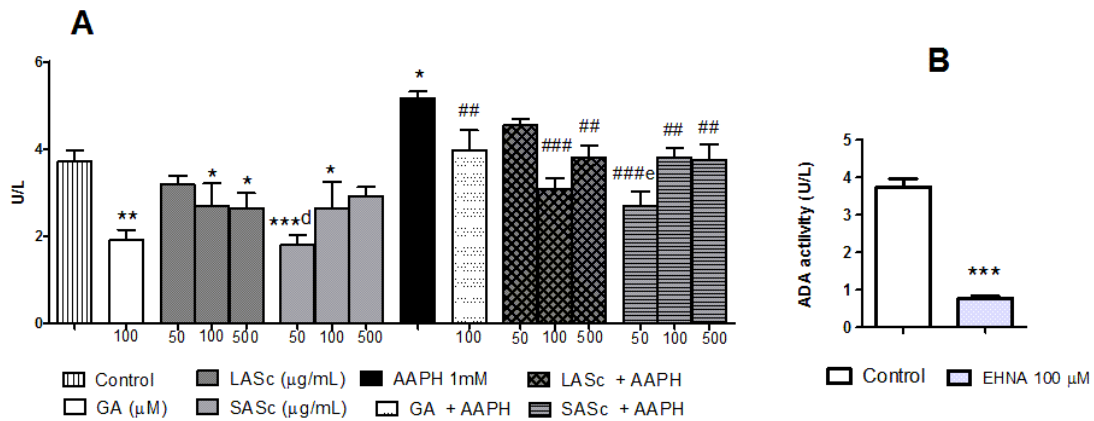
Each value is expressed as mean±SEM, n=3. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparison post hoc test. * denotes p<0.001 when compared to controls (CT); ^a denotes p<0.0001 different from LAsc 5, 10, 25 and 50 µg/mL; ^b denotes p<0.0001 when compared to SASc 5,10, 25 and 50 µg/mL and ^cdenotes difference from GA 50 and 100 µg/mL. LAsc, aqueous leaves extract of *S. cumini*; SASc, aqueous seeds extract of *S. cumini*; GA, gallic acid.

Figure 3. Effect of GA, LAsC and SASc in (a) ATP and (b) ADP hydrolysis in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH, *in vitro*.



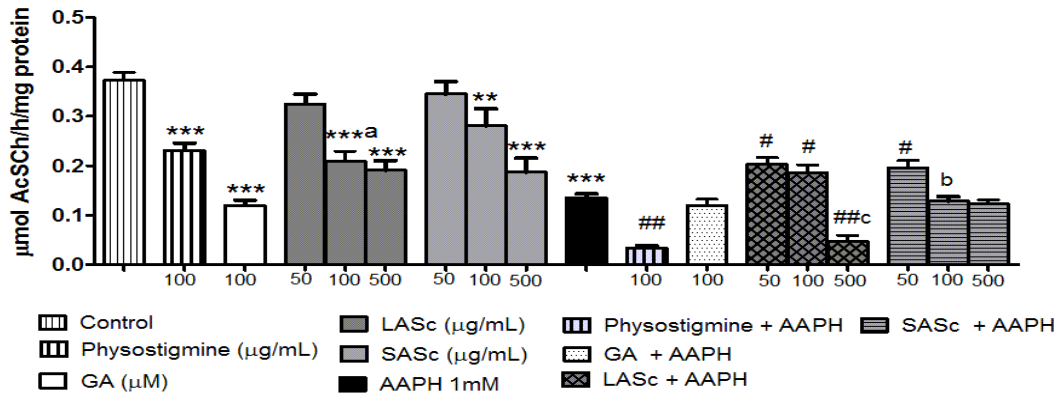
Data are reported as mean \pm S.E.M. (n=8). Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (* p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.0001 indicates difference from control group; # p<0.05, ## p<0.01 and ### p<0.0001 compared to AAPH 1mM; ^ap<0.0001 compared to SASc 500 μ g/mL; ^bp<0.05 compared to LAsC 500 μ g/mL+ AAPH; ^cp<0.01 compared to SASc 500 μ g/mL+AAPH.

Figure 4. Effect of GA, LASc and SASc in (a) ADA activities in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH, *in vitro* (b) Lymphocytes suspensions after incubation with EHNA.



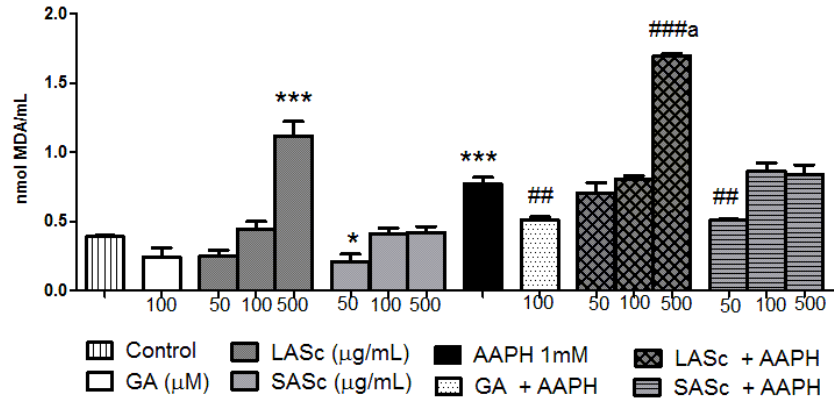
Data are reported as mean \pm S.E.M. (n=8). Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$ indicates difference from control group; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.0001$ compared to AAPH 1mM; ^d $p < 0.0001$ compared to LASc 50 $\mu\text{g/mL}$ and ^e $p < 0.01$ compared to LASc 50 $\mu\text{g/mL}$ +AAPH).

Figure 5. In vitro effect of GA, LASc and SASc on AChE activity in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.



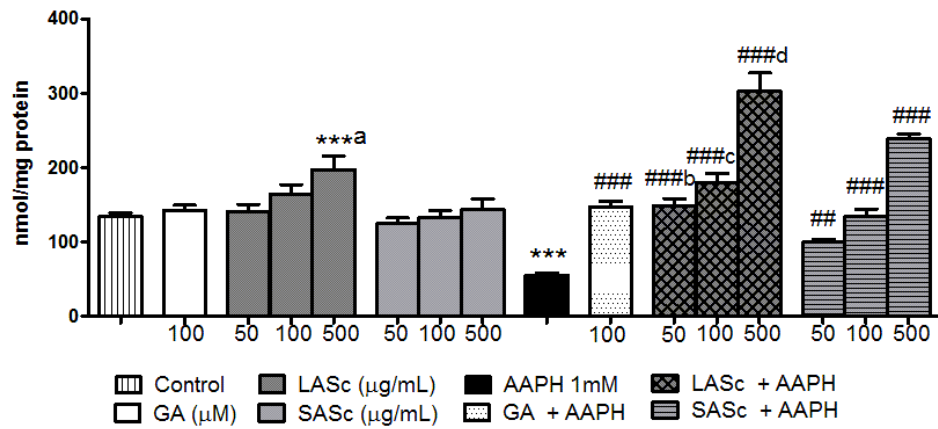
Data are reported as mean \pm S.E.M. (n=8). Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$ compared to control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared to AAPH 1mM; ^a $p < 0.01$ compared to SASc 100 $\mu\text{g/mL}$; ^b $p < 0.05$ compared to LASc 100 $\mu\text{g/mL}$ + AAPH; ^c $p < 0.01$ compared to SASc 500 $\mu\text{g/mL}$ + AAPH.

Figure 6. In vitro effect of LAsC, SASc and GA on TBARS levels in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.



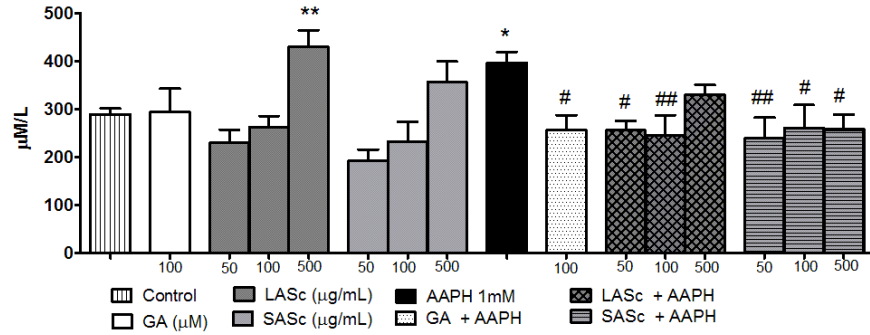
Values are expressed as mean \pm SEM (n=8). Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$ compared to control group; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.0001$ compared to AAPH 1mM; ^a $p < 0.0001$ compared to SASc 500 $\mu\text{g/mL}$ + AAPH).

Figure 7. *In vitro* effect of LAsC, SASc and GA on P-SH levels in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.



Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (***) $p < 0.0001$ compared to control; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.0001$ compared AAPH 1mM; ^a $p < 0.01$ compared to SASc 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ^b $p < 0.01$ compared to SASc 50+ AAPH; ^c $p < 0.05$ compared to SASc 100+AAPH; ^d $p < 0.0001$ compared to SASc 500+AAPH.

Figure 8. *In vitro* effect of LAsC, SASc and GA on NOx production in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.



Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ compared to AAPH 1mM).

TABLE 1

Table 1. *In vitro* effect of LAsC, SASc and GA on MTT assay in lymphocytes suspensions after 2 h of incubation with AAPH.

	Cell viability (%)
Control	100
GA 100 μ M	153 \pm 16*
LAsC 50 μ g/mL	143 \pm 13
LAsC 100 μ g/mL	224 \pm 18*** ^a
LAsC 500 μ g/mL	353 \pm 10*** ^b
SAsC 50 μ g/mL	120 \pm 5.2
SAsC 100 μ g/mL	123 \pm 5.3
SAsC 500 μ g/mL	245 \pm 23***
AAPH 1mM	59 \pm 1.5*
GA 100 μ M + AAPH	127 \pm 9.5 ^{##}
LAsC 50 μ g/mL + AAPH	131 \pm 6.6 ^{##c}
LAsC 100 μ g/mL + AAPH	194 \pm 20 ^{####d}
LAsC 500 μ g/mL + AAPH	334 \pm 13 ^{####e}
SAsC 50 μ g/mL + AAPH	73 \pm 4.7
SAsC 100 μ g/mL + AAPH	117 \pm 7.1 ^{##}
SAsC 500 μ g/mL + AAPH	281 \pm 8.4 ^{###}

Table 1. Data are reported as mean \pm SEM (n=8). Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (* p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.0001 compared with control; ^{##} p<0.01; ^{###} p<0.0001 compared with AAPH 1 mM; ^a p<0.0001 compared with SASc 100 μ g/mL; ^bp<0.0001 compared with SASc 500 μ g/mL; ^c p<0.01 compared with SASc 50 μ g/mL + AAPH; ^d p<0.01 compared with SASc 100 μ g/mL + AAPH and ^e p<0.05 compared with SASc 500 μ g/mL + AAPH

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do modelo experimental analisado neste trabalho podemos concluir que:

- LAsC, SASc e GA apresentaram atividade antioxidante demonstrada através dos métodos de scavenging de H₂O₂, NO e DPPH, FRAP e atividade thiol peroxidase-like;
- LAsC, SASc e GA foram capazes de prevenir o aumento da NTPDAse e ADA e prevenir a inibição da AChE nos linfócitos submetidos ao AAPH, demonstrando que esses compostos podem representar um importante mecanismo na modulação do sistema purinérgico e colinérgico
- ADA1 é a isoforma predominante pela qual atuam os linfócitos;
- SASc e o GA foram capazes de proteger as células da lipoperoxidação promovida pelo AAPH;
- LAsC, SASc e GA protegeram os grupamentos SH proteicos e diminuíram os níveis de NOx nos linfócitos atenuando o dano oxidativo.
- LAsC, SASc e GA melhoraram a viabilidade celular demonstrado através do método de MTT.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier. 2008.
- ABDALLA, F. H. et al. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biometals**, v. 24, n. 2, p. 349-356, 2011.
- ABDALLA, F. H. et al. Methylmercury-induced changes in target organs of suckling rat pups. **Experimental Toxicology Pathology**, v. 64, n. 6, p. 605-609, 2012.
- ABBACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.
- ADINOLFI, E. et al. P2X7 receptor: Death or life? **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 219-227, 2005.
- AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical in Biology & Medicine**, v.39, p. 297-316, 2005.
- ALMEIDA, J. P. L.; SALDANHA, C. Non-neuronal cholinergic system in human erythrocytes: Biological role and clinical relevance. **Journal Membrane Biology**, v. 234, p. 227-234, 2010.
- ANGHILERI, L. J.; THOUVENOT, P. Natural polyphenols iron interaction: its biological importance. **Biological Trace Element Research**, v.73, p.251-258, 2000.
- ANTONIOLI, L. et al. Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.120, p. 233-53, 2008.
- AQIL, F. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. ('jamun', the indian blackberry). **Nutr cancer**. v. 64, p. 428-438, 2012.

ARNOUS, A. H.; SANTOS A.S.; BEINNER, R. P. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular e Interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v.6, n.2, p.1-6, 2005.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 10, p. 153-158, 2001.

ARUOMA, O.I. Free radicals, antioxidants and international nutrition, **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition** 8, 53-63, 1999.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2 p. 240–246, 2012.

BALIGA, M.S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam.(blackplum): a review. **Food Res.Int**, v. 44, p. 1776–1789, 2011.

BARALDI, P. G.; BOREA, P. A. New potent and selective human adenosine A3 receptor antagonists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 456-459, 2000.

BARANKIEWICZ, J.; DOSCH, H.M.; COHEN, A. Extracellular nucleotide catabolism in human B and T lymphocytes. The source of adenosine production. **J Biol Chem**, v. 25, n. 263(15), p. 7094-7098, 1988.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v.28, p. 1046-1054, 2005.

BELLÉ, L. P. et al. Expression of CD26 and its Association with Dipeptidyl Peptidase IV Activity in Lymphocytes of Type 2 Diabetes Patients. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 2, p. 297-302, 2011.

BELLÉ, L P. et al. *Vitis vinifera* seed extract reduces adenosine deaminase activity in high glucose-treated human lymphocytes. 1. ed. **Nova Publishers**, p.7, 2014.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v.43, p.5511-5519, 2004.

BITENCOURT, P. E. et al. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates adenosine deaminase activity and biochemical parameters but does not alter insulin sensitivity and pancreas architecture in a short-term model of diabetes. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 187-93, 2015.

BOEYNAEMS, J. M.; COMMUNI, D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 943-944, 2006.

BONAN, C.D. et al. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v.52, p. 57-65, 2001.

BOPP, A. et al. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 501–507, 2009.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology Therapy**, v. 112, n. 2, p. 358- 404, 2006.

BOTSARIS, A. S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995, p. 550.

BRAGANÇA, L.A.R. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de planta e fitoterápicos hipoglicemiantes. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense , p. 105-122,1996.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária Portaria no 6/95 de 31.01.95. Diário Oficial da União, v. 200, secção I, p. 1523, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: **Ministério da Saúde**,. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31) Brasília. p. 156, 2012.

BRITO F. A. et al. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p.105–115, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology*, v. 62, n. 2, p. 491-503,1976.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 58-86, 2006.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.

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

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry

Herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, p. 223-226, 2005.

CARGNELUTTI, L. O. et al. *Syzygium cumini* Leaf Extract Protects Against Ethanol-Induced Acute Injury in Rats by Inhibiting Adenosine Deaminase Activity and Proinflammatory Cytokine Production. **Research Journal of Phytochemistry**, p. 1–12, 2015.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTILHOS, L. G. et al. Effect of *Uncaria tomentosa* extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. **BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v. 15, p. 189-199, 2015.

CHECHIK, B.E.; SCHRADER, W.P.; MINOWADA, J. An immunomorphologic study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. **J. Immunol**, v. 126, p. 1003-1007, 1981.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CHUYSINUAN, P. et al. Gallic acid-loaded electrospun poly (L-lactic acid) fibre mats and their release characteristic. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, p.814–822, 2009.

CONLON, B.A.; LAW, W.R. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. **Clin Exp Immunol**, v. 138, p.14–20, 2004.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

COPE, A.P. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. **Arthritis Res**, v. 4, p. 197–211, 2002.

CRISTALLI, G.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C. Adenosine deaminase: functional implications of inhibitors. **John Wiley Sons, Inc. Med. Res. Rev**, v. 21, p.105-128, 2001.

DADDONA, P. E. Human adenosine deaminase. **J. Biol. Chem**, v. 256, p. 12496-12501, 1981.

DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Med Sci Monit**, v.13, p. 214–221, 2007.

DE BONA, K.S. et al. *Syzygium cumini* extract decrease adenosine deaminase, 5' nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. **Cell. Physiol. Biochem**, v. 26, p. 729–738, 2010.

DE BONA, K. S., et al. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: Beneficial effect of *Syzygium cumini* leaf extract *in vitro*. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, n. 1, p. 84-90, 2011.

DE BONA, K. S. ; et al. Lymphocytic enzymes and lipid peroxidation in patients with Metabolic Syndrome. **Clin. Biochem**, v. 45, p. 13-14, 2012.

DE BONA, K. S. et al. Butyrylcholinesterase and γ -glutamyltransferase activities and oxidative stress markers are altered in metabolic syndrome, but are not affected by body mass index. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1539-1547, 2013.

DE BONA, K.S. et al. *Syzygium cumini* is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. **J Physiol Biochem**, v. 70, p. 321–330, 2014.

DE BONA K.S. et al. Protective effect of gallic acid and *Syzygium cumini* extract against oxidative stress-induced cellular injury in human lymphocytes. **Drug Chem Toxicol**, v. 39, n.3, p. 256–263. 2015.

DESROSIERS, M .D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1884-1892, 2007.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p. 587-600, 2001.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 2005.

DI VIRGILIO, F. et al. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 2, p. 79-87, 2009.

DRÖGE, W. et al. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EL-HAG, A. et al. Immunomodulation by neutrophil myeloperoxidase and hydrogen peroxide: differential susceptibility of human lymphocyte functions. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 9, p.3420-3426, 1986.

ELSSNER, A. et al. Anovel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

ESTÉVEZ, A. G.; JORDÁN, J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 207-211, 2002.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 32-29, 2007.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITKOVSKY, M. V. Extracellular ATP in T lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8267-8271, 1990.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death and Differentiation**, v.14, p. 1315-1323, 2007.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34. 2011.

GALBIATI, V.; MITJANS, M.; CORSINI, E. Present and future of in vitro immunotoxicology in drug development. V.7, n. May. P. 255-267, 2010.

GASPAR, L.. Plantas medicinais. **Pesquisa Escolar Online**, Fundação Joaquim Nabuco, Recife, 2008. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>. Acesso em 03 jul. 2016.

GAUTAM, N. et al. Age associated oxidative damage in lymphocytes. **Oxid Med Cell Longev**, v. 4, p. 275–282, 2010.

GELDERMAN, K.A. et al. T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 12831-6, 2006.

GESSI, S. et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 3. p. 826-836, 2007.

GESSI, S. et al. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. **Pharmacology Therapy**. v.117, p.123-140, 2008.

GHEZZI, P.; BONETTO, V.; FRATELLI, M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 964-72, 2005.

GONTHIER, M.P. et al. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota *in vitro*. **Biomed. Pharmacother**, v. 60, p. 536–540, 2006.

GORRELL, M.D.; GYSBERS, V.; MCCAUGHAN, G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scand. J. Immunol**, v. 54, n. 3, p. 249-64, 2001.

GRISARU, D. et al. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 672-686, 1999.

GUERRA, A. N. et al. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signalling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro – RJ: **Elsevier**, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic Biol Med**, v. 16, p. 845–850, 1994.

HARBELL, J.W. et al. Cell cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**. v. 35, p. 79-126, 1997.

HASKÓ, G.; PACHER, P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. **Journal of Leukocyte Biology**, v.83, p. 447-455, 2008.

HASKÓ, G. et al. A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 6, p. 263-270, 2009.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of Inflammation by Adenosine. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 85, 2013.

HEINRICH, M. Ethnobotany and its role in drug development. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 479–488, 2000.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem**, v.13, p. 572-584, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química- IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, , 152 p, 2003.

HU, C.; KITTS, D.D. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 218, p. 147-155, 2001.

HU C.; KWOK, B.H.; KITTS, D.D. Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) scavenge free radicals and inhibit intracellular oxidation. **Food Res Int** 38:1075–1085, 2005.

HULTQVIST, M. et al. The protective role of ROS in autoimmune disease. **Trends Immunol**, v. 30, p. 201-208, 2009.

IBIŞ, M. et al. Serum adenosine deaminase levels in pancreatic diseases. **Pancreatology**, v. 7, p. 526-30, 2007.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, n. 1, p. 5-17, 2004.

ISLAM, M. R.; PARVIN, M. S.; ISLAM, M.E. Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of *Syzygium jambos* (L.) leaves. **Drug Discoveries and Therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 205-211, 2012.

ISUZUGAWA, K. et al. Catalase contents in cells determine sensitivity to theapoptosis inducer gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 24, p. 249-253, 2001.

JADON, A. et al. Protective effect of *Terminalia belerica* Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats. **J Ethnopharmacol**, v. 109, p. 214-218, 2007.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 3, p. 201-12, 2011.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 33116-33122, 1996.

KADE, I.J.; ROCHA, J.B.T. Gallic acid modulates cerebral oxidative stress conditions and activities of enzyme-dependent signaling systems in streptozotocin-treated rats. **Neurochem Res**, v. 38 p.761–771, 2013.

KAPOOR L.D. Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC, London, p. 179-180, 2001.

KARTHIC, K. et al. Identification of alpha amylase inhibitors from *Syzygium cumini* linn seeds. **Indian J.Exp.Biol**, v.46, p. 677–680, 2008.

KASHYAP, M. K.et al. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sci**, v. 74, p. 675–696, 2003.

KIM, Y.J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1052-1055, 2007.

KINOSHITA, T. et al. Structural basis of compound recognition by adenosine deaminase. **Biochem.** v. 44, p. 10562-10569, 2005.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J.D. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr. Med. Chem**, v. 8, p. 773-96, 2001.

KRISKO, A.; KVEDER, M.; PIFAT, G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 355, p. 47–53, 2005.

KRYGER, G.; SILMAN, J.; SUSSMAN, J. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure**, v. 7, p. 297-307, 1999.

KUMAR A. et al. Phytochemical investigation on a tropical plant, *Syzygium cumini* from Kattupalayam, Erode district, Tamilnadu, South India. **Pak J Nutr**, v. 8, p. 83–85, 2009.

KURODA, Y. et al. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v.267, p.201-209, 1992.

LANGSTON, HP. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific t cells requires extracellular ATP, **J. Immunol**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, 2001.

LEAL, D. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1;ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.

LEONG, S. K.; RUAN, R.S.; ZHANG, Z. A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 161-181, 2002.

LLOYD, H. G. et al. The transmethyltion pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. **The Biochemical Journal**, v. 252, n. 2, p. 489-494, 1988.

LORENZI, T. Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

LU, Z. et al. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, p. 263–274, 2006.

LUNKES, I.G. et al. Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 72, p. 28–32, 2006.

LUPIDI, G. et al. Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1122, n. 3, p. 311-316, 1992.

LUTHJE, J. Origin, metabolism and function of extracellular adenosine nucleotides in the blood. **Klinische Wochenschrift**, v.67, p. 317-327, 1989.

MACHADO, J.S. et al. Fatores dietéticos relacionados à doença de Alzheimer. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 21, n.3, p. 252-257, 2006.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p. 323-50, 1997.

MAHMOUD, I.I. et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1239-1244, 2001.

MALISZEWSKI, C.R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization, **J Immunol**, v. 153, p. 3574–3583, 1994.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**, v.390, p.173-180, 2000.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MARCUS, A.J. et al. Heterologous cell-cell interactions thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MARCHAND, L. **Cancer preventive effects of flavonoids a review. Biomed Pharmacother**, v.56, p. 296–301, 2002.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological reviews**, v. 173, p. 89–97, 2000.

MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-639, 2002.

MIGLIATO, F. K. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-4, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. Portal Brasil. 2016. Disponível em: <http://brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>. Acesso em 02 jul. 2016.

MOHAMED, A.A.; ALI, S.I.; EL-BAZ, F.K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **PLoS One**, v. 8, p. 60269, 2013.

MORTELLARO, A. et al. Ex vivo gene therapy with lentiviral vectors rescues adenosine deaminase (ADA)-deficient mice and corrects their immune and metabolic defects. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2979-2988, 2006.

MURUGANANDAN, S. et al. Antiinflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, n. 4, p. 369-375, 2001.

NETO, L.G.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 100-108, 1990.

ODASHIMA, M. et al. Seletive adensine A receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 2, p. 275-280, 2005.

OHNO, Y. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. **Anticancer Drugs**, v.10, n. 9, p. 845-851, 1999.

OLAH, M. E.; STILES, G. L. Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 581-606, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011.

PADMA, V. V. et al. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 991–998, 2011.

PAK, M. A. et al. Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 9, p. 1049-1053, 1994.

PARENTE, C. E. T.; ROSA, M.M.T. Plantas comercializadas como medicinal no município de Barra do Piraí, RJ. **Rodriguésia**, v. 52, p. 47-59, 2001.

PEPATO, M. T. et al. Lack of antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 3, p. 389-395, 2001.

PEREZ DE CASTRO I. et al. Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. **Mol Cell Biol**, v. 24, p. 3485–3496, 2004.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v.7, p. 225-230, 1996.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-82, 2004.

PRINCE, S.M. et al. Effects of gallic acid on brain lipid peroxide and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 25, n. 2, p. 101–107, 2011.

PURVES, D. et al. Neurociências. 2ed. Porto Alegre: Artmed, p. 728, 2005.

RAJALAKSMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, p. 65-157, 1995.

RAMIREZ, M. J. et al. 5-HT₂ receptor regulation of acetylcholine release induced by dopaminergic stimulation in rat striatal slices. *Brain Research*, v. 757, n. 1, p. 17-23, 1997.

RAMYA, S. et al. Profile of bioactive compounds in *Syzygium cumini*—a review. **J.Pharm.Res**, v. 5, p. 4548–4553, 2012.

RAO, A. A.; GUMPENY, R. S.; DAS, U. N. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 1272–1276, 2007

RATHBONE, M. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology*, v. 59, p. 663-690, 1999.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry, Amsterdam**, v. 109, p. 883-890, 2008.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. **Methods Mol Biol**, v. 740, p.103-14, 2011.

ROBSON S.C.; SÉVIGNY J; ZIMMERMANN H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, p. 409-30, 2006.

ROSEMBERG, D. B. et al. NTPDase family in zebrafish: nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 155, n. 3, p. 230-240, 2010.

ROZALSKI, M.; NOCUN, M.; WATALA, C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 411-415, 2005.

SAGRAWAT, H.; MANN A.S.; KHARYA, M.D. Pharmacological potential of E. jambolana: a review. **Phcog Mag**, v. 2, p. 96-105, 2006.

SARKIS, J. et al. ATP diphosphohydrolases: and overview. **Journal of the Brazilian Association for the of Science**, v. 43, p. 131-136, 1995.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters cholinergic transmission and cognition. **Nature Reviews**, v.6, p-48-56, 2005.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Comparative evaluation of antimutagenicity of commonly consumed fruits and activity guided identification of bioactive principles from the most potent fruit, Java plum (*Syzygium cumini*). **J Agric Food Chem**, v. 61, p. 10033–42, 2013.

SCHETINGER, M.R. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.

SCHMATZ, R. Efeitos do resveratrol, do suco de uva e do vinho tinto nos biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de ectoenzimas em ratos diabéticos. 2011. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SCHMATZ, R. et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in

streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 65, n. 2, p. 129-43, 2013.

SEAGER, A. L. et al. Pro-oxidant induced DNA damage in human lymphoblastoid cells: homeostatic mechanisms of genotoxic tolerance. **Toxicological Sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 128, n. 2, p.387-39, 2012.

SENA, C.M.; PEREIRA, A.M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1832, p. 2216-2231, 2013.

SHARMA, B. et al. Effects of flavonoid rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chem**, v. 110, p. 697-705, 2008.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais, potencial antiinflamatório, **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p.38-43, 2000.

SIANI, A.C. et al. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. **Pharm Biol**, v. 51, p. 881–887, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFSC/ Ed. UFRGS. 2004.

SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **The Biochemical journal**, v. 222, n. 1, p. 1–15, 198, 1984.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **J Sci Food Agric**, v. 93, p. 2084–93, 2013.

SPANVELLO, R. et al. Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. **Brain Res Bull**, v. 28, n.1-2, p. 45-51. 2009.

STEFEK, M. et al. Oxidative modification of rat eye lens proteins by peroxy radicals in vitro: protection by the chain-breaking antioxidants stobadine and Trolox. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1741, n. 1-2, p. 183-90, 2005.

TAYEBATI S.K et al. Immunochemical and immunocytochemical characterization of Mol Cell Biochem cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **J Neuroimmunol**, v. 132, p. 147–155, 2002.

THANNICKAL, V. J. et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. **Annual Review of Medicine**, v. 55, p. 395-417, 2004.

TEIXEIRA, C. C.; et al. Plants employed in the treatment of diabetes mellitus: results of an ethnopharmacological survey in Porto Alegre, Brazil. **Fitoterapia**, v. 63, p. 320–322, 1992.

TEIXEIRA C.C.; FUCHS F.D. The efficacy of herbal medicines in clinical models: the case of Jambolan. **J Ethnopharmacol**, v. 108, p. 9-16, 2006.

THOMÉ, G.R. et al. Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 3, p. 206-12, 2012.

TIMBOLA, A.K. et al. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 174-176, 2002.

TORRES, B. B. Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TOVANI BENZAQUEM. Comércio, Importação, Exportação e Representações Ltda. Dossiê Antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, n.6. 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>. Acesso em: 19.jul. 2016.

TREVISAN, M. T. S. et al. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

UEDA, S et al. Bacalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Mol. Immunol**, v. 38, n.10, p. 781-91, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 2006.

VAN DER WEYDEN, M.B.; KELLEY, W.N.: Human adenosine deaminase. **The J Biol Chem**, v. 251, p. 5448-5456, 1976.

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, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273. 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENTURA, M.A.; THOMOPOULOS, P. ADP and ATP activate distinct signalling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 104-114, 1995.

VISIOLI, F.; KEANEY, J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res**, v. 47, p. 409-418, 2000.

VIZZOTTO, M. C.; PEREIRA, M. C. Caracterização das propriedades funcionais do jambolão. Embrapa Clima Temperado. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 79, p. 1-26, 2008.

WANG, T.; GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. **Brain Research**, v. 790, p. 318-322, 1998.

WESSLER, I. et al. Dysfunction of the nonneuronal cholinergic system in the airways and blood cells of patients with cystic fibrosis. **Life Science**, v. 80, p. 2253–2258, 2007.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the nonneuronal cholinergic system in humans. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.154, p. 1558–1571, 2008.

WILLIAMSON, E.M. Major herbs of ayurveda. **Churchill Livingstone**, China, p. 279-282, 2002.

YOON, S. et al. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. **Clinica Chimica Acta**, v. 324, n. 1-2, p. 113-120, 2002.

YOSHIOKA, K. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncol. Rep**, v. 6, p. 1221-1223, 2000.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 29-39, 2004.

ZAVIALOV, A.V.; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity, **Biochem. J**, v. 391, p. 51–57, 2005.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 161-178, 2008.

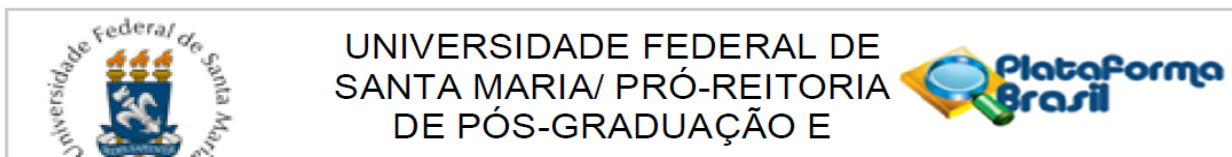
ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto nucleotidases in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 49, p. 589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Dev. Res**, v. 52, p.44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194-204, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides In SIMÕES, M.O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: UFSC Cap. 23, p. 499-526, 2002.

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO DE LINFÓCITOS, IN VITRO

Pesquisador: MARIA BEATRIZ MORETTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54224316.1.0000.5346

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.499.516

Apresentação do Projeto:

O projeto de Dissertação avaliará a atividade antioxidante do extrato das folhas e sementes de *Syzygium cumini* (Sc), popularmente conhecido como jambolão, frente a diferentes radicais livres, como capacidade removedora de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), capacidade removedora de radical óxido nítrico (NO), captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), atividade mimética das enzimas tiol-peroxidases e avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP). Também, a partir da suspensão de linfócitos (3x10⁶células/mL), os extratos das folhas e sementes de Sc e ácido gálico serão incubados em diferentes concentrações com 2-amidinopropano dihidroclorido (AAPH).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas e sementes de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) e do polifenol ácido gálico sobre parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em linfócitos humanos submetidos a condições de estresse oxidativo.

Objetivos específicos: avaliar o perfil fitoquímico do extrato aquoso das folhas e sementes de Sc; Em um sistema livre de células, avaliar a capacidade antioxidante dos extratos das folhas e

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

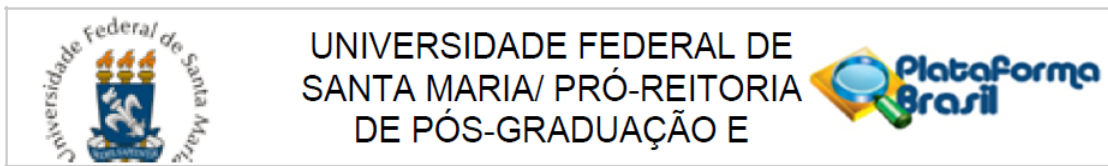
CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.499.516

sementes de Sc e do polifenol ácido gálico através de: a. Capacidade removedora de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); b. Capacidade removedora de radical óxido nítrico (NO); c. Captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); d. Atividade mimética das enzimas tiol-peroxidases; e. Avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP). Verificar o efeito dos extratos das folhas e sementes de Sc e do polifenol ácido gálico em amostras de linfócitos humanos expostos ao 2,2'-azobis (2-amidinopropano dihidroclorido AAPH), sob condições *in vitro*, avaliando: a. Atividade das enzimas E-NTPDase, ADA; b. Atividade da enzima AChE; c. Nível de lipoperoxidação, através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); d. Grupamentos tióis proteicos (P-SH); e. Viabilidade celular através dos métodos de MTT e LDH. Investigar qual a isoforma da ADA mais afetada pelos extratos de Sc e pelo ácido gálico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: é possível que aconteçam os seguintes desconfortos ou riscos: o desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxeadado, mas não requer nenhum cuidado especial, voltando ao normal em poucos dias.

Benefícios: os benefícios que esperamos como estudo são: contribuir no estudo da importância da utilização das plantas medicinais como potenciais antioxidantes na proteção do organismo frente às alterações promovidas pelos radicais livres.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: ok

Autorização institucional: ok

Folha de rosto: ok

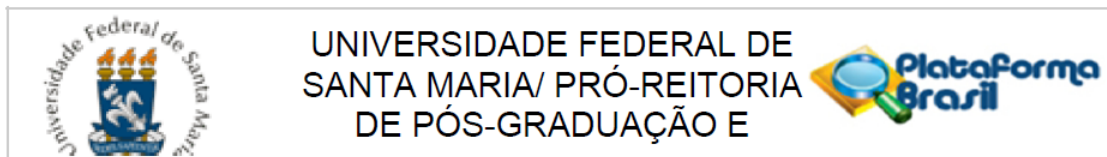
Orçamento: ok

Registro Gap: ok

Termo de confidencialidade: ok

TCLE: ok.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.499.516

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_645401.pdf	10/03/2016 15:36:06		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	10/03/2016 15:34:41	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	10/03/2016 14:23:04	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	10/03/2016 14:22:02	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	10/03/2016 14:18:46	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
Outros	Registro_GAP.pdf	10/03/2016 14:17:47	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
Outros	Termo_confidencialidade.pdf	09/03/2016 16:10:32	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_Instituicao_infraestrutura.pdf	09/03/2016 16:08:41	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/03/2016 15:53:58	MARIA BEATRIZ MORETTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com