

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

Greice Graziela Moraes

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS**

Santa Maria, RS
2019

Greice Graziela Moraes

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS
FOLHAS DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Melânia Palermo Manfron

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Chana de Medeiros da Silva

Santa Maria, RS
2019

Moraes, Greice Graziela

Análise fitoquímica e avaliação do potencial biológico das folhas de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts / Greice Graziela Moraes.- 2019.

69 p.; 30 cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron

Coorientadora: Chana de Medeiros da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. *Plinia peruviana* 2. antiproliferativo 3. hepatoproteção 4. antioxidante 5. polifenóis I. Manfron, Melânia Palermo II. da Silva, Chana de Medeiros III. Título.

Greice Graziela Moraes

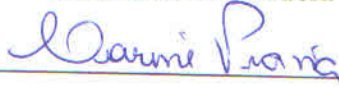
**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS
FOLHAS DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor
em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 13 de dezembro de 2019:



Melânia Palermo Manfron, Dr.^a. (UFSM)
Presidente/Orientadora



Carine Viana Silva, Dr.^a. (UFSM)



Gilberti Helena Hubscher Lopes, Dr.^a. (UFSM) - Parecer



Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden, Dr. (UFN)



Andréia Rosane de Moura Valim, Dr.^a. (UNISC)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas especiais em
minha vida.*

*Aos meus pais Marliza Garcia dos Santos e Elvio
Souza de Moraes e meu irmão Daniel Vinicius
Moraes, por todo apoio e carinho.*

*Ao Rafael Goettert Burgos, meu companheiro de
todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Melânia Palermo Manfron, e à coorientadora Dra. Chana de Medeiros da Silva pela acolhida e oportunidades concedidas. Por toda a dedicação com o desenvolvimento deste trabalho, competência e disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, pelo companheirismo e suporte prático e teórico.

Ao professor Renato Aquino Záchia, do Departamento de Biologia da UFSM, pela identificação da planta em estudo.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por sempre me auxiliarem.

À CAPES pela concessão de bolsa (2018).

A todos que contribuíram com o desenvolvimento deste estudo, e aos que acreditaram na minha capacidade, e que ajudaram de alguma forma na conquista de mais um sonho, a todos vocês fica a mais profunda admiração e o meu muito obrigada!

RESUMO

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS

AUTORA: GREICE GRAZIELA MORAES
ORIENTADORA: MELÂNIA PALERMO MANFRON
COORIENTADORA: CHANA DE MEDEIROS DA SILVA

As plantas medicinais apresentam metabólitos relacionados a diferentes atividades biológicas. Dentre estes, destacam-se os polifenóis, substâncias com alta capacidade antioxidante, antibacterianas, cardioprotetoras, anti-inflamatórias, além de promissores candidatos a agentes anticancerígenos. *Plinia Peruviana* (Poir.) Govaerts, popularmente conhecida como jabuticabeira, é difundida no Brasil, Argentina e Paraguai. Seus frutos são utilizados como alimento, e quase todas as partes desta espécie são utilizadas na medicina tradicional brasileira no tratamento de irritações da pele, gripe, diarreia, labirintite, problemas geniturinários, asma e até o momento não existem estudos biológicos relacionados às folhas desta espécie. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil fitoquímico das folhas de *P. peruviana*, a atividade antioxidante, antiproliferativa e hepatoprotetora. A quantidade de polifenóis do extrato liofilizado foi 944 ± 0.0856 mg de equivalentes ácido gálico (EAG) por g, além disso, o conteúdo total de flavonoides foi de 531.8 ± 0.0040 mg de equivalentes de rutina (ER) por g de extrato. Em análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), observou-se a presença de ácido gálico, catequina, epicatequina e rutina. Em relação à atividade antioxidante, obtivemos um valor de 1941.1 ± 717.65 μ M de equivalentes Trolox (ET) por g de extrato. Com base na alta capacidade antioxidante, obtivemos no ensaio antiproliferativo contra linhagens de células tumorais, valores de IC_{50} de 263.88 e 462.77 μ g / mL (HeLa e MCF-7 respectivamente). No ensaio hepatoprotetor *in vivo*, trinta ratos machos, pesando de 200 - 250 g, foram divididos em 5 grupos: grupo 1 (controle), grupo 2 (controle tetracloreto de carbono - CCl_4), grupo 3 tratado com 100 mg / kg de silimarina e grupos 4 e 5 com extrato de *P. peruviana* (50 mg / kg e 100 mg / kg respectivamente), via oral por um período de 14 dias, seguido de indução de lesão hepática com 10 mL / kg de CCl_4 . Os perfis bioquímicos clínicos, determinação da defesa antioxidante e exame histopatológico foram avaliados após o tratamento. Uma diminuição dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) foi mais pronunciada em animais administrados com 50 mg / kg do extrato de *P. peruviana*. Comparando-se o grupo induzido com o grupo tratamento com silimarina, não foi observada redução estatística na atividade da adenosina deaminase (ADA) hepática. Por outro lado, no fígado homogeneizado, os grupos *P. peruviana* 50 mg / kg e 100 mg / kg foram capazes de reduzir a atividade da ADA hepática em 15.26 % e 22.99 %, respectivamente. A concentração de 50 mg / kg de extrato, assim como o padrão silimarina foram capazes de diminuir os sinais de necrose induzida por CCl_4 . Portanto, os flavonoides presentes no extrato podem ser responsáveis por sua capacidade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e hepatoprotetora contra a toxicidade induzida por CCl_4 .

Palavras chaves: *Plinia peruviana*; antiproliferativo; hepatoproteção; CCl_4 ; antioxidante, polifenóis.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND EVALUATION OF POTENTIAL BIOLOGICAL OF *Plinia peruviana* LEAVES (POIR.) GOVAERTS

AUTHOR: GREICE GRAZIELA MORAES
ADVISOR: MELÂNIA PALERMO MANFRON
CO-ADVISOR: CHANA DE MEDEIROS DA SILVA

Medicinal plants have metabolites related to different biological activities. These include polyphenols, substances with high antioxidant capacity, antibacterial, cardioprotective, anti-inflammatory, and promising candidates for anticancer agents. *Plinia Peruviana* (Poir.) Govaerts, popularly known as jabuticabeira, is widespread in Brazil, Argentina and Paraguay. Its fruits are used as food, and almost all parts of this species are used in traditional Brazilian medicine to treat skin irritations, flu, diarrhea, labyrinthitis, genitourinary problems, asthma and so far there are no biological studies related to the leaves of this species. Thus, the objective of this study was to determine the phytochemical profile of *P. peruviana* leaves, antioxidant, antiproliferative and hepatoprotective activity. The amount of polyphenols in the lyophilized extract was 944 ± 0.0856 mg of gallic acid equivalents (GAE) per g, in addition the total flavonoid content was 531.8 ± 0.0040 mg of rutin equivalents (RE) per g of extract. High performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) showed the presence of gallic acid, catechin, epicatechin and rutin. Regarding antioxidant activity, we obtained a value of 1941.1 ± 717.65 μ M Trolox equivalents (TE) per g of extract. Based on the high antioxidant capacity, we obtained in the antiproliferative assay against tumor cell lines, IC₅₀ values of 263.88 and 462.77 μ g / mL (HeLa and MCF-7 respectively). In the *in vivo* hepatoprotective assay, thirty male rats weighing 200 - 250 g were divided into 5 groups: group 1 (control), group 2 (carbon tetrachloride control - CCl₄), group 3 treated with silymarin 100 mg / kg and groups 4 and 5 with *P. peruviana* extract (50 mg / kg and 100 mg / kg respectively), orally for 14 days, followed by induction of liver injury with 10 mL / kg CCl₄. Clinical biochemical profiles, antioxidant defense determination and histopathological examination were evaluated after treatment. A decrease in alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AF) levels was more pronounced in animals given 50 mg / kg of *P. peruviana* extract. Comparing the induced group with the silymarin-treated group, no statistical reduction in hepatic adenosine deaminase (ADA) activity was observed. On the other hand, in the homogenized liver, treatment groups with *P. peruviana* 50 mg / kg and 100 mg / kg were able to reduce hepatic ADA activity by 15.26 % and 22.99 %, respectively. The concentration of 50 mg / kg of extract as well as the silymarin standard were able to decrease the signs of CCl₄-induced necrosis. Therefore, the flavonoids present in the extract may be responsible for their antiproliferative and hepatoprotective capacity against CCl₄-induced toxicity.

Keywords: *Plinia peruviana*; antiproliferative; hepatoprotective; CCl₄; antioxidant, polyphenols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>P. peruviana</i> : (A) Aspecto geral; (B) Folhas; (C) Botão floral e flor; (D) Frutos diretamente dos ramos da árvore.	15
Figura 2 - Estrutura das principais subclasses de flavonoides.....	18
Figura 3 - Efeito antioxidante das plantas medicinais.....	20
Figura 4 - Mecanismos envolvidos no dano ao hepatócito.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida
ADA	Adenosina deaminase
ALB	do inglês, <i>albumin</i>
ALT	do inglês, <i>alanine aminotransferase</i>
AST	do inglês, <i>aspartate aminotransferase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
EAG	Equivalentes ácido gálico
ER	Equivalentes rutina
ET	Equivalentes Trolox
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FA	Fosfatase alcalina
GGT	do inglês, <i>gamma-glutamyl transferase</i>
HPLC	do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	do inglês, <i>Inhibitory Concentration 50%</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TP	do inglês, <i>total protein</i>
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS, BIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DA PLANTA EM ESTUDO	13
2.1.1 A família Myrtaceae e o gênero <i>Plinia</i> : visão geral	13
2.1.2 <i>Plinia peruviana</i> (Poir.) Govaerts	14
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS: classificação química e propriedades biológicas.....	17
2.3 O CÂNCER E SEU TRATAMENTO	21
2.4 HEPATOTOXICIDADE	22
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Artigo original 1 – Inglês	28
4.2 Manuscrito 2 – Inglês.....	38
5 DISCUSSÃO GERAL	55
6 CONCLUSÃO	57
7 REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – Carta de aprovação da pesquisa no CEUA - UFSM.	67
ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito “Effects of <i>Plinia peruviana</i> leaves against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity <i>in vivo</i> ”.	69

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para a prevenção e tratamento de diversas doenças tem sido praticado desde a antiguidade, e foi a principal fonte de tratamento antes da evolução da medicina moderna alopática ou sintética (MANANDHAR et al., 2018). Com o passar do tempo, as plantas medicinais adquiriram importância no sistema de saúde em todo o mundo por suas comprovadas e eficazes propriedades terapêuticas, tais como anti-inflamatória, antibiótica, antisséptica, antitumoral, antialérgica, cardioprotetora, entre outras (DEI CAS; GHIDONI, 2018).

Estas propriedades tornam principalmente os compostos fenólicos moléculas muito estudadas (LEE et al., 2018; JEONG et al., 2018). Estes apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou polímeros, que os confere o poder antioxidante, pois são capazes de doar um elétron ou um átomo de hidrogênio a um radical livre, reduzindo sua atividade (BOTTA et al., 2017). Considerando a necessidade crescente de buscar novas formas alternativas para o tratamento do câncer, a pesquisa de plantas medicinais com propriedades antioxidantes está se mostrando particularmente interessante para esta terapêutica e neste sentido, a cultura de células cancerígenas constitui-se uma ferramenta considerada essencial na triagem de diferentes compostos bem como um *screening* de novas moléculas (VALLEJO; SALAZAR; GRIJALVA, 2017).

Além do câncer, a doença hepática afeta adultos e crianças e está se tornando prevalente em países industrializados e em desenvolvimento, podendo ser causada por vários fatores, como vírus, álcool, produtos químicos orgânicos, alterações metabólicas e genéticas (ZHAO et al., 2019). Os produtos naturais e extratos de plantas que exibem propriedades antioxidantes podem ser úteis para o tratamento desta patologia (SOBEH et al., 2019).

Neste sentido, várias espécies da família Myrtaceae são notáveis devido ao seu uso na medicina tradicional. São fontes importantes de óleos essenciais, condimentos e alimentos. As folhas têm sido utilizadas na medicina popular por suas interessantes bioatividades, como propriedades antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Estas, atribuídas principalmente à presença de taninos e flavonoides (SOUZA-MOREIRA et al., 2018; DIAS et al., 2018; FALCÃO et al., 2018). A Myrtaceae é uma das famílias mais importantes do Brasil, sendo a lenhosa dominante no sudeste da Mata Atlântica (CITADIN; DANNER; SASSO, 2010; COSTA et al., 2013).

Uma espécie representativa dessa família é *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, popularmente conhecida como “jabuticaba” no Brasil. *P. peruviana* é comum em planícies aluviais e florestas abertas na Argentina e no Paraguai (CITADIN; DANNER; SASSO, 2010).

No Brasil, pode ser encontrada no nordeste, centro-oeste, sudeste e sul. A espécie é comumente encontrada na floresta atlântica, mas também é distribuída nos biomas da Caatinga, Cerrado e Pantanal (LORENZI, 2000). A árvore tem 10 a 15 metros de altura, com folhas soltas. É muito apreciada para uso ornamental, especialmente durante a floração. As folhas são simples e têm até 7 centímetros de comprimento. Floresce na primavera e no verão, produzindo frutas abundantes. As flores e os frutos crescem em cachos ao longo do tronco e dos galhos. Seus pequenos frutos com casca preta e polpa branca aderem a uma única semente (SOUZA-MOREIRA, 2010; WU et al., 2013).

Apesar do uso popular das folhas desta espécie, para a tosse e diarreia, apenas os frutos tiveram suas propriedades medicinais extensivamente investigadas, como anti-inflamatória (REYNERTSON et al., 2006), antiproliferativa (REYNERTSON et al., 2006; LEITE-LEGATTI et al., 2012), antibacteriana (HAMINIUK et al., 2011) e antidiarreica (SOUZA-MOREIRA et al., 2011). Essas propriedades são atribuídas principalmente à presença dos polifenóis (EINBOND et al., 2004; REYNERTSON et al., 2008; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; LEITE-LEGATTI et al., 2012).

Tendo em vista o potencial fitoquímico e farmacológico das folhas desta espécie, o presente trabalho foi executado no intuito de avaliar a composição química e o potencial antioxidante, antiproliferativo e hepatoprotetor. Os resultados obtidos nas análises e sua discussão, bem como os métodos utilizados no desenvolvimento da pesquisa serão apresentados no item 4 desta tese, na forma de artigos científicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS, BIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DA PLANTA EM ESTUDO

2.1.1 A família Myrtaceae e o gênero *Plinia*: visão geral

Segundo Govaerts e colaboradores (2014), a família Myrtaceae engloba 3.800-5.600 espécies divididas entre 140 gêneros, podendo ser encontrada na Austrália, região Neotropical, Sudeste Asiático e África. Encontram-se divididas em duas grandes subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae (MCVAUGH, 1968).

No Brasil, esta é representada pela subfamília Myrtoideae, tribo Myrteae (WILSON et al., 2005), sendo distribuída em todos os estados, abrangendo 21 gêneros e 707 espécies (SOBRAL et al., 2018). A família possui algumas espécies frutíferas de grande interesse econômico como a pitangueira (*Eugenia uniflora*), a goiabeira (*Psidium guajava*) e as jabuticabeiras (*Plinia peruviana*) (FRANZON et al., 2009).

Os representantes da subfamília Myrtoideae apresentam frutos do tipo baga e folhas opostas, ocorrendo na América em regiões tropicais e subtropicais (BARROSO, 1991; MCVAUGH, 1968). Suas flores são brancas ou, às vezes vermelhas, efêmeras, hermafroditas, de simetria radial, em geral pentâmeras, muitas vezes com o receptáculo bem desenvolvido, polistêmones, ovário ínfero, com variado número de lóculos e óvulos (BARROSO, 1991). Os representantes da Leptospermoideae, por outro lado, apresentam frutos capsulares e filotaxia alterna, distribuídos na Austrália, Malásia e Polinésia (MCVAUGH, 1968).

O gênero *Plinia* L. está distribuído na América Central e Caribe (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). No Brasil, distribui-se em parte do Norte e Nordeste, Mato Grosso do Sul e todos os estados do Sudeste e Sul (SOBRAL et al., 2018). Este gênero reúne cerca de 40 espécies (BARRIE, 2004), contudo no Brasil são estimadas de 20 a 30 (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Anteriormente, o gênero das jabuticabeiras era conhecido como *Myrciaria*, mas em 1998, Mattos reclassificou as mesmas para o gênero *Plinia*. Contudo, *Myrciaria* ainda é amplamente utilizado no meio científico, podendo ser considerado como sinonímia.

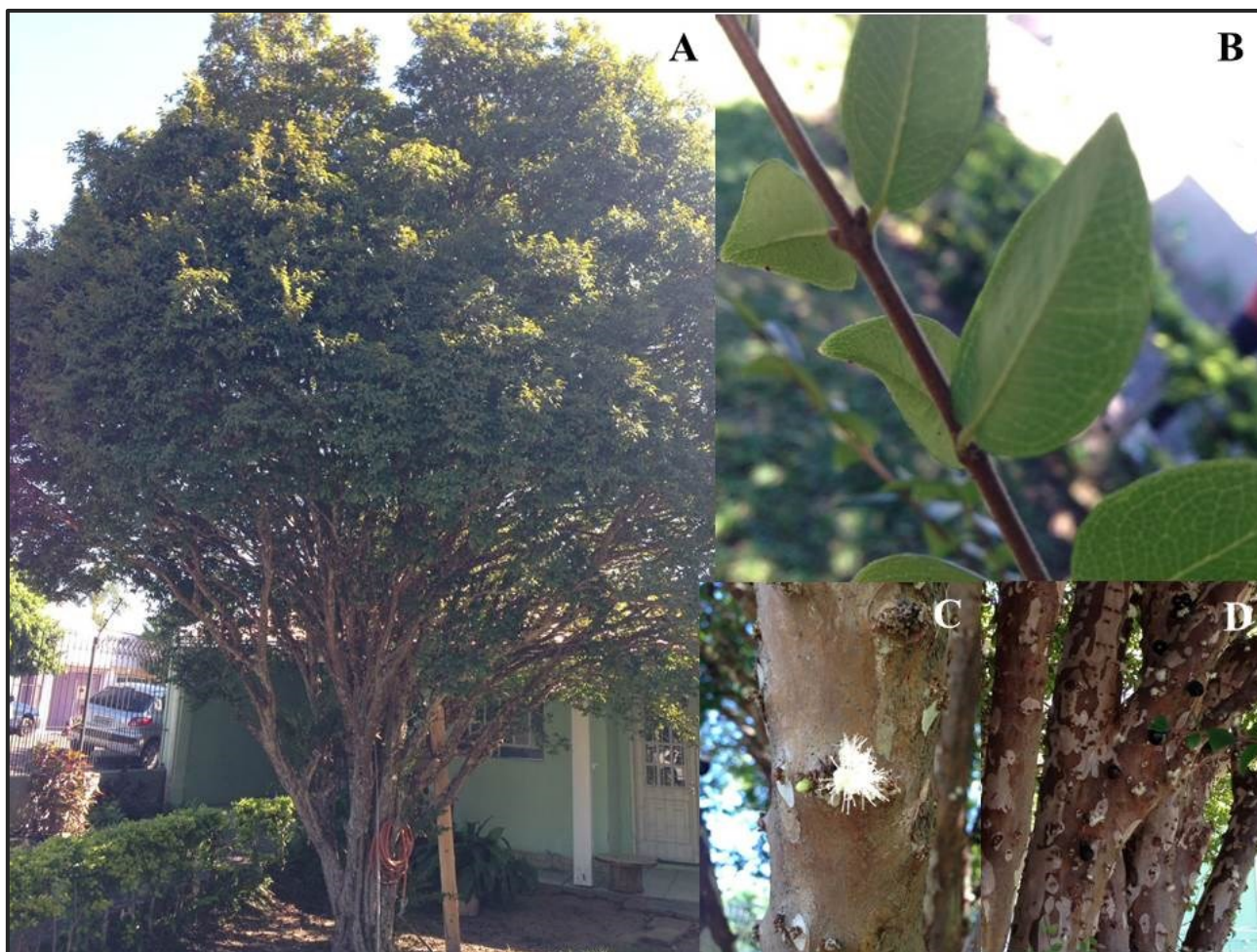
2.1.2 *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts

A espécie *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, pertencente à família Myrtaceae, é uma planta nativa e popular da América do Sul, de ocorrência espontânea no Brasil, a qual pode ser encontrada a partir do estado do Pará até o Rio Grande do Sul (CITADIN; DANNER; SASSO, 2010; COSTA et al., 2013). Conhecida como uva brasileira, jaboticaba, jabotica, guaperu, guapuru, hivapuru, sabará e ybapuru (DONADIO, 2000), *P. peruviana* é uma espécie de grande importância para o país. Seu fruto está presente na alimentação e tem um grande valor nutricional. É utilizado na fabricação de produtos doces, como geleias e está disponível para venda no mercado, mas em pequena escala (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; LEITE et al., 2011).

Trata-se de uma árvore de médio a grande porte (Figura 1A), medindo de 10 a 15 m de altura, apresentando copa com forma variada e com tendência a muitos galhos (DANNER et al., 2010). A casca é lisa e de cor cinza, com ramos delgados, cilíndricos e glabros; as folhas (Figura 1B), opostas e elípticas, incompletas, com bainha ausente e pecíolo presente. A lâmina foliar apresenta entre 2,4 e 4,3 cm de comprimento e 0,6 a 1,6 cm de largura (DONADIO et al., 2002).

As flores (Figura 1C) nascem diretamente dos troncos e ramos da árvore, e os frutos, que são do tipo baya globosa, amadurecem rapidamente, entre 40 e 60 dias. Estes medem de 2 a 4 cm de diâmetro, contendo de 1 a 4 sementes (DANNER et al., 2010). Ao amadurecer, vão adquirindo a coloração roxa escura a preta (Figura 1D). Sua pele é frágil e sua polpa é esbranquiçada, agridoce e mucilaginosa (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011). A floração ocorre entre outubro e janeiro (SOARES-SILVA, 2000).

Figura 1 - *P. peruviana*: (A) Aspecto geral; (B) Folhas; (C) Botão floral e flor; (D) Frutos diretamente dos ramos da árvore.



Fonte: Do autor.

O uso tradicional desta espécie envolve o tratamento da diarreia, que utiliza todas as partes da planta, além de um xarope produzido com as folhas ser utilizado para tosse por populações de vários estados do Brasil, como Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (AGRA et al., 2010). Bieski et al. (2015) também relataram que a casca e as folhas de *P. peruviana* são utilizadas pela população do Vale de Juruena, estado de Mato Grosso, no tratamento da labirintite.

Análises fitoquímicas preliminares revelaram que os compostos fenólicos são os principais constituintes de *P. peruviana*. Diversos estudos relatam nos frutos a presença de ácido gálico, ácido elágico, isoquercitrina, quercimeritrina, quercitrina, miricetina e quercetina (EINBOND et al., 2004; REYNERTSON et al., 2006; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; WU et al., 2012; HACKE et al., 2016; PEREIRA et al., 2017). Os teores

de taninos relatados são significativamente maiores que os demais frutos da família Myrtaceae, como goiaba, camu-camu e pitanga (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012).

Alguns estudos têm se concentrado nas antocianinas, compostos fenólicos presentes em diversas frutas, folhas e flores, sendo responsável pelas colorações vermelha, azul e violeta (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010; LEITE-LEGATTI et al., 2012; WU et al., 2012; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012). São frequentemente associados às propriedades biológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativas, assim como também tem sido relatada na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (TSUDA et al., 2003; BRITO et al., 2007), enquanto que as sementes possuem altas concentrações de elagitaninos e proantocianidinas (ALEZANDRO et al., 2013).

Biologicamente, extratos da casca da jaboticaba demonstraram efeito positivo em diabetes induzida em ratos (ALEZANDRO et al., 2013), além de efeitos hipolipemiantes (ARAÚJO et al., 2013). Os polifenóis da fruta mostraram aumentar a atividade antioxidante sérica e diminuir o teor de glicose em humanos saudáveis (PLAZA et al., 2016).

O efeito antiproliferativo do extrato aquoso da semente de *P. peruviana* foi avaliado por Wang et al. (2014) e demonstrou resultados promissores contra a linhagem de células de câncer de boca (HSC-3). Efeitos antiproliferativos foram também verificados a partir de extratos polares obtidos da casca da jaboticaba, testados contra linhagem leucêmica (K-562) e câncer de próstata (PC-3), sendo citotóxicos a 1.9 µg / mL e 13.8 µg / mL, respectivamente (LEITE-LEGATTI et al., 2012). Da mesma forma, compostos flavonoides extraídos da mesma espécie apresentaram efeitos antiproliferativos contra linhagens celulares de cólon HT-29 e HCT 116 (REYNERTSON et al., 2006).

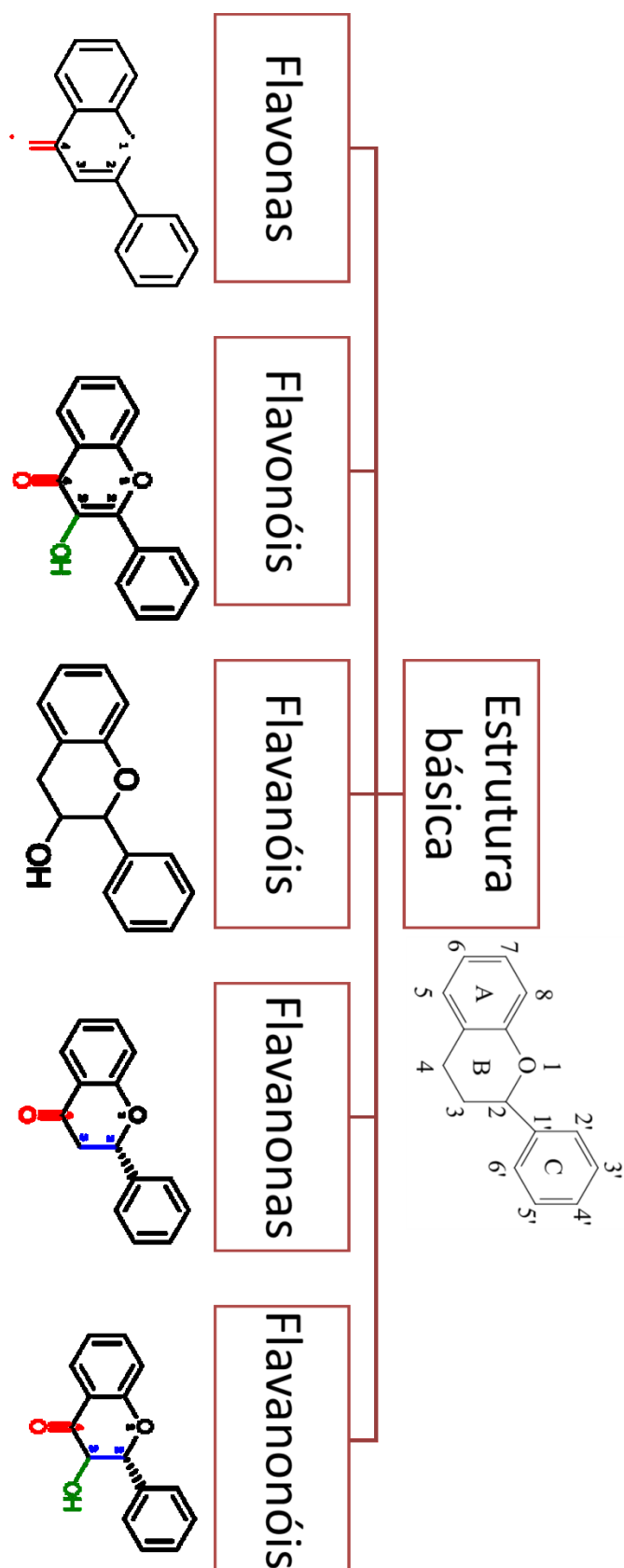
Outro importante uso popular da “jaboticaba” no Brasil é para o tratamento da asma. No estudo de Wu (2013), um composto isolado (jaboticabina) diminuiu a produção de interleucina-8 (IL-8) em 47,3% nas células epiteliais de pequenas vias aéreas expostas à fumaça do cigarro e diminuiu a produção de IL-8 em 81,3% nas células não tratadas. Estes dados corroboram com o estudo de Reynertson et al. (2006), com as antocianinas de *P. peruviana*, sugerindo uma importante ação anti-inflamatória desses compostos. Apesar destes estudos a eficácia do uso tradicional da espécie, conforme descrito na literatura, permanece incerta. Estudos farmacológicos detalhados precisam ser realizados para ajudar a preencher essa lacuna na literatura.

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS: classificação química e propriedades biológicas

A capacidade das plantas em sintetizar uma grande variedade de compostos com baixo peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários, é uma de suas características mais importantes. Estes contêm um anel aromático que comporta pelo menos um grupamento hidroxila (VALDES et al., 2015). Metade dos compostos fenólicos são flavonoides, apresentando-se como aglicona, glicosídeos e derivados metilados (KANG et al., 2018). Estas substâncias têm sido relatadas como eficazes antioxidantes, antibacterianos, agentes cardioprotetores, anti-inflamatórios (RAUF et al., 2018; SEITZ et al., 2018; MUHAMMAD et al., 2018), além de promissores candidatos a agentes anticancerígenos (ZHU et al., 2018; YANG; ZHU; XI et al., 2018).

Os flavonoides são um grupo de compostos naturais com estrutura polifenólica, amplamente encontrados em vegetais, frutas e, como corantes naturais, adicionados a certas bebidas. Os flavonoides compreendem dois anéis aromáticos (A e B) conectados por meio de um anel pirano heterocíclico (C). Eles são classificados em diferentes subclasses com base no carbono do anel C conectado ao anel B e no grau de oxidação e insaturação do anel C. Na maioria dos flavonoides, o anel B é conectado ao carbono C-2 do anel C. Esses compostos incluem flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, flavanonóis e antocianidinas (Fig. 2). Os compostos de flavonol diferem das flavanonas por uma ligação dupla C-2 a C-3 e um grupo hidroxila na posição C-3. Os flavonoides nos quais o anel B está conectado ao carbono C-3 do anel C são denominados isoflavonas. Aqueles em que o anel B está ligado ao carbono C-4 do anel C são chamados neoflavonoides (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Figura 2 - Estrutura das principais subclasses de flavonoides.

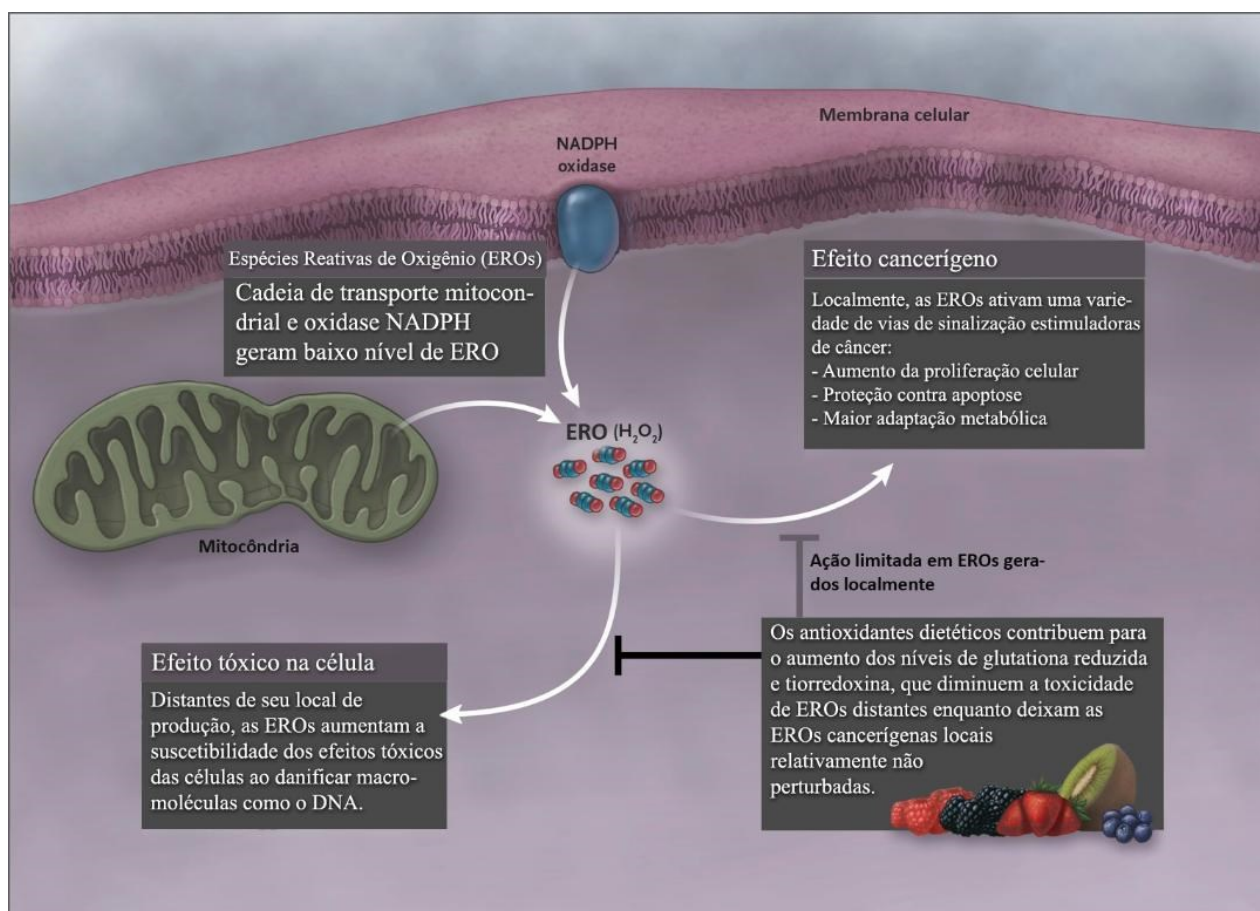


Fonte: Adaptado de Bakoyiannis et al. (2019).

É importante ressaltar que os flavonoides são agentes neutralizadores de radicais livres. Durante a produção de adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas como subprodutos dessas reações redox celulares. No nível do equilíbrio, EROs e o ERNs são compostos benéficos para funções celulares e respostas imunes, mas a concentração de desequilíbrio levará ao estresse oxidativo que pode causar distúrbios crônicos e degenerativos (THABIT et al., 2018).

As plantas medicinais têm sido relatadas há muito tempo como um centro prospectivo de compostos antioxidantes naturais, particularmente por seus metabólitos secundários, compostos fenólicos e flavonoides que são gerados para sua defesa ou para promover seu crescimento em condições desfavoráveis. Além disso, o arranjo de grupos funcionais, a configuração, a substituição e o número de grupamentos hidroxila também influenciam a atividade antioxidante dos flavonoides, os quais desempenham essa função através da atividade sequestradora de radicais livres e / ou a capacidade de quelação de íons metálicos (RYBARCZYK-KASIUCHNICZ; RAMLAU, 2018). A Figura 3 ilustra o dano celular causado pelas EROs e o mecanismo de defesa antioxidante.

Figura 3 - Efeito antioxidante das plantas medicinais.



Fonte: Adaptado de Chandel e Tuveson (2014).

Neste contexto, um dos métodos para determinação da atividade antioxidante é o da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). O ensaio mede a perda de fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo devido à formação de radicais peroxil pela quebra de dicloridrato de 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida (AAPH) a 37 °C. O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico (Trolox), um análogo da vitamina E solúvel em água, serve como um controle positivo que inibe o decaimento da fluoresceína de um modo dependente da dose (OU et al., 2001).

Nesse sentido, a extração de compostos fenólicos é um passo importante tanto para a identificação e quantificação, quanto para a avaliação da capacidade antioxidante e potenciais biológicos das plantas medicinais. Embora métodos tradicionais e convencionais tenham sido amplamente empregados ao longo dos anos, durante as últimas décadas, métodos mais avançados têm sido utilizados (NGAMWONGLUMLERT; DEVAHASTIN; CHIEWCHAN, 2017).

Algumas das técnicas modernas são extrações assistidas por ultrassom e por micro-ondas. Estes métodos são simples, com tempos de extrações curtos, além do baixo consumo de solventes. A extração utilizando energia de micro-ondas fornece condições suaves e alcança um efeito superior de extração (GARCIA-CASTELLO et al., 2015).

Já a extração ultrassônica garante um contato suficiente da matriz da amostra com o solvente de extração, levando, assim, a uma extração mais eficiente do que a técnica assistida por micro-ondas, devido à produção de bolhas de cavitação na matriz biológica (PUTNIK et al., 2018). Neste sentido, o extrato obtido por Ouahida, Ridha e Eddine (2016) através do método de ultrassom, apresentou maiores teores de compostos fenólicos e potencial antioxidante, quando comparados às outras técnicas (Soxhlet e maceração).

2.3 O CÂNCER E SEU TRATAMENTO

O câncer é um dos problemas de saúde mais importante em todos os países devido à sua crescente prevalência, tratamento de alto custo, sendo a segunda principal causa de morte no mundo após as doenças cardiovasculares (WOJCIK et al., 2018). O câncer refere-se à doença que se desenvolve quando células anormais proliferam incontrolavelmente, seguidas de invasão nos tecidos circundantes e que eventualmente se espalham para os órgãos ou outras partes do corpo através dos sistemas circulatório e linfático. A inicialização das células cancerígenas geralmente depende de mutações nos genes relacionados à regulação do ciclo celular, apoptose e / ou vias de sinalização do fator de crescimento, que podem ser induzidas por mutações no DNA mediadas pelas EROs (SEYED et al., 2016; MILLER et al., 2016).

Nas últimas décadas, vários métodos de tratamento foram desenvolvidos contra o câncer depois de adquirir uma compreensão mais profunda de múltiplos sinais e mecanismos subjacentes que contribuem para a sobrevivência e progressão das células neoplásicas. Essas modalidades de tratamento incluem quimioterapia, terapia direcionada, imunoterapia, cirurgia e radioterapia (ASADI-SAMANI et al., 2016, LIU et al., 2019). Nesse sentido, muita atenção tem sido dada aos antioxidantes como nova estratégia terapêutica para o câncer (FERRAZ DA COSTA et al., 2018; KOCOT et al., 2018).

Entre os fitoquímicos, os flavonoides despertaram o interesse dos pesquisadores e estão sendo investigados para aplicações terapêuticas contra a progressão do câncer nos últimos anos, tanto em sistemas de modelos animais (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2019) quanto celulares (SHEN et al., 2019). Eles exibem uma vasta gama de efeitos nos mecanismos

moleculares de iniciação e progressão do câncer, incluindo a indução de apoptose por clivagem de DNA, inibindo a atividade da topoisomerase I ou II, permeabilização mitocondrial, inibindo enzimas cruciais na transdução de sinal (ou seja, proteases), metabolismo celular ou inibindo a angiogênese induzida pelo tumor (TAVSAN; KAYALI, 2019).

A avaliação do potencial anticancerígeno de extratos vegetais pode ser realizada *in vitro* (DE ALMEIDA et al., 2005; SUGGITT; BIBBY, 2005; ALBERTS et al., 2008), através de métodos de *screening* biológicos, com cultura de células, onde os resultados obtidos são livres de qualquer interferência metabólica, fisiológica ou ambiental. Mas, por se tratar de um ambiente artificial, é preciso verificar também se as análises realizadas com sucesso *in vitro* também teriam um resultado satisfatório *in vivo*. A etapa pré-clínica é fundamental para a decisão da continuidade ou não da investigação acerca da nova substância (BRANDÃO et al., 2010).

Um dos ensaios amplamente utilizados em linhagens de células tumorais, de baixo custo, é o ensaio colorimétrico que usa o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) descrito por Mosmann em 1983. Este se baseia na redução do MTT pela succinato desidrogenase mitocondrial, que cliva o anel tetrazólio, transformando um composto de coloração amarela na coloração azul-escuro (formazan), que reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A densidade ótica é medida com um leitor de microplacas. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis (BHATIA; YETTER, 2008).

Assim, a descoberta de novos anticancerígenos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. Os agentes anticâncer mais utilizados na clínica ainda são os alcaloides da Vinca (*Catharanthus roseus*), epipodofilotoxinas (*Podophyllum peltatum* L.), taxanos (*Taxus brevifolia* Nutt) e camptotecinas (*Camptotheca acuminata* Decne) (ASADI-SAMANI et al., 2016). Portanto, a busca de novos medicamentos tem nos produtos naturais uma promissora fonte de novos fármacos.

2.4 HEPATOTOXICIDADE

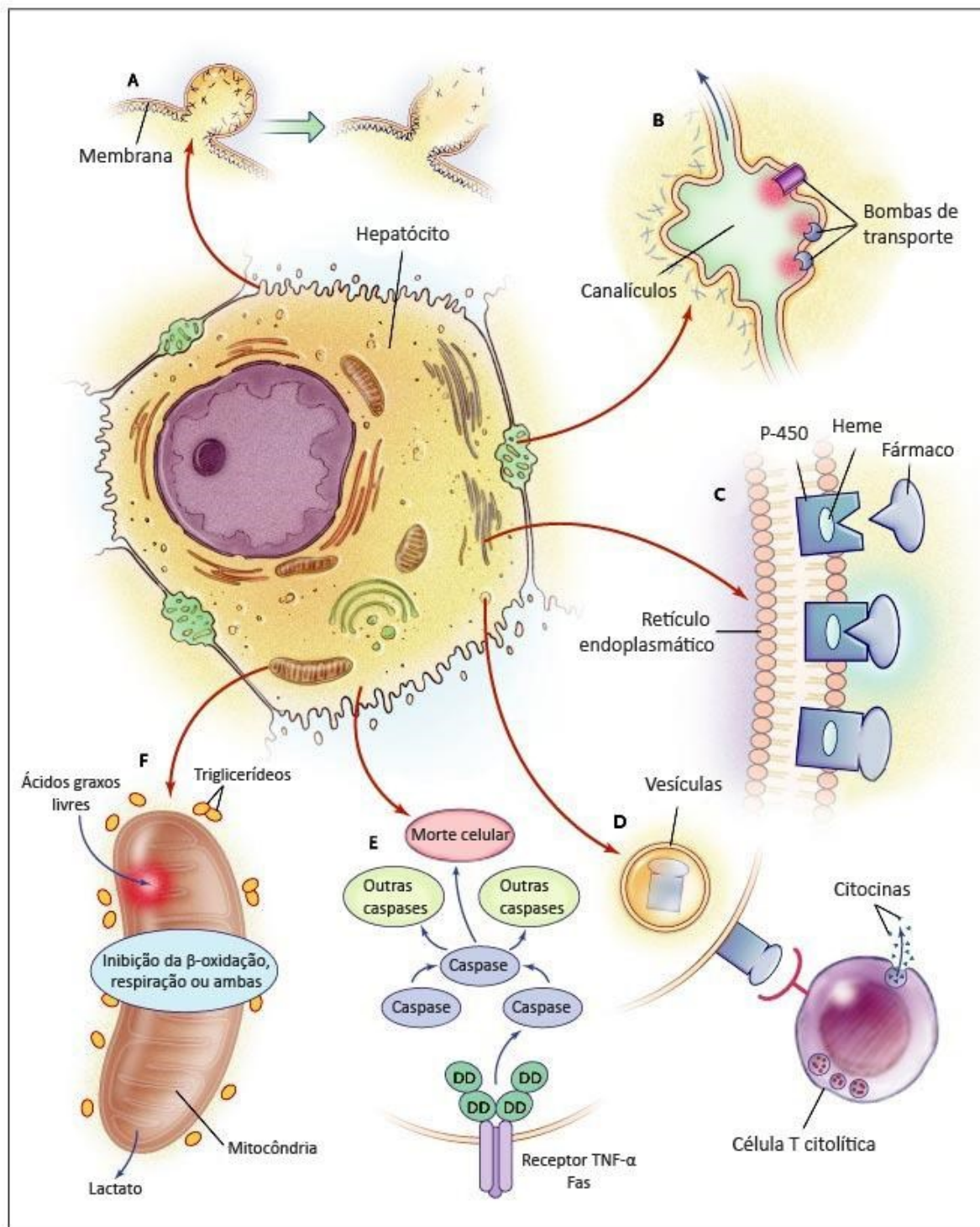
O fígado tem um papel crucial na regulação de múltiplas funções metabólicas e processos fisiológicos, como o metabolismo de nutrientes, a secreção biliar e a síntese de proteínas, lipídios e carboidratos, bem como o armazenamento de vitaminas. Sua capacidade de desintoxicar xenobióticos torna particularmente importante na manutenção da saúde do

corpo. As doenças hepáticas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (MENG et al., 2018). Neste sentido, houve 462 casos de retirada de medicamentos do mercado nas últimas seis décadas devido às reações adversas, sendo o motivo mais comum a hepatotoxicidade (ONAKPOYA; HENEGHAN, ARONSON, 2016), sugerindo a necessidade de desenvolver novas e seguras opções de tratamento.

Estilos de vida pouco saudáveis, relacionados à obesidade e ao consumo excessivo de álcool e medicamentos, são causas comuns de lesão hepática. As doenças hepáticas também podem ser induzidas por fatores biológicos (bactérias, vírus e parasitas) e doenças autoimunes (hepatite imune e cirrose biliar primária). Pelo menos seis mecanismos (Figura 4) podem produzir lesão hepática (JAESCHKE et al., 2002):

- 1) Reações de alta energia envolvendo enzimas do citocromo P₄₅₀ levam à ligação covalente do fármaco às proteínas intracelulares, aparentemente produzindo uma disfunção intracelular que resulta na perda de gradientes iônicos, declínio nos níveis de ATP e ruptura de actina (Figura 4A);
- 2) Alguns medicamentos afetam as proteínas de transporte na membrana podendo interromper o fluxo biliar (Figura 4B);
- 3) A biotransformação dos medicamentos pode resultar na formação de adutos (substâncias ligadas covalentemente a enzimas). Estes, são grandes o suficiente para servir como alvos imunológicos, podendo migrar para a superfície do hepatócito, podendo induzir a formação de anticorpos (citotoxicidade mediada por anticorpos) ou respostas de células-T citolíticas diretas (Figura 4C e Figura 4D).
- 4) A morte celular programada (apoptose) pode ocorrer em conjunto com a lesão imunomediada, destruindo os hepatócitos por meio do fator de necrose tumoral (TNF- α) e das vias Fas, com retração celular e fragmentação da cromatina nuclear (Figura 4E).
- 5) Quando os medicamentos se ligam ou inativam enzimas de cadeia respiratória ou do DNA mitocondrial, ocorre estresse oxidativo, com consequente metabolismo anaeróbico, acidose láctica e acúmulo de triglicerídeos (Figura 4F).

Figura 4 - Mecanismos envolvidos no dano ao hepatócito.



Fonte: Adaptado de Lee (2003).

Apesar dos avanços nas pesquisas, não existe uma abordagem terapêutica bem-sucedida em relação à estimulação da função hepática, proteção do fígado ou aumento da regeneração das células hepáticas. Os fármacos atuais como a silimarina, substância

hepatoprotetora mais conhecida que tem como mecanismo de ação o bloqueio da geração de radicais livres, tem mostrado limitações em relação ao tratamento da insuficiência hepática crônica, como a cirrose (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2018), mas seu uso é bem estabelecido como padrão hepatoprotetor para o método de intoxicação por tetracloreto de carbono (CCl_4) (CHAO et al., 2019; LEE et al., 2019).

A intoxicação por CCl_4 tem sido amplamente utilizada para a indução experimental de lesão hepática aguda, e é o modelo mais comumente utilizado para o rastreamento da atividade hepatoprotetora de extratos vegetais e compostos (DUTTA et al., 2018). O CCl_4 é biotransformado pelo sistema do citocromo P_{450} para produzir os radicais livres de triclorometila ($\text{CCl}_3\cdot$), que por sua vez se ligam covalentemente a membranas e organelas celulares para induzir a peroxidação lipídica. Isso leva ao comprometimento de vários processos celulares que culminam em danos às células necróticas, inflamação e apoptose (SHENOY; SOMAYAJI; BAIRY, 2002).

A intoxicação por CCl_4 provoca necrose hepática e aumento dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) no soro, assim como nas doenças hepáticas (ELUFIOYE; HABTEMARIAM, 2019). O aumento da AST e da ALT é explicado pelo fato de serem liberadas no sangue em grandes quantidades frente a um dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade e necrose hepática. Já a FA está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares e tem sua concentração elevada nas desordens do trato biliar (TELLI et al., 2016). Além disso, a enzima Adenosina deaminase (ADA) é produzida e liberada por linfócitos e macrófagos durante a resposta imune celular, sendo um biomarcador de inflamação ou doença infecciosa (KISHIMOTO et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar o teor de polifenóis e flavonoides totais, a atividade antioxidante e antiproliferativa *in vitro* das folhas de *Plinia peruviana* além de avaliar o possível efeito hepatoprotetor *in vivo*.

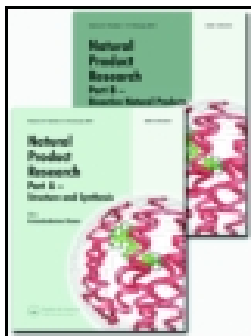
3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o teor de flavonoides e polifenóis totais do extrato bruto através de técnicas espectrofotométricas;
- Caracterizar quimicamente o extrato de *P. peruviana* através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) os polifenóis ácido gálico, catequina, epicatequina e rutina;
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* através do ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC);
- Avaliar o possível efeito antiproliferativo pelo tratamento do extrato em culturas de células de câncer de mama (MCF-7) e câncer cervical (HeLa);
- Avaliar a possível atividade hepatoprotetora em modelo experimental *in vivo*, através da indução de dano hepático com tetracloreto de carbono (CCl₄).

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos. Esta tese inclui ainda seções de discussão geral, de conclusões e de referências que estão relacionadas à introdução, revisão bibliográfica e discussão geral.

Os resultados relacionados à análise fitoquímica, atividade antioxidante e antiproliferativa *in vitro* das folhas de *P. peruviana* estão no artigo intitulado “*Preliminary phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and anti-proliferative effects of Plinia peruviana leaves: an in vitro approach*”, que foi publicado no periódico *Natural Product Research*. Já os resultados da atividade hepatoprotetora estão no segundo manuscrito, ainda não publicado, submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters


ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


Preliminary phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and anti-proliferative effects of *Plinia peruviana* leaves: an *in vitro* approach

Greice Graziela Moraes, Maiara Mazziero, Marina Lovatto, Rafaela Castro Dornelles, Daniele Rubert Nogueira-Librelotto, Cézane Priscila Reuter, Silvio Ortolan, Chana de Medeiros da Silva & Melânia Palermo Manfron


To cite this article: Greice Graziela Moraes, Maiara Mazziero, Marina Lovatto, Rafaela Castro Dornelles, Daniele Rubert Nogueira-Librelotto, Cézane Priscila Reuter, Silvio Ortolan, Chana de Medeiros da Silva & Melânia Palermo Manfron (2019): Preliminary phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and anti-proliferative effects of *Plinia peruviana* leaves: an *in vitro* approach, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1602827](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602827)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602827>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 12 Apr 2019.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 44

 View Crossmark data [↗](#)

SHORT COMMUNICATION



Preliminary phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and anti-proliferative effects of *Plinia peruviana* leaves: an *in vitro* approach

Greice Graziela Moraes^a, Maiara Mazziero^a, Marina Lovatto^a, Rafaela Castro Dornelles^b, Daniele Rubert Nogueira-Librelotto^c, Cézane Priscila Reuter^d, Silvio Ortolan^e, Chana de Medeiros da Silva^f and Melânia Palermo Manfron^a

^aPharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil; ^bPharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil; ^cDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil; ^dHealth Promotion, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul State, Brazil; ^ePharmaceutical, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul State, Brazil; ^fDepartment of Biology and Pharmacy, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

ABSTRACT

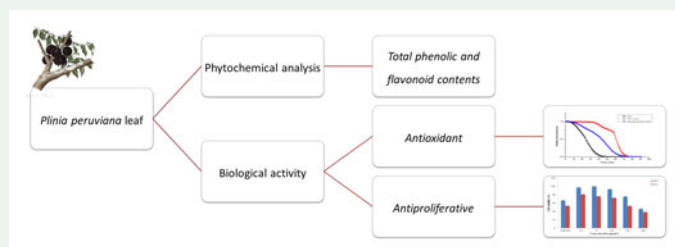
Plinia peruviana (Poir.) Govaerts (Myrtaceae) occurs from Pará to Rio Grande do Sul states, Brazil. The leaf extract of this species was investigated. The total of polyphenols and flavonoid contents were determined by spectrophotometric techniques. Antioxidant activity by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and anti-proliferative activity was tested against the MCF-7 and HeLa lines. The amount of polyphenols from the lyophilized extract was 944 ± 0.0856 mg GAE/g, moreover, total flavonoid content of the extract of 531.8 ± 0.0040 mg RE/g extract. This study performed the first pharmacological exploration of the leaves of *P. peruviana*. Our results demonstrated the antioxidant and anti-proliferative effects of this specie on MCF-7 and HeLa cell lines. This makes this specie an interesting medicinal plant for human epithelial cervical cancer and human breast cancer anti-proliferative approach.



ARTICLE HISTORY


Received 10 October 2018
Accepted 24 March 2019

KEYWORDS

Plinia peruviana; medicinal plants; MTT assay; cytotoxicity; MCF-7; HeLa



CONTACT Greice Graziela Moraes  greicemoraes@yahoo.com.br  Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences – Federal University of Santa Maria, Av. Roraima n° 1000, Bloco 26, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS state, Brazil

 Supplemental data article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602827>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

In recent years, it has been observed that the number of studies reporting antioxidant activities of natural products has increased considerably since phenolic compounds inhibit the formation of free radicals and maintain normal redox regulation of the human body (Gill and Tuteja 2010). Such facts drive the search for antioxidant and anticancer compounds from natural sources (Ghasemzadeh et al. 2018; Galasso et al. 2018; Abubakar et al. 2018).

In this context, the family Myrtaceae is considered one of the most important in Brazil and the dominant woody family in southeastern Atlantic Forest (Citadin et al. 2010; Costa et al. 2013). The leaves of various species of this family have been used in folk medicine for their interesting bioactivities such as antifungal, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant properties. These activities were mainly related to the presence of flavonoids (Dias et al. 2018; Falcão et al. 2018; Souza-Moreira et al. 2018).

The species *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts (Jabuticabeira), belonging to the family Myrtaceae, occurs from the state of Pará to Rio Grande do Sul state, Brazil (Citadin et al. 2010; Costa et al. 2013). The fruits of this species have traditionally been used for their medicinal values, including antidiarrheal effects, as well as for respiratory problems, asthma and chronic inflammation of the tonsils (Morton 1987).

Despite the established phytochemical values for the fruits, the biological activities of the leaves of this species remain largely unknown. In this sense, this report is the first phytochemical investigation of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *P. peruviana*. In addition, this work was set to determine the in vitro antioxidant activity, total phenols and flavonoids and anticancer activities on breast (MCF-7) and cervical (HeLa) cancer cell lines.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The leaves of the plant were collected in Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil (29S 44'47.5"/52W 21'24.2"), in October 2017. Dr. Renato Aquino Záchia identified the plant material and a sample was deposited (voucher 17.753) at the Herbarium of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

2.2. Preparation of extract

The extraction process was performed according to the method of Strzemski et al. (2017). The plant was dried in an air circulation oven and then reduced to powder. The hydroalcoholic extract of *P. peruviana* was prepared in 70% ethanol (1/10 weight/volume ratio) by ultrasonic bath (KQ-3200DE, 300 × 150 × 150 mm, SHUMEI, Kunshan, China) for 30 minutes at room temperature and its residue extracted again. After that, it was concentrated on a rotary evaporator (Buchi RII) under reduced pressure at 40 °C, lyophilized and stored under refrigeration.

2.3. Analysis of the phenolic content

2.3.1. Total phenolics content

Total phenolic content of *P. peruviana* samples was determined by Folin-Ciocalteu assay as reported by Chandra and de Mejia (2004) with slight modification. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dried extract (mg GAE/g).

2.3.2. Total flavonoids content

The flavonoid contents of *P. peruviana* were estimated by the method described by Zhishen et al. (1999). The determination of total flavonoids was performed with the colorimetric aluminum chloride assay. The results were expressed as milligrams of rutin equivalents per gram of dried extract (mg RE/g).

2.3.3. Analysis of phenolic compounds high efficiency liquid chromatography coupled to diode array detector (HPLC-DAD)

The phenolic compounds were identified by HPLC/DAD analysis according to (Evaristo and Leitão, 2001), with minor modifications. For the separation of the compounds, the liquid chromatograph (SHIMADZU, Kyoto/Japan) was used, model pump LC – 20AT, automatic injector SIL – 20A, DAD SPD - M20A detector and CBM 20A communicator and controlled by LC SP1 software. The analytical column used was Shim-pack CLC-ODS (M), particle with 5 µm in diameter, dimensions of 4.6 mm X 150 mm. The elution occurred by gradient in a flow of 0.9 mL/min using two mobile phases: A, composed of 2% acetic acid in water and B, only methanol UV/HPLC. The injection volume of the samples was 40 µL, and the detection was monitored in the photodiode system at wavelengths between 230 and 400 nm for 55 minutes.

Identification was performed by integrating the peaks using the standard external method, at 270 nm for gallic acid; 278 nm for catechin and epicatechin; and 365 nm for rutin. Chromatographic peaks were confirmed by comparing the retention time with the reference standards and by the DAD spectrum (200–600 nm). All chromatographic operations were performed at room temperature.

2.4. Antioxidant assays

2.4.1. Assay of the absorption capacity of the oxygen radical (ORAC)

The ORAC assay was performed, according to Ou et al. (2001) using a black 96-well microplate. The method consists in verifying the ability of the sample to sequester free radicals against the peroxy radical, induced by 2,2'-azobis-(2-methylpropanoamide) (AAPH). The sample (10 ppm) and the Trolox standard were diluted in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) and mixed with fluorescein (81 nM) and AAPH (152 mM). The reaction occurred at 37 °C and fluorescence (λ excitation = 485 nm and λ emission = 528 nm) was monitored (SpectraMax® M3) every minute for 91 minutes. The antioxidant capacity was determined using area under the curve (AUC) and the results were compared with a Trolox analytical curve (2 to 96 µmol/L) and expressed in µmol Trolox Equivalent (TE) per gram of dry extract. The analyzes were done in triplicates and on alternate days.

Table 1. Polyphenols and flavonoids contents of the lyophilized hydroalcoholic extract of *P. peruviana* leaves.

Assay	<i>P. peruviana</i>	Standard curve	R^2
Total phenolics ¹ (mg of GAE/g \pm SD) ²	944 \pm 0.0856	$y = 0.0027x + 0.0082$	0.9985
Total Flavonoids ¹ (mg of RE/g \pm SD) ³	531.8 \pm 0.0040	$y = 0.0022x + 0.019$	0.9975

¹Values presented in mean \pm standard deviation of triplicate assays.

²Total phenolic compounds expressed as mg EAG per g extract.

³Total flavonoids expressed as mg RE per g extract.

2.5. *In vitro* antiproliferative activity

2.5.1. Cell culture, treatments and cytotoxicity assay

The tumor cell lines HeLa (human epithelial cervical cancer) and MCF-7 (human breast cancer) were used as *in vitro* models to study the antitumor activity of the extract. All cells were grown in DMEM medium (4.5 g/l glucose), supplemented by 10% (v/v) FBS, at 37 °C with 5% CO₂. They were routinely cultured in 75 cm² culture flasks and harvested using trypsin-EDTA, when the cells reached approximately 80% of confluence. As a positive control, it was used vinblastine at the concentration of 10 μ g/mL.

HeLa (8.5 \times 10⁴ cells/ml) and MCF-7 (1 \times 10⁵ cells/ml) cell lines were seeded into the 60 central wells of 96-well cell culture plates in 100 μ l of complete culture medium. Cells were incubated for 24 hours under 5% CO₂ at 37 °C and the medium was then replaced with 100 μ l of fresh medium, supplemented by 5% (v/v) FBS, containing the extract at the concentration range of 25–500 μ g/ml. Untreated control cells were exposed to medium with 5% (v/v) FBS only. The cell lines were exposed for 24 hours to each treatment, and their viability was assessed by the MTT assay.

The MTT endpoint is based on the protocol first described by (Mosmann, 1983), which is a measurement of cell metabolic activity. After complete the cell treatment time, the medium was removed, and 100 μ l of MTT in PBS (5 mg/ml) diluted 1:10 in medium without FBS was then added to each well. The microplates were further incubated for 3 h under 5% CO₂ at 37 °C, after which the medium was removed. Thereafter, 100 μ l of DMSO was added to each well to dissolve the purple formazan product. Plates were then placed on a microtiter-plate shaker for 10 min at room temperature, and the absorbance of the resulting solutions was measured at 550 nm using a Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) microplate reader. Cell viability was calculated as the percentage of tetrazolium salt reduced by viable cells in each sample.

The cytotoxicity of each sample in each cell line was expressed as percentage of viability with regard to untreated control cells (the mean optical density of untreated cells was set at 100% viability), and in terms of its IC₅₀ (concentration causing 50% death of the cell population), calculated for each cell line by curve fitting of percent cell survival against the extract concentrations.

2.6. Statistical analysis

The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc*. The results were expressed as mean \pm SD and $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

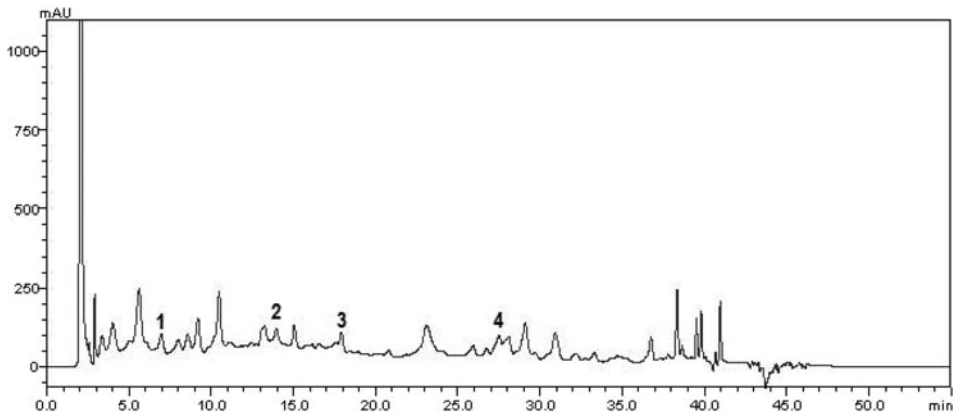


Figure 1. Representative high-performance liquid chromatography profile of extract of *P. peruviana*. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), epicatechin (peak 3), and rutin (peak 4).

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic and flavonoid contents

Total phenolic content of *P. peruviana* was carried out based on the reaction of the samples with Folin-Ciocalteu reagent, which results in a blue colored solution, which intensity was directly proportional to the amount of phenolic compounds present. Total phenolic (TP) and flavonoid contents (FC) are reported in Table 1. TP and FC were 944 ± 0.0856 mg GAE/g and 531.8 ± 0.0040 mg RE/g, respectively. Previous studies reported that TP for leaves of the Myrtaceae family, such as *Plinia edulis*, was 54.34 ± 0.02 mg/g extract (Carvalho et al. 2012). In relation to plants of the same species, only fruit studies were found, reporting 320 mg GAE/g extract (Leite-Legatti et al. 2012).

The FC found in our study was lower than the fruits of the same species according to the previous study that presented $FC = 642.99 \pm 25.75$ mg/g (Batista et al., 2017), but was higher than the leaves of the same family (*Plinia edulis*), reporting FC of 35.16 ± 0.01 mg/g (Carvalho et al. 2012).

3.2. Analysis of the phenolic compounds of the extract by HPLC-DAD

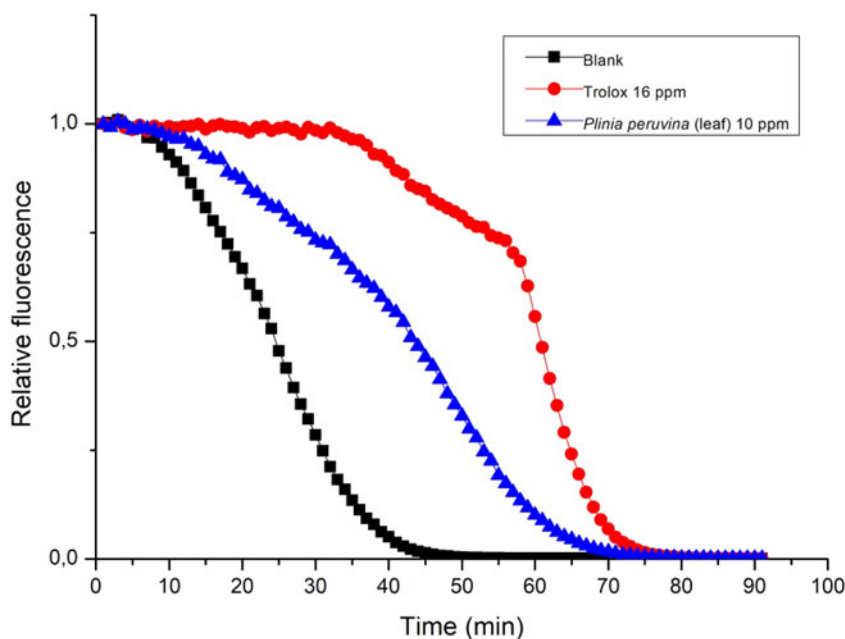
In the present work, the HPLC profile of *P. peruviana* was also acquired (Figure 1). We identified the presence of polyphenols gallic acid, catechin, epicatechin and rutin (Figure 1). The retention times (Rts) of the identified compounds were: gallic acid (Rt = 6.55 min, peak 1), catechin (Rt = 13.97 min, peak 2), epicatechin (Rt = 17.89 min, peak 3) and rutin (Rt = 27.86 min, peak 4). The amount of each compound is shown in Table 2.

Data from the literature indicate the presence of phenolic compounds such as quercetin, isoquercitrin, quercitrin, myricetin, rutin, cinnamic acid, camarinoic acid, gallic acid and ellagic acid in fruits of the same species (Reynertson et al. 2006; Pereira et al., 2017; Neves et al., 2018). Some of these compounds were not identified in the leaves, but we also reported the presence of catechin and epicatechin.

Table 2. Components of the lyophilized hydroalcoholic extract of *P. peruviana* leaves.

Compounds	<i>P. peruviana</i> extract (mg/g)	Standard curve	R^2
Galic acid	2.64 ± 0.88	$y = 101410x - 584506$	0.9846
Catechin	15.90 ± 13.06	$y = 22838x + 226382$	0.9971
Epicatechin	19.42 ± 28.17	$y = 16801x - 54924$	0.9983
Rutin	6.23 ± 10.45	$y = 39560x - 5804,2$	0.9922

Values presented in mean \pm standard deviation of triplicate assays.

**Figure 2.** Antioxidant activity of *P. peruviana* in the ORAC assay.

3.3. Antioxidant activity

Natural products, due to their composition of phenolic compounds, are reported as potential anti-proliferative and antioxidant agents (Abdul Wahab et al. 2018). The extract prepared from the leaves of *P. peruviana* presented promising antioxidant activity by the ORAC assay. The relative fluorescence measured over time defines the antioxidant potential of the compounds over the Trolox standard (Figure 2). *P. peruviana* showed a fall in fluorescence that remained between the values measured by AUC.

Through the equation of the line ($y = 0.484x + 5.0528$), a value of $1941.1 \pm 717.65 \mu\text{M TE/g}$ of *P. peruviana* was obtained. To date, no studies have reported the antioxidant activity of leaves of this species, but, Leite-Legatti et al. (2012) evaluated the antioxidant activity of the freeze-dried dry extract of Jaboticaba hulls and for whole fresh fruits ($5230.4 \mu\text{M ET/g}$ and $1511 \mu\text{M TE/g}$, respectively).

Similarly, the *in vitro* antioxidant activity of leaves of *Calyptanthus tricona* (Myrtaceae), found ORAC values of $56165.79 \pm 1212.84 \mu\text{M TE/g}$ and $2021.51 \pm 127.60 \mu\text{M TE/g}$ for ethanolic and hexanic extracts, respectively (Kich et al. 2017). This property is related to the concentration of phenolic compounds present in

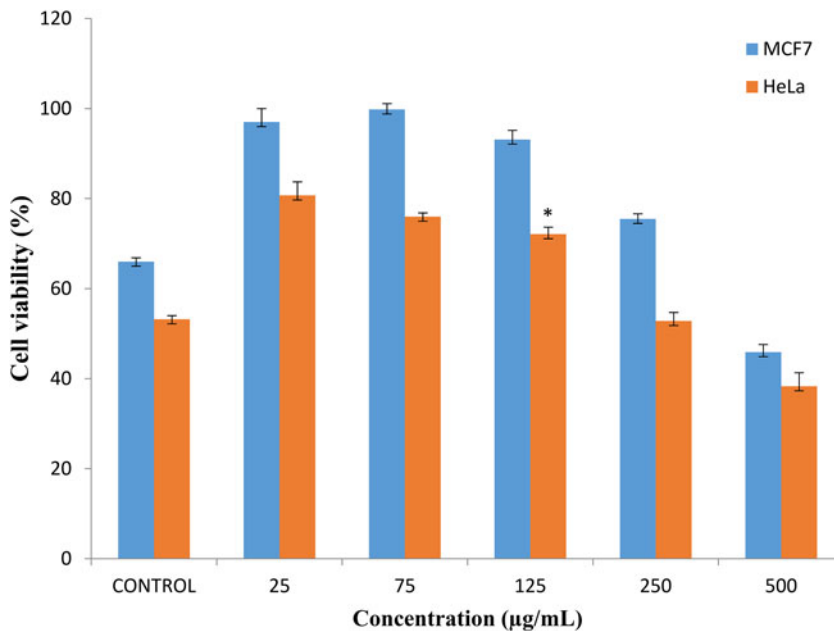


Figure 3. The cell rate of cells after 24 hours of treatment with extracts was extracted from more significant cytotoxic activity in the HeLa line. Control = Vinblastine 10 µg/mL. Cell viability was assessed using the MTT assay. * $p < 0.05$ compared with MCF-7.

the extract, since these compounds are considered excellent natural antioxidants (Afrin et al. 2018).

3.4. Antiproliferative activity

One of the strategies for the discovery of new anticancer substances is the search for natural products with antioxidant properties and cytotoxic effects (El Abed et al. 2018). Chemotherapy is generally employed in the cancer treatment. However, a large number of side effects is its limitation. Thus, it is interesting to seek for the alternative treatments for cancer that are no side effects and not so expensive cost (Tungmunnithum et al. 2018).

Considering the antioxidant activity of the extract of this species, we tested the anti-proliferative activity against the MCF-7 and HeLa cell lines (Figure 3). To date, no studies have been found that evaluated the anti-proliferative effect of leaf extract of this species.

After a 24 hr treatment, the IC_{50} of Jaboticaba leaves extract was 263.88 and 462.77 µg/mL (HeLa and MCF-7 respectively). Previous studies using the aqueous extract of the seed of this plant demonstrated promising anti-proliferative effects in lineage of mouth cancer cells (HSC-3) (Wang et al. 2014). In addition, anti-proliferative effects of Jaboticaba fruits were also verified against leukemic lineage (K-562) and prostate cancer (PC-3) (Leite-Legatti et al. 2012). Previous evidence describes some flavonoid compounds extracted from this species with anti-proliferative effects against HT29 and HCT116 colon cell lines (Reynertson et al. 2006). Purification and the identification of the active compounds in the extract of Jaboticaba leaves are required for a better understanding of the cell death mechanisms involved and to deduce possible future applications.

4. Conclusion

The results of this report indicate that the hydroalcoholic extract of leaves of *P. peruviana* presents antioxidant activities and anti-proliferative potential against MCF-7 and HeLa. The anticancer activity may be related to the presence of polyphenols, flavonoids and the high antioxidant capacity detected by the ORAC assay. This study is the first to report the biological potentials of this species. Thus, contributing to the pharmacological knowledge of *P. peruviana*. More studies will be needed to establish the safe use of this plant by the population, since there are no references in this literature about this species.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

SDECT (SECRETARIA DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA), Rio Grande do Sul, Brazil.; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Parque Científico e Tecnológico Regional – TecnoUnisc, Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

References

- Abdul Wahab SM, Jantan I, Haque MA, Arshad L. 2018. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Front Pharmacol*. 9:1–20.
- Abubakar IB, Lim SW, Loh HS. 2018. Synergistic apoptotic effects of tocotrienol isomers and *Acalypha wilkesiana* on A549 and U87MG cancer cells. *TLSR*. 29(1):229–238.
- Batista, Â G, Soares, E S, Mendonça, M C P, Da Silva, J K, Dionísio, A P, Sartori, C R, Da Cruz-Höfling, M A, Maróstica Júnior, M R. 2017. Jaboticaba berry peel intake prevents insulin-resistance-induced tau phosphorylation in mice. *Mol Nutr Food Res*. 61(10):1600952 doi:10.1002/mnfr.201600952.
- Afrin S, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboledo-Rodriguez P, Manna PP, Battino M, Giampieri F. 2018. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 1: Enhancement of cellular viability, regulation of cellular apoptosis and improvement of mitochondrial functionality. *Food Chem Toxicol*. 6915:30637–30639.
- Carvalho AJS, Ishikawa T, Gouvêa CMCP. 2012. Aqueous extract of *Plinia edulis* leaves: antioxidant activity and cytotoxicity to human breast cancer MCF-7 cell line. *S Afr J Bot*. 81:1–7.
- Chandra S, de Mejia EG. 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguaiensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem*. 52(11):3583–3589.
- Citadin I, Danner MA, Sasso SAZ. 2010. Jabuticabeiras. *Rev Bras Frutic*. 32:343–656.
- Costa AGV, Garcia-Diaz DF, Jimenez P, Silva PI. 2013. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *J Funct Foods*. 5(2):539–549.
- Dias ALB, Batista HRF, Estevam EBB, Alves CCF, Forim MR, Nicoletta HD, Furtado RA, Tavares DC, Silva TS, Martins CHG, Miranda MLD. 2018. Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtilodes* O. Berg (Myrtaceae). *Nat Prod Res*. 3:1–5.
- El Abed H, Chakroun M, Abdelkafi-Koubaa Z, Drira N, Marrakchi N, Mejdoub H, Khemakhem B. 2018. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoral effects of aqueous ethanolic extract from *Phoenix dactylifera* L. parthenocarpic dates. *Biomed Res Int*. 6:1542602. 2018:

- Evaristo, IM, Leitão, MC. 2001. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de Quercus suber L. Silva Lusitana. 9:135–141.
- Falcão TR, de Araújo AA, Soares LAL, de Moraes Ramos RT, Bezerra ICF, Ferreira MRA, de Souza Neto MA, Melo MCN, de Araújo RF, Jr., de Aguiar Guerra ACV, et al. 2018. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. BMC Complement Altern Med. 18:84.
- Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, Brunet C, Sansone C. 2018. On the neuroprotective role of astaxanthin: new perspectives? Mar Drugs. 16:1–16.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Baghdadi A, Tayebi-Meigooni A. 2018. Alpha-mangostin-rich extracts from mangosteen pericarp: optimization of green extraction protocol and evaluation of biological activity. Molecules. 23:1–16.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem. 48(12):909–930.
- Kich DM, Bitencourt S, Caye B, Faleiro D, Alves C, Silva J, Pinteus S, Mergener M, Majolo F, Boligon AA, et al. 2017. Lymphocyte genotoxicity and protective effect of *Calyptanthus tricona* (Myrtaceae) against H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cells. Mol Cell Biochem. 424(1-2): 35–43.
- Leite-Legatti AV, Batista AG, Dragano NRV, Marques AC, Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Machado ART, Carvalho-Silva LB, Ruiz ALTG, et al. 2012. Jaboticaba peel: antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. Food Res Int. 49(1):596–603.
- Morton J. 1987. Fruits of warm climates. Winterville, NC: Creative Resource Systems Inc., p. 386–388.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 65(1-2):55–63.
- Neves, N D A, Stringheta, P C, Gómez-Alonso, S, Hermosín-Gutiérrez, I. 2018. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. Food Chem. 252:61–71. 29478564 doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.078.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agric Food Chem. 4:4619–4626.
- Pereira, LD, Barbosa, J, Silva Ajr Ferri, PH, Santos, SC. 2017. Polyphenol and Ellagitannin Constituents of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Chemical Variability at Different Stages of Fruit Development. J. Agric. Food Chem. 65(6):1209–1219.
- Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB, Kennelly EJ. 2006. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). J Nat Prod. 69(8):1228–1230.
- Souza-Moreira TM, Severi JA, Rodrigues ER, de Paula MI, Freitas JA, Vilegas W, Pietro RCLR. 2018. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. Nat Prod Res. 5:1–4.
- Strzemski M, Wojnicki K, Sowa I, Wojas-Krawczyk K, Wójciak-Kosior M. 2017. In Vitro Antiproliferative activity of extracts of *Carlina acaulis* subsp. caulescens and *Carlina acanthifolia* subsp. Utzka. Front Pharmacol. 8:371.
- Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. Medicines (Basel). 25(3):5.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64(4):555–559.
- Wang WH, Tyan YC, Chen ZS, Lin CG, Yang MH, Yuan SS, Tsai WC. 2014. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. Biomed Res Int. 2014:185946.

4.2 Manuscrito original 2 – Inglês

Effects of *Plinia peruviana* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity *in vivo*

Greice G. Moraes^{a*}, Pedro H. Doleski^b, Daniela B. R. Leal^b, Ana M. Engelmann^c, Cinthia M. de Andrade^c, Mariana M. Flores^d, Bruna M. Lucio^d, Débora Bonadiman^a, Maiara Maziero^a, Marina Lovatto^a, Rafaela C. Dornelles^e, Cézane P. Reuter^f, Chana de M. da Silva^g, Melânia P. Manfron^a

Authors' institutional affiliations

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil

^b Laboratory of Applied and Experimental Immunobiology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil

^c Department of Small Animal Clinic, University Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil

^d Veterinary Pathology Laboratory, University Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil

^e Department of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil

^f Department of Physical Education and Health, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul State, Brazil

^g Department of Biology and Pharmacy, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

***Corresponding author:**

Greice Graziela Moraes

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences – Federal University of Santa Maria

Av. Roraima nº 1000, Bloco 26, Camobi

Zip Code: 97105-900 - Santa Maria - RS/Brazil

E-mail: greicegmoraes@yahoo.com.br

** Artigo elaborado nas normas do periódico *Journal of Ethnopharmacology*.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance

Plinia Peruviana (Poir.) Govaerts is widespread in Brazil, Argentina and Paraguay. Its fruits are used as food, and almost all parts of this species have long been used as a traditional Brazilian medicine in the treatment of skin irritations, flu, diarrhea, labyrinthitis, genitourinary problems and asthma. Although *P. peruviana* has significant biological activities, much of its ethnomedicinal use has not been scientifically evaluated, especially this leaves.

Aim of the study

In this study, we seek to demonstrate the effects of *P. peruviana* leaves against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in rats.

Materials and Methods

Thirty male rats, 200 - 250 g, were divided into 5 groups as follows: Group 1 (control), group 2 (CCl₄ control), groups 3, 4 and 5, treated with 100 mg/kg silymarin, *P. peruviana* extract (50 mg/kg), and *P. peruviana* extract (100 mg/kg), respectively, orally for 14 days, followed by induction of liver injury using 10 mL/kg CCl₄. The clinical biochemistry profiles, determination of antioxidant defense and histopathological examination were evaluated after treatment.

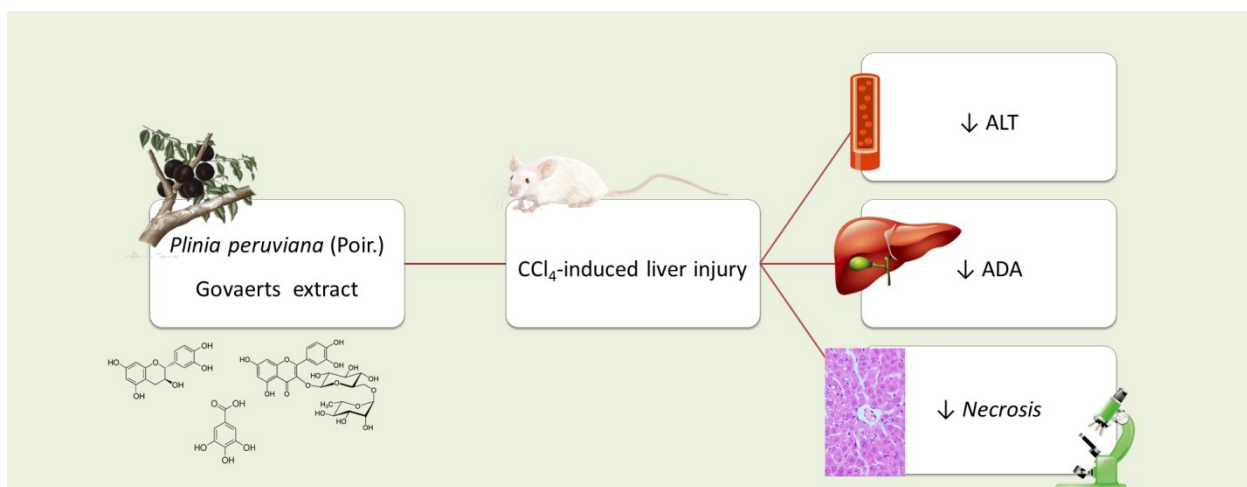
Results

Treatment with *P. peruviana* improved the changes caused by CCl₄ in plasma and rat liver homogenate. The decrease in the levels of ALT and FA were more pronounced in animals administered with 50 mg / kg. In the same sense, 50 mg / kg of the extract as well as silymarin were able to decrease the signs of CCl₄-induced necrosis.

Conclusions

Plinia peruviana leaves improved CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. The beneficial effects are marked by a remarkable restoration of biochemical markers and antioxidant enzymes. Therefore, the flavonoids present in the extract may be responsible for their hepatoprotective capacity against CCl₄-induced toxicity.

Graphical abstract



Keywords: Hepatotoxicity; Carbon tetrachloride; Liver enzymes; *Plinia peruviana*;

1. Introduction

The liver is one of the most important organs in our body, and its main function is to metabolize food, medicine and other substances (Janghel et al., 2019). These substances can cause a variety of injury to this organ, such as increased serum aminotransferase activity, to severe damage such as hepatocellular necrosis (Shi et al., 2019). With liver damage, serum levels of many biochemical markers such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (FA), cholesterol, bilirubin, triglyceride, adenosine deaminase (ADA) and gamma-glutamyl transferase (GGT) increase, and albumin (ALB) synthesis and total protein (TP) decrease (Tahmasebi et al., 2018; Ko et al., 2019).

Carbon tetrachloride (CCl₄) administration is considered as an experimental model of choice for rat liver damages (Ko et al., 2019; Chao et al., 2019; Li et al., 2019). The effect of CCl₄ is explained by its ability to produce trichloromethyl free radicals and reactive oxygen species (ROS) when metabolised by cytochrome P₄₅₀. Thus, this model has been widely used to evaluate the possible hepatoprotective effect of some substances (Kanhar et al., 2019).

Flavonoids present in plants are popularly known as nutraceuticals (Rodrigues et al., 2019), and are able to protect against liver damage (Pinafo et al., 2019). *Plinia Peruviana* (Poir.) Govaerts commonly known as “Jabuticabeira,” belongs to family Myrtaceae (Citadin et al., 2010; Costa et al., 2013) is widespread in Brazil, Argentina and Paraguay. Its fruits are

used as food, and almost all parts of this species have long been used as a traditional Brazilian medicine in the treatment of skin irritations, flu, diarrhea, labyrinthitis, genitourinary problems and asthma (Lorenzi, 2000; Agra et al., 2008; Paiva et al., 2017).

We showed in an earlier study that methanol extract of *P. peruviana* leaves the antioxidant and anti-proliferative effects of this specie on MCF-7 and HeLa cell lines (Moraes et al., 2019). *P. peruviava* contains significant amounts of flavonoid and some phenolic compounds, which are known to exert anti-inflammatory and antioxidant activities (Franscescon et al., 2018).

Substances include gallic acid, ellagic acid, isoquercitrin, quercimeritrin, quercitrin, myricetin and quercetin (Einbond et al., 2004; Reynertson et al., 2006; Abe et al., 2012; Wu et al., 2012; Hacke et al., 2016; Pereira et al., 2017), are often associated with biological properties as antioxidants, anti-inflammatory and antiproliferative as well as have been reported in the prevention of cardiovascular and neurodegenerative diseases (Tsuda et al., 2003; Brito et al., 2007).

In the present study, we investigated the hepatoprotective effects of *P. peruviana* leaves extract against CCl₄-induced oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Adult Wister male albino rats weighing 200-250 g (6–8 weeks old) were purchased from the Biotério Central da Universidade de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brazil. The animals were kept at 21-22 °C and fed with regular diet and controlled under 12h light–dark period and 60% air humidity. The animal study and handling protocols were approved by the Ethics Committee for the Scientific Research at the UFSM (permit number: 8413040618).

2.2. Collection of plant material and preparation of plant extract

The leaves were collected from its natural habitat in Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil (29S 44'47.5"/52W 21'24.2"), in October 2017, authenticated by a certified botanist (Dr. Renato Aquino Záchia) and deposited (voucher 17.753) at the Herbarium of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Dried plants were ground to small pieces and then pulverized. The extraction process was performed using a previous method (Strzemeski et al., 2017). The hydroalcoholic extract of *P. peruviana* was prepared in 70% ethanol (1/10 weight/ volume ratio) by ultrasonic bath for 30 minutes at room temperature and its residue extracted again. After that, it was concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C, lyophilized and stored under refrigeration at 8 °C.

2.3. Induction of hepatic injury

The hepatic injury was induced according to the method of (Carbonari et al., 2006), with minor modifications. Briefly, all mice except for the normal group were intraperitoneally injected with CCl₄ inducer (0.5 mL/kg of CCl₄: corn oil = 1:1, v/v) on the 14th day, and then all mice were fasted, but allowed to drink water. The mice were euthanasia after fasting for 24h.

2.4. Experimental design

The experimental animals were randomly divided into the five groups (n = 6). First group was control animals without inducing hepatic injury and was used to measure the physiologic concentrations of various biomarkers (liver enzymes). The second group was induced with CCl₄ and was undergone no treatment. The third, fourth and fifth groups were induced with CCl₄ and treated with silymarin (100 mg/kg), *P. peruviana* extract 50 mg / kg and 100 mg / kg.

2.5. Collection of blood and separation of serum specimens

At the end of treatment period, all the experimental animals were sacrificed and their blood samples (5 mL) were collected from the heart. The serum samples were separated from the blood samples by centrifugation at 1 500 r/min for 10 min. The serum samples were then stored at -60 °C until further biochemical analyses.

2.6. Biochemical assays

Levels of glucose, total cholesterol, triglyceride, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (FA), albumin, urea and creatinine

were performed using commercial kit (Bioclin®) with animal serum samples and according to manufacturer's instructions. Samples were processed in an automatic biochemical analyzer (Mindray BS-120®).

2.7. Determination of antioxidant defense

Adenosine deaminase (ADA) activity was measured in serum and homogenized liver samples using the method described by (Giusti and Gakis, 1971). The methodology is based on the direct measurement of ammonia produced once the enzyme acts in presence of ADO. A volume of 25 mL of serum or liver homogenate was used. The enzymatic reaction was started by addition of 500 mL of adenosine (21 mM) as substrate. The reaction was stopped by adding 1.5 mL of 106/0.16 mM phenol sodium nitroprusside solution to the reaction mixture, which was immediately mixed with 1.5 mL of 125/11 mM alkaline hypochlorite solution. Ammonium sulfate of 75 mM was used as ammonium standard. All experiments were performed in triplicate and the values of ADA activity serum and liver homogenized were expressed in U/L/mg of protein.

2.8 Histopathological examination

Liver fragments were dissected and fixed in 10% neutral-buffered formalin. After fixation, the samples were trimmed, routinely processed and embedded in paraffin wax. Tissue sections (3–5 µm) were prepared and routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histological sections were viewed under a light microscope (Olympus BX31). Each case was classified in a specific grade according to the degree of the injuries observed (Table 1).

Table 1

Pathological grading of liver injury.

Grade	Liver injury
0	Unremarkable.
1	Scarce microvacuoles are present in the cytoplasm of hepatocytes (microvacuolar degeneration) from centrilobular areas, only detected in a high power field (40x). Necrosis is not observed.
2	In addition to the microvacuoles described for grade 1, occasional hepatocytes from centrilobular areas are distended with macrovacuoles (microvacuolar degeneration). These lesions can be detected on a lower magnification (20x), although discreet. Occasional individual hepatocellular necrosis is observed in the centrilobular areas.
3	In addition to the microvacuoles described for grade 1, hepatocytes distended with cytoplasmic macrovacuoles are common in the centrilobular area. The lesion is readily visible on low magnification (20x and 40x). Occasional individual hepatocellular necrosis is observed in the centrilobular areas. Mild neutrophil and mononuclear cell infiltration is occasionally seen in the affected areas.
4	The micro and macrovacular degeneration observed in grade 3 is seen here. Additionally, hepatocellular necrosis and neutrophilic and mononuclear cell infiltration are moderate to severe in centrilobular areas. Necrosis is frequently coalescent, affecting small groups of hepatocytes. There is also increased number of circulating leucocytes within the lumen of the centrilobular vein.

Reference: author.

2.9. Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SEM (n = 6). Statistical analysis was performed at $p < 0.05$ between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test using SPSS statistical program, version 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Effect of *P. peruviana* on CCl₄-induced hepatotoxicity

The hepatoprotective efficacy of *Plinia peruviana* extract was determined by evaluating the levels of ALT, AST, FA, GGT and TP in the serum samples of all experimental animals, besides cholesterol, triglyceride, albumin, glucose, urea and creatinine.

As shown in Table 2, the results indicated that ingestion of CCl₄ in Wistar albino rats caused an increase in the levels of ALT in the serum specimen compared to the untreated group. The decrease in the levels of ALT and FA were more pronounced in animals administered with 50 mg/kg. It was also observed that the hepatoprotective activity of *Plinia peruviana* particularly at a dose of 50 mg / kg was comparable to sylimarin (a strong hepatoprotective agent). The decrease in the level of GGT was also observed. Results also indicated that ingestion at a dose of 50 mg / kg caused a significant ($P < 0.05$) increase in the levels of TP and glucose.

Table 2

Effect of *P. peruviana* extract on liver enzymes, metabolism and serum lipoproteins.

Tested groups	Control	CCl ₄	CCl ₄ + Sylimarin	CCl ₄ + 50mg	CCl ₄ + 100mg
ALT (UI/L)	35.83±4.535	70.50±74.40	47.33±25.28	46.16±19.25	69.16±46.67
AST (UI/L)	101.50±18.28	249.16±236.84	208.00±85.24	271.16±152.39	382.50±270.14
FA (UI/L)	105.16±17.16	105.50±47.89	104.33±28.66	83.50±25.11	116.16±44.01
TP (g/dL)	6.50±0.37	4.66±1.49	4.83±1.39	4.00±1.42 [#]	4.81±1.50
Cholesterol (mg/dL)	60.00±6.06	41.00±13.20	39.66±10.53*	45.83±20.49	45.33±4.03
Triglycerides (mg/dL)	62.16±15.45	42.50±17.40	43.66±7.99	44.00±12.94	39.66±10.26
Albumin (g/dL)	2.80±0.08	2.11±.57	2.33±.59	2.13±.66	2.30±.33
Creatinine (mg/dL)	0.58±0.04	0.51±.09	0.56±.15	0.50±.10	0.58±.07
Ureia (mg/dL)	43.66±5.53	43.00±7.34	42.83±7.13	39.16±5.38	51.00±18.22
GGT (U/L)	3.00±1.89	1.66±1.36	2.33±1.96	1.83±.98	3.33±1.63
Glucose (mg/dL)	216.33±25.91	164.00±26.50	166.16±30.04	128.16±30.63 [#]	135.33±49.42 [#]

Values presented are the means ± standard deviation (N = 6/group). A * $P < 0.05$ represents significant difference between untreated and CCl₄-sylimarin treated group. A [#] $P < 0.05$ represents significant difference between untreated group and *P. peruviana* 50mg and *P. peruviana* 100mg groups.

3.2. ADA activity in serum and liver homogenized

The hepatoprotective activity of *P. peruviana* was also evaluated by measuring its antioxidant activity by determining the levels of ADA in the serum of all experimental

animals (Fig. 1). Compared to the control group, the induced group showed a 63.815% increase in hepatic ADA activity. Serum ADA analyzes showed no significant difference (Fig. 1A).

Comparing the induced group with the silymarin treatment group, no statistical reduction in hepatic ADA activity was observed. On the other hand, in the homogenized liver, the *P. peruviana* 50mg and 100mg treatment groups were able to reduce hepatic ADA activity by 15.26% and 22.99%, respectively (Fig. 1B). The enzyme ADA is considered an inflammatory marker (Kishimoto et al., 2019). Therefore, the reduction found in groups treated with *Plinia peruviana* may indicate a lower inflammatory process. ADA converts the adenosine (anti-inflammatory) nucleoside to inosine. Interestingly, these changes in ADA may rely on to other changes, such as the direct effect of extract components on enzyme action.

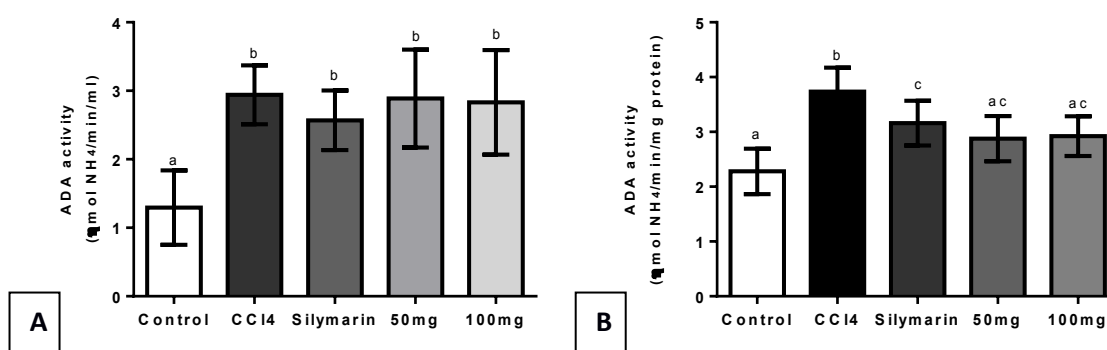


Fig. 1. ADA activity in serum (Fig. 1A) and liver homogenate (Fig. 1B). Enzymatic activities are expressed as U/L/mg protein. Columns represent mean \pm SEM (n = 6). Different letters in the same graph denote significance P < 0.05 by two way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

3.3 Histopathological Assessment of the Liver

Histologically the liver of the control group rats shows no morphological changes. In contrast, administration of CCl₄ resulted in a hepatocellular lesion in the centrolobular region, represented by vacuolar degeneration, hepatocellular individual necrosis, and inflammatory infiltrate (Fig. 2a, b, c, d). Animals isolated with the silymarin hepatoprotective pattern change lighter (Fig. 2e, f, g, h), although this result was not statistically significant. Similarly,

50 mg/kg of extract as well as silymarin were able to decrease CCl₄-induced necrosis signs (Fig. 2g).

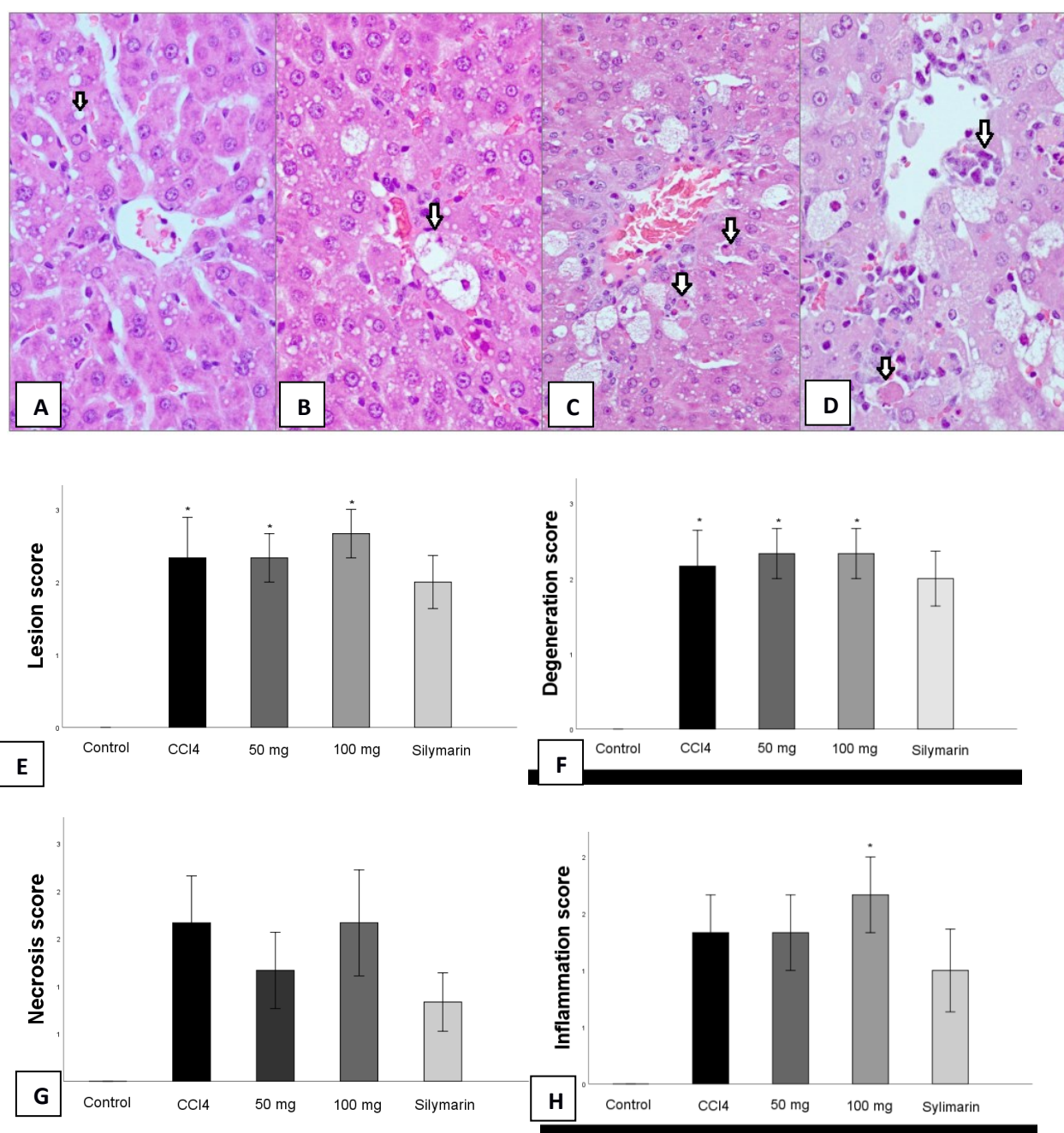


Fig. 2. Histological examination of liver sections of different classified according to the type of damage. Healthy control liver sections show the architecture of normal hepatocytes, while treatment with CCl₄ resulted in damaged cells showing injury (a), degeneration (b), necrosis (c), and inflammation (d). The bars represent the mean ± SEM of the histopathological scores of lesion (e), degeneration (f), necrosis (g) and inflammation (h) *: significantly different compared to CCl₄ or control group, p < 0.05. Significance was calculated using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc multiple comparison test.

4. Discussion

The use of CCl₄ in rats is a most commonly used experimental model of liver tissue damage to evaluate the hepatoprotective activity of plant extracts, since the pathological lesions induced by this substance resemble the symptoms of human liver disease (Ren et al., 2019; Chao et al., 2019). Its metabolism occurs in the liver by cytochrome P₄₅₀, resulting in free radical production and lipoperoxidation stimulation, which induces a process of necrosis, inflammation, triggering fibrosis and, in the long term, cirrhosis (Badr et al., 2019).

AST and ALT are enzymes present in liver cells (hepatocytes) and released into the blood as a result of various types of liver damage. Elevation of these enzymes is the most commonly encountered abnormality in liver testing, and is therefore a useful marker for diagnosis and monitoring of liver disease (Tian et al., 2012).

In the present study, administration of *Plinia peruviana* extract (50 mg / kg) for 14 days was shown to reduce serum ALT levels in rats and to decrease FA, GGT and glucose levels compared to the CCl₄-induced group. *Plinia peruviana* leaf extract has among its main constituents the gallic acid, catechin, epicatechin and rutin polyphenols, which may be associated with the results found in our study (Chielle et al., 2006; Yin et al., 2019).

In addition, the enzyme ADA is produced and released by lymphocytes and macrophages during cellular immune response, being a biomarker of inflammation or infectious disease (Kishimoto et al., 2019). Our findings regarding ADA were similar to the silymarin pattern, which prevented an increased activity of this enzyme, corroborating the histopathological findings, where the extract prevented CCl₄-induced necrosis.

Another important aspect was the decreased cholesterol levels found in the sera of rats treated with the extracts, with rutin associated with the hypolipidemic property exhibited by this polyphenol (Yin et al., 2019). Gallic acid and catechin may be related to an improvement in liver injury through inhibition of oxidative stress (Pan et al., 2018).

We observed a pronounced decrease in glucose in the groups treated with the extract (table 2). Previous studies report that polyphenols have a hypoglycemic effect by decreasing intestinal carbohydrate absorption, modulating enzymes involved in glucose metabolism, improving β cell function and insulin action, stimulating insulin secretion and the antioxidant and anti-inflammatory properties of these compounds (Bahadoran; Mirmiran; Azizi, 2013).

5. Conclusions

In conclusion, *Plinia peruviana* leaves improved CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. The beneficial effects are suggested by a restoration of biochemical markers and antioxidant enzymes. We suggest that the mechanism of hepatoprotection may be attributed to the presence of polyphenols. However, further studies on main active ingredients of the extract, their mechanism of action, and other therapeutic contribution of these interventions would be necessary.

Authors' contributions

GM, PD, DL, CS and MM conceived the idea and designed the method of the study. GM, PD, AE, CA, MF, BL, DB, MM, ML, RD and CR participated in the data collection and data analysis. GM wrote the paper, and all the authors reviewed and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

The authors thank Professor Dr. Renato Aquino Záchia of the Herbarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM) for identifying the plant.

We would also like to thank Professor Dra. Silvia González Monteiro and Postdoctoral student Dr. Lucas Trevisan Gressler of the Experimental Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology of the Federal University of Santa Maria (UFSM).

References

- L. T. Abe, F. M. Lajolo, M. I. Genovese. **Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg).** J Sci Food Agric. 92 (8) (2012), pp. 1679-87.
- M.F. Agra, K.N. Silva, I.J.L.D. Basílio, et al. **Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18 (2008), pp. 472-508.
- Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi. **Polifenóis como potenciais nutracêuticos na gestão de diabetes: uma revisão.** Jornal de Diabetes e Distúrbios Metabólicos. 13 (43) (2013), pp. 2-9.
- G. Badr, A. Sayed, H. Waly, A. Hassan, H. Mahmoud, Z. Selamoglu. **The Therapeutic Mechanisms of Propolis Against CCl₄ -Mediated Liver Injury by Mediating Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells and Improving the Hepatic Architecture through PI3K/AKT/mTOR, TGF- β /Smad2, Bcl2/BAX/P53 and iNOS Signaling Pathways.** Cell Physiol Biochem. 53(2) (2019), pp. 301-322.
- E. S. de Brito, M. C. P. de Araújo, R. E. Alves, C. Carkeet, B. Clevidence, J. A. Novotny. **Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jabolão, jussara, and guajiru.** J. Agric. Food Chem. 55 (23) (2007), pp. 9389-9394.
- A. Carbonari, A. Ferreira, M. Rebello, B. Felipe, H. Rossi, D. Felício et al. **Free-radical scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries.** Redox Rep. 11 (2006), pp. 124-30.
- W. Chao, J. Chen, C. Peng, W. Liao, T. Chou. **Antioxidant Activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther Leaf Extract Counteracts Oxidative Stress Induced by Ethanol and Carbon Tetrachloride Co-Induced Hepatotoxicity in Rats.** Antioxidants (Basel). 8(8) (2019).

O. Chielle, G. Bonfanti, K.S. de Bona, L.O. Cargnelutti, P.E.R. Bitencourt, P.S. da Silva, et al. **Rutin restores adenosine deaminase activity in serum and the liver and improves biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Rev. bras. plantas med.* 18 (1) (2016).

I. Citadin, M.A. Danner, S.A.Z. Sasso. **Jaboticabeiras.** *Rev Bras Frutic.* 32 (2010), pp. 343–656.

A.G.V. Costa, D.F. Garcia-Diaz, P. Jimenez, P.I. Silva. **Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries.** *J Funct Foods.* 5 (2) (2013), pp. 539–549.

S. B. Wu, K. Dastmalchi, C. Long, E. J. Kennelly. **Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices.** *J Agric Food Chem.* 60 (30) (2012), pp. 7513-25.

L. S. Einbond, K. A. Reynertson, X. D. Luo, M. J. Basile, E. J. Kennelly. **Anthocyanin antioxidants from edible fruits.** *Food Chemistry.* 84 (1) (2004), pp. 23-28.

F. Franscescon, S. C. Mazon, K. T. Bertoncello, A. A. Boligon, A. Sachett, C. L. Rambo, D. B. Rosemberg, J. D. Magro, A. M. Siebel. **Protective role of jaboticaba *Plinia peruviana* peel extract in copper-induced cytotoxicity in *Allium cepa*.** *Environ Sci Pollut Res Int.* (35) (2018), pp. 35322-35329.

G. Giusti, C. Gakis. **Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues.** *Enzyme.* 12 (4) (1971), pp. 417-25.

A. C. Hacke, D. Granato, L. G. Maciel, P. L. Weinert, L. Prado-Silva, V. O. Alvarenga, A. de Souza Sant'Ana, G. A. Bataglion, M. N. Eberlin, N. D. Rosso. **Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seeds: Chemical Characterization and Extraction of Antioxidant and Antimicrobial Compounds.** *J Food Sci.* 81 (9) (2016), pp. C2206-17.

V. Janghel, P. Patel, S.S. Chandel. **Plants used for the treatment of icterus (jaundice) in Central India: A review.** Ann Hepatol. 18 (5) (2019), pp. 658-672.

S. Kanhar, A.K. Sahoo. **Ameliorative effect of *Homalium zeylanicum* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress and liver injury in rats.** Biomed Pharmacother. 111 (2019), pp. 305-314.

K. Kishimoto, T. Mishiro, H. Mikami, N. Yamashita, K. Hara, W. Hamamoto, et al. **Measurement of Adenosine Deaminase in Ascitic Fluid Contributed to the Diagnosis in a Case of Tuberculous Peritonitis.** Case Rep Gastroenterol. 13 (2) (2019), 299-304.

J. Ko, W. J. Yeh, W. C. Huang, H. Y. Yang. ***Camellia Oleifera* Seed Extract Mildly Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats by Suppressing Inflammation.** J Food Sci. 84 (6) (2019), pp. 1586-1591.

M.H. Li, X. Feng, D. Ba, C. Chen, L. Ruan, Y. Xing, L.Y. Chen, G.J. Zhong, J.S. Wang. **Hepatoprotection of *Herpetospermum caudigerum* Wall. against CCl₄-induced liver fibrosis on rats.** Journal of Ethnopharmacology, 229 (2019), pp. 1-14

H. Lorenzi. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Instituto Plantarum, São Paulo (2000).

G. G. Moraes, M. Maziero, M. Lovatto, R. C. Dornelles, D. R. Nogueira-Librelo, C. P. Reuter, S. Ortolan, C. M. da Silva, M. P. Manfron. **Preliminary phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and anti-proliferative effects of *Plinia peruviana* leaves: an *in vitro* approach.** Nat Prod Res. 12 (2019), pp. 1-9.

K.O. Paiva, G.L. Oliveira, D.F.A. Farias, T.S. Müller. **Medicinal plants used in genitourinary system disorders by riverine women, Caravelas, Bahia.** Fitos. Supl, 1–126 (2017), pp. 92-98.

Y. Pan, X. Long, R. Yi, X. Zhao. **Polyphenols in Liubao Tea Can Prevent CCl₄-Induced Hepatic Damage in Mice through Its Antioxidant Capacities.** Nutrients. 10 (9) (2018).

L. D. Pereira, J. M. Barbosa, A. J. Ribeiro da Silva, P. H. Ferri, S. C. Santos. **Polyphenol and Ellagitannin Constituents of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Chemical Variability at Different Stages of Fruit Development.** J Agric Food Chem. 65 (6) (2017), pp. 1209-1219.

M. S. Pinafo, P. R. Benedetti, L. B. Gaiotte, F. G. Costa, J. P. F. Schoffen, G. S. A. Fernandes, L. G. A. Chuffa, F. R. F. Seiva. **Effects of *Bauhinia forficata* on glycaemia, lipid profile, hepatic glycogen content and oxidative stress in rats exposed to Bisphenol A.** Toxicol Rep. 6 (2019), pp. 244-252.

X. Ren, T. Xin, Q. Zhang, Q. Zhao, Y. Yue, X. Chen, et al. **Hepatoprotective effects of a traditional Chinese medicine formula against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro.** Biomed Pharmacother. 117 (2019).

K. A. Reynertson, A. M. Wallace, S. Adachi, R. R. Gil, H. Yang, M. J. Basile, J. D'Armiento, I. B. Weinstein, E. J. Kennelly. **Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*).** J Nat Prod. 69 (8) (2006), pp. 1228-30.

E. L. Rodrigues, G. Marcelino, G.T. Silva, P.S. Figueiredo, W.S. Garcez, J. Corsino, R.C.A. Guimarães, K.C. Freitas. **Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions.** Int J Mol Sci., 20 (2019).

R. Shi, C. Long, Y. Dai, Q. Huang, Y. Gao, N. Zhang, Y. Chen, S. Liu, Q. Ma, L. Quan, Y. Zhang, B. Luo. **Bongkreki acid poisoning: Severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food.** Leg Med (Tokyo). 41 (2019).

M. Strzemski, K. Wojnicki, I. Sowa, K. Wojas-Krawczyk, M. Wojciak-Kosior. **In Vitro Antiproliferative activity of extracts of *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* and *Carlina acanthifolia* subsp. *Utzka*.** Front Pharmacol. 8 (371) (2017).

M. Tahmasebi, H. Sadeghi, H. Nazem, E.P. Kokhdan, N. Omidifar. **Hepatoprotective effects of *Berberis vulgaris* leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats.** J Educ Health Promot. 7 (147) (2018).

Z . Tian, H. Liu, X. Su, Z. FANG, Z. DONG, C. YU, et al. **Role of elevated liver transaminase levels in the diagnosis of liver injury after blunt abdominal trauma.** Exp Ther Med. 4 (2) (2012), pp. 255–260.

T. Tsuda, F. Horio, K. Uchida, H. Aoki, T. Osawa. **Dietary cyanidin 3-O-b-Dglucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice.** J Nutr. 133 (7) (2003), pp. 2125-30.

Y. Yin, H. Liu, Z. Zheng, R. Lu, Z. Jiang. **Genistein can ameliorate hepatic inflammatory reaction in nonalcoholic steatohepatitis rats.** Biomed Pharmacother., 111 (2019), pp. 1290-1296.

5 DISCUSSÃO GERAL

A utilização das plantas para prevenção, tratamento e cura de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade, sendo muitas vezes a única forma de acesso aos cuidados da saúde. Com base neste conhecimento popular, observa-se uma evolução nas pesquisas científicas, onde os estudos químicos e biológicos comprovam o seu uso medicinal (SHEDOEVA et al., 2019).

Os resultados deste trabalho, apresentados na forma de um artigo e um manuscrito, representam uma investigação, até então inédita, realizada com as folhas da espécie *Plinia peruviana*, tendo em vista a sua utilização na medicina popular para diversos usos, como tosse, diarreia e asma.

As folhas foram avaliadas, primeiramente, quanto à presença de polifenóis, além da atividade antioxidante *in vitro* e a atividade antiproliferativa frente às linhagens tumorais de câncer de mama (MCF-7) e câncer cervical (HeLa). Os polifenóis totais e os flavonoides totais encontrados no extrato hidroalcoólico foram 944 ± 0.0856 mg EAG / g e 531.8 ± 0.0040 mg ER / g, respectivamente. O valor dos flavonoides totais encontrados nas folhas foi superior ao relatado para os frutos da mesma espécie (LEITE-LEGATTI et al., 2012). Os polifenóis identificados foram o ácido gálico, catequina, epicatequina e a rutina, sendo a epicatequina o composto majoritário.

Diversos métodos podem ser utilizados para se verificar a atividade antioxidante das plantas medicinais. Em nosso estudo utilizamos o ORAC, pois apresenta como vantagem determinar a capacidade antioxidante usando a absorbância, que é o uso da fluorescência como medida de dano oxidativo, ocorrendo uma menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras (LIMA, 2008). Observamos em nossos experimentos o valor de 1941.1 ± 717.65 μ M ET/g de extrato. Leite-Legatti e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante do extrato seco liofilizado de casca de Jabuticaba e o fruto frescas obtendo valores superior e inferior ($5230,4$ μ M ET / g 1511 μ M ET / g) respectivamente.

Tendo em vista o potencial antioxidante das folhas de *P. peruviana*, avaliamos sua capacidade antiproliferativa. Após 24 h de tratamento, o extrato foi mais eficaz para a linhagem HeLa, apresentando um IC₅₀ de $263,88$ μ g / mL. Estudos anteriores utilizaram as sementes desta espécie para a linhagem de câncer de boca (HSC-3) (WANG et al. 2014), os frutos da jabuticaba contra a linhagem leucêmica (K-562) e câncer de próstata (PC-3) (LEITE-LEGATTI et al. 2012). Alguns compostos flavonoides extraídos desta espécie com

efeitos antiproliferativos contra as linhas celulares do cólon (HT29 e HCT116) (REYNERTSON et al., 2006).

Estudos biológicos anteriores demonstraram efeito positivo em diabetes induzida em ratos utilizando extrato da casca da jabuticaba (ALEZANDRO et al., 2013), além de efeitos hipolipemiantes (ARAÚJO et al., 2013). Já os polifenóis mostraram aumentar a atividade antioxidante sérica e diminuir os níveis de insulina (PLAZA et al., 2016).

Após ter sido caracterizada a promissora atividade antioxidante do extrato pelo ensaio do ORAC, procurou-se avaliar a possível correlação entre esse efeito e a atividade hepatoprotetora em modelo animal, através da metodologia de hepatotoxicidade induzida por CCl₄. O dano hepático causado por essa substância pode ser mensurado através da avaliação de indicadores séricos da função hepática, como ALT, AST, FA, entre outros (TAHMASEBI et al., 2018).

O CCl₄ tem sido utilizado para estudar danos no fígado induzidos por radicais livres em camundongos, porque a lesão hepática causada por esse composto é bastante análoga à sua hepatotoxicidade em humanos (KVIECINSKI et al., 2011). Nosso estudo demonstrou um aumento nestas enzimas hepáticas, nos ratos tratados com CCl₄, demonstrando que ocorreu o dano após a indução, corroborando com os relatados na literatura (ELMOTASEM, FARAG, SALAMA, 2018; NWIDU et al., 2018). Verificou-se que o pré-tratamento com silimarina e com o extrato de *P. peruviana* (50 mg / kg – 14 dias) foi eficaz na diminuição destas enzimas, mas estes resultados não foram estatisticamente significativos (Tabela 2, manuscrito 2). Resultados significativos foram obtidos com a enzima ADA, onde *P. peruviana* (50 mg / kg) impediu o aumento da atividade desta, corroborando também com os achados histopatológicos, onde observou-se uma diminuição da necrose nos animais tratados com *P. peruviana* (50 mg / kg), bem como com o padrão silimarina.

Tomados em conjunto, os dados acima citados estão de acordo com os relatados na literatura para algumas plantas medicinais. Seus efeitos protetores contra danos oxidativos induzidos por CCl₄ estão relacionados com a presença de polifenóis, sendo seu mecanismo de ação mediados pela redução do estresse oxidativo no tecido hepático (KO, CHEN, NG, 2011; KVIECINSKI et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

- O teor de polifenóis das folhas de *P. peruviana* foi superior ao relatado para os frutos da mesma espécie, já o teor de flavonoides foi inferior;
- Quimicamente, o extrato de *P. peruviana* apresentou os polifenóis ácido gálico, catequina, epicatequina e rutina, através de CLAE-DAD;
- O extrato das folhas de *P. peruviana* apresentou alta capacidade antioxidante, determinada através do ensaio de ORAC;
- O efeito antiproliferativo pelo tratamento do extrato de *P. peruviana* em culturas de células de câncer de mama (MCF-7) e câncer cervical (HeLa) apresentou um IC₅₀ de 462.77 e 263.88 µg / mL, respectivamente;
- A atividade hepatoprotetora em modelo experimental *in vivo*, através da indução de dano hepático com tetracloreto de carbono (CCl₄) pode ser verificada através da histopatologia com uma diminuição da necrose, na dosagem de 50 mg / kg, além de uma diminuição da enzima ADA e dos marcadores ALT e FA.
- Este estudo é o primeiro a relatar os potenciais biológicos dessa espécie.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679-1687, 2012.
- AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland science, Taylor & Francis Group, 2008.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468– 477, 2013.
- ARAÚJO, C. R. R. et al. *Myrciaria cauliflora* peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high fat diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 2, p. 262-267, 2013.
- ASADI-SAMANI, M. et al. A systematic review of Iran's medicinal plants with anticancer effects. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 21, n. 2, p. 143–53, 2016.
- BAKOYIANNIS, I. et al. Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, n. 1, p. 1488-1497, 2019.
- BARRIE, F. R. Synopsis of *Plinia* (Myrtaceae) in Mesoamerica. **Novon**, v. 14, n. 4, p. 380-400, 2004.
- BARROSO, G. M. Myrtaceae. In: **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vol. II. UFV, Imprensa universitária. Viçosa, MG, 1991.
- BHATIA, S. K.; YETTER, A. B. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative *in vitro* cell viability measurements. **Cell Biology and Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 315-319, 2008.
- BIESKI, I.G.C. et. al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena region, legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, n. 1, p. 383–423, 2015.
- BOTTA, L. et al. Laccase-Mediated Enhancement of the Antioxidant Activity of Propolis and Poplar Bud Exudates. **ACS Omega**, v. 2, n. 6, p. 2515-2523, 2017.
- BRANDÃO, H. N. et al. Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRITO, E. S. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

CHANDEL, N. S.; TUVESON, D. A. The Promise and Perils of Antioxidants for Cancer Patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 2, p. 177-178, 2014.

CHAO, W. W. et al. Antioxidant Activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther Leaf Extract Counteracts Oxidative Stress Induced by Ethanol and Carbon Tetrachloride Co-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Antioxidants** (Basel), v. 8, n. 8, p. 1-15, 2019.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343-656, 2010.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutrition bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

COSTA, A. G. V. et al. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 539-549, 2013.

DANNER, M. A. et al. Diagnóstico ecogeográfico da ocorrência de jaboticabeiras nativas no sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p.746-753, 2010.

DA SILVA-DIZ, V. et al. Cancer cell plasticity: Impact on tumor progression and therapy response. **Seminars in Cancer Biology**, v. 2018, n. 53, p. 48-58, 2018.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

DEI CAS, M; GHIDONI, R. Cancer Prevention and Therapy with Polyphenols: Sphingolipid-Mediated Mechanisms, **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 2-27, 2018.

DIAS, A. L. B. et al. Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**, v. 3, n. 17, p. 1-5, 2018.

DONADIO, L. C. **Jaboticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg)**. Jaboticabal, Brasil: FUNEP, 2000.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 2002.

DUTTA, S. et al. Amelioration of CCl₄ induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. 1-30, 2018.

EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

ELMOTASEM, H., FARAG, H. K., SALAMA, A. A. A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of an oral sustained release hepatoprotective caffeine loaded w/o Pickering emulsion formula - Containing wheat germ oil and stabilized by magnesium oxide nanoparticles. **International**

Journal of Pharmaceutics, v. 547, n. 1, p. 83-96, 2018.

ELUFIOYE, T. O.; HABTEMARIAM, S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, n. 1, p. 1-11, 2019.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2018.

FERRAZ DA COSTA, D. C. Resveratrol prevents p53 aggregation *in vitro* and in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 9, n. 49, p. 29112 – 29122, 2018.

FRANZON, R. C. et al. **Araçás do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. 1 Ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

GARCIA-CASTELLO, E. M. Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1114-1122, 2015.

GOVAERTS, R. et al. Myrtaceae. World Checklist of Myrtaceae. **Royal Botanic Gardens**. 2014.

HACKE, A. C. et al. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seeds: Chemical Characterization and Extraction of Antioxidant and Antimicrobial Compounds. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 9, p. C2206-17, 2016.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529-1537, 2011.

JAESCHKE, H. et al. Forum – Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 166-176, 2002.

JEONG, D. W. et al. Deastringent Peel Extracts of Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) Protect Neuronal PC-12 and SH-SY5Y Cells against Oxidative Stress. **Microbial Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 1094-1104, 2018.

KANG, H. W. et al. Flavonoids, Potential Bioactive Compounds, and Non-Shivering Thermogenesis. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1-25, 2018.

KISHIMOTO, T. et al. Measurement of Adenosine Deaminase in Ascitic Fluid Contributed to the Diagnosis in a Case of Tuberculous Peritonitis. **Case Rep Gastroenterology**, v. 13, n. 2, p. 299-304, 2019.

KO, H. J.; CHEN, J. H.; NG, L. T. Hepatoprotection of *Gentiana scabra* extract and polyphenols in liver of carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 30, n. 3, p. 179-187, 2011.

KOCOT J. et al. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 3, p. 1-9,

2018.

KVIECINSKI, M. R., et al. Brazilian *Bidens pilosa* Linné yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. **Libyan Journal of Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2011.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p. 508-536, 1997.

LEE, W. M. Drug-Induced Hepatotoxicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 1, p. 474-485, 2003.

LEE, S. J. et al. Oxidative stability of extracts from red ginseng and puffed red ginseng in bulk oil or oil-in-water emulsion matrix. **Journal of Ginseng Research**, v. 42, n. 3, p. 320-326, 2018.

LEE, Y. S. et al. Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl₄-induced acute liver damaged mice. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 332-338, 2019.

LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried peel jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277-2283, 2011.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação de compostos fenólicos presentes no Pequi** (*Caryocar brasiliense*, Camb.). 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIU, G. et al. Application effect of apatinib in patients with failure of standard treatment for advanced malignant tumours. **BMC Pharmacology & Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2019.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E. et al. Review of natural products with hepatoprotective effects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14787-14804, 2018.

MANANDHAR, B. et al. Phytochemical profile and pharmacological activity of *Aegle marmelos* Linn. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 3, p. 153-163, 2018.

MATTOS, J. R. Novidades taxonômicas em Myrtaceae – XV. **Loefgrenia: comunicações avulsas de Botânica**, Florianópolis, n.112. 1998.

MCVAUGH, R. The genera of American Myrtaceae – An interim report. **Taxon**, v. 17, n. 1, p. 354- 418, 1968.

MENG, X. et al. Gut microbiota's relationship with liver disease and role in hepatoprotection by dietary natural products and probiotics. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1-21, 2018.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a Cancer**

Journal for Clinicians, v. 66, n. 4, p. 271-289, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, A. et al. Postmenopausal osteoporosis and breast cancer: The biochemical links and beneficial effects of functional foods. **Biomed Pharmacotherapy**, v. 107, n. 1, p. 571-582, 2018.

NGAMWONGLUMLERT, L.; DEVAHASTIN, S.; CHIEWCHAN, N. Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3243-3259, 2017.

NWIDU, L. L. et al. Hepatoprotective effect of hydromethanolic leaf extract of *Musanga cecropioides* (Urticaceae) on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 344-354, 2018.

ONAKPOYA, I.J.; HENEGHAN, C.J.; ARONSON, J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: A systematic review of the world literature. **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2016.

OU, B. et al. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

OUAHIDA, D.; RIDHA, O. M.; EDDINE, L. S. Influence of Extraction Method on Phytochemical Composition and Antioxidant Activity from Leaves Extract of Algerian *Phoenix dactylifera* L. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, n. 2, p. 84-89, 2016.

PAN, Y. Polyphenols in Liubao Tea Can Prevent CCl₄-Induced Hepatic Damage in Mice through Its Antioxidant Capacities. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1-17, 2018.

PEREIRA, L. D. et al. Polyphenol and Ellagitannin Constituents of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Chemical Variability at Different Stages of Fruit Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1209-1219, 2017.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract causes ROS-induced necrotic cell death and inhibits tumor growth *in vivo*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

PLAZA, M. et al. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, n. 15, p. 185-197, 2016.

PUTNIK, P. et al. Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. **Foods**, v. 7, n. 7, p. 1-16, 2018.

- RAUF, A. et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 1-22, 2018.
- REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228–1230, 2006.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.
- RYBARCZYK-KASIUCHNICZ, A.; RAMLAU, R. Current views on molecularly targeted therapy for lung cancer - a review of literature from the last five years. **Kardiologia i Torakochirurgia Polska**, v. 15, n. 2, p. 119-124, 2018.
- SANTOS, D. T., VEGGI, P. C., MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, 2010.
- SEITZ, H. K. et al. Alcoholic liver disease. **Nature Reviews**, v. 4, n. 1, 2018.
- SEYED, M. A. et al. A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 725-737, 2016.
- SHEDOEVA, A. et al. Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2019, n. 1, p. 1-30, 2019.
- SHEN, Y. et al. Polyphenols extract from lotus seedpod (*Nelumbo nucifera Gaertn.*): Phenolic compositions, antioxidant, and antiproliferative activities. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 9, p. 3062-3070, 2019.
- SHENOY, K. A.; SOMAYAJI, S. N.; BAIRY, K. L. Evaluation of hepatoprotective activity of *Ginkgo biloba* in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 167-174, 2002.
- SOARES-SILVA, L. H. **A família Myrtaceae - subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil**. 478 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.
- SOBEH, M. Chemical composition, antioxidant and hepatoprotective activities of methanol extracts from leaves of *Terminalia bellirica* and *Terminalia sericea* (Combretaceae). **PeerJ Life & Environment**, v. 7, n. e6322, p. 1-22, 2019.
- SOBRAL, M. et al. Myrtaceae: Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2018.
- SOUZA-MOREIRA, T.M. et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 45–53, 2010.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Chemical and antidiarrheal studies of *Plinia cauliflora*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1590-6, 2011.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural Product Research**, v. 5, n. 17, p. 1-4, 2018.

SUGGITT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 971-981, 2005.

TAHMASEBI, M. et al. Hepatoprotective effects of *Berberis vulgaris* leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Education and Health Promotion**, v. 7, n. 147, p. 1-5, 2018.

TAVSAN, Z.; KAYALI, H. A. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, n. 1, p. 1-12, 2019.

TELLI, E. M. R. P. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 3, p. 245-252, 2016.

THABIT, S. et al. Evaluation of antioxidant and neuroprotective activities of *Cassia fistula* (L.) using the *Caenorhabditis elegans* model. **PeerJ Life & Environment**, v. 6, n. e5159, p. 1-33, 2018.

TSUDA, T. et al. Dietary cyanidin 3-O-b-Dglucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2125–2130, 2003.

VALDES, L. et al. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. **Food & Function**, v. 6, n. 8, p. 2424–2439, 2015.

VALLEJO, M. J.; SALAZAR, L.; GRIJALVA, M. Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on *In Vitro* Models for Plant-Derived Compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 1-9, 2017.

WANG, W. H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **Biomed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 1-7, 2014.

WILSON, P. G. et al. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 3-19, 2005.

WOJCIK, M. Molecular Mechanisms Underlying Curcumin-Mediated Therapeutic Effects in Type 2 Diabetes and Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 1, p. 1-14, 2018.

WU, S. B. A. et al. Metabolite Profiling of Jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.

YANG, Y.; ZHU, Y.; XI, X. Anti-inflammatory and antitumor action of hydrogen via reactive oxygen species. **Oncology Letters**, v. 16, n. 3, p. 2771-2776, 2018.

ZHAO, S. et al. First demonstration of protective effects of purified mushroom polysaccharide-peptides against fatty liver injury and the mechanisms involved. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

ZHU, Y. et al. Galangin induced antitumor effects in human kidney tumor cells mediated via mitochondrial mediated apoptosis, inhibition of cell migration and invasion and targeting PI3K/ AKT/mTOR signalling pathway. **Journal of B.U.ON.**, v. 23, n. 3, p. 795-799, 2018.

ANEXO A – Carta de aprovação da pesquisa no CEUA - UFSM.

ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito “Effects of *Plinia peruviana* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity *in vivo*”.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM MODELO C6 DE GLIOBLASTOMA E HEPATOPROTETOR IN VIVO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS ", protocolada sob o CEUA nº 8413040618, sob a responsabilidade de **Melânia Palermo Manfron e equipe; Greice Graziela Moraes; Daniela Bitencourt Rosa Leal; Pedro Henrique Doleski** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 18/10/2018.

We certify that the proposal "ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL IN C6 MODEL OF GLIOBLASTOMA AND IN VIVO HEPATOPROTETOR OF EXTRACT OF LEAVES OF *PLIA PERUVIANA* (POIR.) GOVAERTS", utilizing 54 Heterogenics rats (54 males), protocol number CEUA 8413040618, under the responsibility of **Melânia Palermo Manfron and team; Greice Graziela Moraes; Daniela Bitencourt Rosa Leal; Pedro Henrique Doleski** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2018](#) a [06/2019](#)

Área: [Farmácia Industrial](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [54](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 320 g](#)

Resumo: *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts é uma árvore de porte médio com frutos comestíveis, que cresce até 12 m de altura. Ocorre do estado do Pará ao Rio Grande do Sul no Brasil. A triagem fitoquímica dos frutos desta espécie foi relatada anteriormente, com predomínio de antocianinas, flavonoides e taninos. Estudos farmacológicos indicam que os frutos *P. peruviana* apresentam algumas atividades biológicas como anti-inflamatória, antiproliferativa, antibacteriana e antidiarreica. No entanto, estudos a respeito das propriedades antiproliferativas e atividade hepatoprotetora desta espécie vegetal ainda são escassos na literatura. Atualmente, a quimioterapia é o tratamento utilizado para o câncer. No entanto, ela apresenta o desenvolvimento de quimiorresistência e toxicidade para as células normais. Estas substâncias não podem ser usadas para a prevenção do câncer e ainda apresentam efeitos secundários e complicações graves (fadiga, dor, diarreia, náuseas, vômitos e perda de cabelo). Portanto, há uma grande necessidade de terapias mais eficazes. Neste mesmo sentido, o fígado é um importante órgão para desintoxicação e metabolismo de xenobióticos, suscetível a várias formas de lesão, que podem resultar em distúrbios hepáticos diferentes. Esta enfermidade crônica é considerada um grave problema de saúde pública que pode ser causados por substâncias químicas tóxicas, drogas e infiltração de vírus por ingestão ou infecção. O tetracloreto de carbono (CCl₄) é uma toxina potente, e modelos animais envolvendo lesão hepática induzida por CCl₄ têm sido amplamente utilizados para investigar o potencial dos bioativos em relação à hepatoproteção. Até o momento, os medicamentos disponíveis para tratamento da lesão hepática são limitados e alguns deles têm efeitos colaterais graves. Assim, novas abordagens terapêuticas com atividade confiável e menor toxicidade são necessárias para ambas patologias. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo comprovar a ação antiproliferativa em modelo C6 de glioblastoma e hepatoprotetora in vivo do extrato das folhas de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts (Myrtaceae).

Local do experimento: Serão utilizados no experimento ratos Wistar machos adultos jovens, com idade de 8 semanas, pesando aproximadamente 250 a 320 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais serão mantidos secos, limpos, livres de ruídos excessivos e dentro de uma faixa de temperatura de 21-22 °C, com 60-65% de umidade relativa do ar, com ciclo 12/12 h de claro e escuro mantido artificialmente. A forragem utilizada nas caixas dos animais será de maravalha de *Pinus* autoclavada e sua troca será executada três vezes por semana. Bebedouros e comedouros serão limpos a cada três dias. Os ratos serão alimentados com a ração padrão para *Rattus norvegicus* utilizada pelo Biotério da Universidade (SUPRA-LAB) e água ad libitum. Os animais serão mantidos no Biotério de Ratos do prédio 21 (sala 5004). Os ratos, após ambientação de 7 dias, serão distribuídos randomicamente em gaiolas coletivas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), contendo tubos ou canos de PVC como meio de enriquecimento ambiental, contendo no máximo 4 ratos em cada gaiola. Serão utilizados 9 grupos de 6 animais cada, totalizando 54 animais. O número de animais por grupo segue o protocolo de Constandinou e colaboradores (2005).



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CONSTANDINOU, C.; HENDERSON, N.; IREDALE, J. P. Modeling liver fibrosis in rodents. *Fibrosis Research: Methods and Protocols*, v. 117, p. 237-250, 2005.

Santa Maria, 17 de junho de 2019

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria




My Author Tasks

[Start New Submission](#)

[Click here](#) to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

[Effects of *Plinia peruviana* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo](#)

Current status: With Editor  (16/Nov/2019)

JEP_2019_4372

Managing Editor: Ilze Vermaak

Article Type: Research Paper

Initial submission : 16/Nov/2019