

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

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Solanum guaraniticum*  
E *Syzygium jambos* SOBRE PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

**TESE DE DOUTORADO**

**Gabriela Bonfanti**

**SANTA MARIA-RS  
2014**

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Solanum guaraniticum* E  
*Syzygium jambos* SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELOS *IN VITRO* E *IN  
VIVO***

**Gabriela Bonfanti**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia**

**Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Beatriz Moretto**

**Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Thissiane de Lima Gonçalves**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

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

Bonfanti, Gabriela

Efeitos dos extratos de *Solanum guaraniticum* e *Syzygium jambos* sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em modelos *in vitro* e *in vivo* / Gabriela Bonfanti.-2014.

156 p.; 30cm

Orientadora: Maria Beatriz Moretto

Coorientadora: Thissiane de Lima Gonçalves

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Plantas Medicinais 2. *Solanum guaraniticum* 3. *Syzygium jambos* 4. Estresse oxidativo 5. Toxicidade I. Moretto, Maria Beatriz II. Gonçalves, Thissiane de Lima III. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Solanum guaraniticum* E  
*Syzygium jambos* SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELOS IN VITRO E IN  
VIVO**

elaborada por  
**Gabriela Bonfanti**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Maria Beatriz Moretto, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

**Caroline Dani, Dra (IPA)**

**Marina Prigol, Dra. (UNIPAMPA)**

**Maria Amália Pavanato, Dra. (UFSM)**

**Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 22 de janeiro de 2014.

*"O universo sempre conspira a seu favor quando você possui um objetivo claro e uma disponibilidade de crescimento. De uma coisa podemos ter certeza: de nada adianta querer apressar as coisas; tudo vem ao seu tempo"*

*Paulo Coelho*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho. Pela serenidade e força interior que eu encontrei quando foi necessário.

Aos meus pais e irmã por estarem sempre apoiando meus caminhos e incentivando minhas escolhas. Por se fazer presentes em cada dia dessa caminhada, dando o todo o suporte necessário que eu precisei para realizar esse objetivo. Também aos meus avôse avós, tios e tias, primos e afilhados amados pelo amor, carinho, cuidado e saudades sentidas.

Ao meu namorado Herton, agradecimentos infinitos. Muito obrigada pelos momentos de alegria, paciência, convívio, carinho, compreensão. Certamente os frutos desse trabalho serão colhidos ao teu lado e compartilhados contigo.

As minhas amigas de Ibirubá: Cris, Leli, Fran, Dani, Sil, Glau e Ludi por entenderem minha ausência em certos momentos e me alegrarem em tantos outros. Vocês são à prova de que a verdadeira amizade resiste ao tempo e a distância. Muito obrigada por isso!

As minhas amigas e colegas farmacêuticas Débora, Simone, Sílvia, Liz e Ana Paula. Com certeza vocês foram o primeiro e maior presente que o curso de farmácia me proporcionou. Fico muito feliz de levar vocês comigo nessa caminhada.

Aos colegas do LAB 1207, Karine, Paula, Lariane, Priscila, Raphaela, Thainan, Letícia e Leidiane, por terem acreditado nos meus objetivos e me ajudado a construir esse trabalho. Principalmente por terem feito isso de forma bastante agradável e diversas vezes divertidas. Adoro vocês!

Aos funcionários do DACT, Ângela, Marinês, Rosane, Zé, Adolfo, Helena, e aos vizinhos de laboratório Guilherme, Manu, Pauline, Eti, pela amizade, paciência e dedicação, por estarem sempre dispostos a ajudar e colaborar com a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia que de alguma maneira contribuíram para a construção do meu conhecimento científico.

Às professoras Tatiana Emanuelli, Marina Prigol, Caroline Dani e Maria Amália Pavanato que aceitaram avaliar essa tese. Certamente sua opinião e sugestões

serão importantes para o aprimoramento desse trabalho. Também à professora Taís Unfer por ter aceito o convite.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

A CAPES, pela bolsa concedida!

A professora Thissiane, pelos vários anos de convívio e aprendizado, que hoje se justificam por uma grande amizade. Foi responsável pelo meu primeiro passo na área da pesquisa científica e certamente teve um papel muito especial durante todo o caminho. Além disso, é exemplo de pessoa e profissional que certamente levarei comigo. Muito obrigada por todas as oportunidades e pelo apoio nas minhas escolhas. Por toda ajuda e orientação na elaboração desse trabalho.

A professora Maria Beatriz por ter acreditado em mim, oportunizando-me esse aprendizado. Pela dedicação, paciência, carinho, amizade e orientação desse trabalho, mesmo nos seus momentos mais difíceis. Essa é uma prova da sua integridade, determinação e comprometimento, qualidades admiráveis e que me farão ser eternamente grata. Sei que a nossa relação não acabará aqui e, assim espero, pois levarei seus exemplos pessoais e profissionais comigo. Muito obrigada por tudo!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Solanum guaraniticum* E *Syzygium jambos* SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Autora: Gabriela Bonfanti  
Orientadora: Maria Beatriz Moretto  
Co-orientadora: Thissiane de Lima Gonçalves  
Data e local: Santa Maria, 22 de janeiro de 2014

O uso de plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças é prática comum, apesar de poucas terem seus efeitos estudados cientificamente. A *Solanum guaraniticum*, conhecida também como falsa jurubeba, é uma planta amplamente distribuída no Rio Grande do Sul e utilizada para o tratamento de distúrbios gástricos e hepáticos. Já o *Syzygium jambos*, conhecido popularmente como “jambolão”, tem suas folhas, sementes e frutos utilizados para o tratamento do diabetes mellitus. Assim, considerando a popularidade das espécies acima citadas e a escassez de dados sobre os seus perfis farmacológico e toxicológico, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos extratos de folhas de *S. jambos* e *S. guaraniticum* sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os extratos apresentaram vitamina C e compostos fenólicos, dentre os quais foram identificados: ácido gálico, elágico e clorogênico, catequina e epicatequina, rutina, quercitina, quercitrina, isoquercitrina e canferol em ambos os extratos, e ácido cafeico somente no extrato de *S. jambos*. Em modelos de indução de estresse oxidativo, os extratos apresentaram efeito anti-hemolítico em eritrócitos humanos, e foram capazes de diminuir o processo de lipoperoxidação, efeito também observado em tecido renal, cerebral e hepático de ratos, *in vitro*. Nesses tecidos, ambos os extratos também foram capazes de proteger os grupos tióis. Os extratos apresentaram capacidade removedora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, atividade quelante de íons Fe<sup>2+</sup> e capacidade redutora, comprovando sua ação antioxidante. Em todos os testes realizados, o extrato de *S. jambos* se mostrou mais potente como antioxidante e ainda apresentou atividade mimética às enzimas tiol-peroxidases. Observou-se uma inibição da atividade da δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) em eritrócitos humanos por ambos os extratos, sendo que o de *S. guaraniticum* foi mais potente nesses ensaios. É possível sugerir um envolvimento dos íons zinco do sítio ativo da enzima nesse mecanismo de inibição. O extrato de *S. guaraniticum* administrado *in vivo*, não foi capaz de provocar alterações na atividade da enzima δ-ALA-D, assim como nas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e N-acetyl-b-D-glucosaminidase. O teste de letalidade da *Artemia salina* demonstrou que ambos os extratos são biologicamente ativos. Em linfócitos, *in vitro*, o extrato de *S. jambos* alterou a atividade mitocondrial e inibiu a atividade da AChE, sugerindo um efeito imunomodulatório enquanto que o extrato de *S. guaraniticum* apresentou efeitos citotóxicos. Na avaliação da toxicidade aguda do extrato de *S. guaraniticum* foi possível identificar que a DL<sub>50</sub> é superior a 5000 mg/kg e, portanto, esse extrato pode ser considerado não tóxico para o consumo humano. Além disso, apesar de os animais não terem apresentado alterações corporais, hematológicas e bioquímicas significativas, o tratamento com o extrato de *S. guaraniticum* foi capaz de causar uma alteração no teste do campo aberto. A redução no número de cruzamentos e levantadas pode indicar um efeito depressor, que parece ser tardio e não permanente. Portanto, as espécies vegetais estudadas podem ser reconhecidas como fonte de antioxidantes naturais e tem uso prospectivo na medicina preventiva contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo, mas seu uso popular deve ser feito com cautela até que uma maior investigação em relação ao perfil toxicológico dos extratos seja realizada.

**Palavras-chave:** *Solanum guaraniticum*, *Syzygium jambos*, plantas medicinais, δ-aminolevulinato desidratase, antioxidantes, hemólise.



# ABSTRACT

PhD thesis  
Graduation Program of Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

## EFFECTS OF *Solanum guaraniticum* AND *Syzygium jambos* EXTRACTS ON BIOCHEMICAL AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN IN VITRO AND IN VIVO MODELS

Author: Gabriela Bonfanti  
Advisor: Maria Beatriz Moretto  
Co-advisor: Thissiane de Lima Gonçalves  
Place and date: Santa Maria, January 22, 2014

The use of medicinal plants for the treatment and prevention of disease is a common practice, despite their effects are few studied scientifically. *Solanum guaraniticum*, also known as false jurubeba, is a medicinal plant widely distributed in Rio Grande do Sul and used for the treatment of gastric and hepatic disorders. Similarly, *Syzygium jambos* has its leaves, seeds and fruits used for the treatment of diabetes mellitus. Therefore, considering the popularity of the species mentioned above and the lack of data on their pharmacological and toxicological profiles, the aim of this study was to evaluate the effect of leaf extracts of *S. jambos* and *S. guaraniticum* on biochemical and oxidative stress parameters in *in vitro* and *in vivo* models. The extracts showed vitamin C and phenolic compounds, among which were identified gallic, chlorogenic and ellagic acids, catechin, epicatechin, rutin, quercitrin, isoquercitrin, quercetin and kaempferol in both extracts and caffeic acid only in *S. jambos* extract. In models of oxidative stress induction, both extracts exhibited anti-hemolytic effect on human erythrocytes and were capable of decrease the process of lipid peroxidation, and this last effect was also observed in kidney, liver and brain tissues of rats, *in vitro*. In these tissues, both extracts were also able to protect the thiol groups. The extracts showed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO scavenging ability, Fe<sup>2+</sup> chelating activity and reducing capacity, proving its antioxidant action. In all assays, the extract of *S. jambos* was more potent as an antioxidant and also showed thiol-peroxidase - like activity. We observed an inhibition of the activity of δ-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) in human erythrocytes by both extracts, and the *S. guaraniticum* was more potent in this assay. It is possible to suggest an involvement of zinc ions of the active site of this enzyme in this inhibition mechanism. The extract of *S. guaraniticum* administered *in vivo*, was not able to cause changes in the activity of the enzyme δ-ALA-D, as well as enzymes acetylcholinesterase and N-acetyl-b-D-glucosaminidase. The *Artemia salina* lethality test showed that both extracts are biologically active. In lymphocytes, *in vitro*, the extract of *S. jambos* altered mitochondrial activity and inhibit AChE activity, suggesting an immunomodulatory effect, while the extract of *S. guaraniticum* shows cytotoxic effects. In the acute toxicity evaluation of the extract of *S. guaraniticum* was possible to identify that the LD<sub>50</sub> is greater than 5000 mg/kg and, therefore, this extract can be considered non-toxic for human consumption. Furthermore, although the animals did not show significant bodily, hematological and biochemical changes, the treatment with the extract of *S. guaraniticum* was able to cause an alteration in the open field test. The reduction in the number of crossing and rearing may indicate a depressant effect, which seems to be delayed and short-lasting. Therefore, the vegetal species studied can be recognized as sources of natural antioxidants and have prospective use in preventive medicine against oxidative stress related diseases, although its popular use should be done with caution until further studies regarding the toxicological profile of the extracts is performed.

**Keywords:** *Solanum guaraniticum*, *Syzygium jambos*, medicinal plants, δ-aminolevulinic acid dehydratase, antioxidants, hemolysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas.....	13
Figura 2 - Número de municípios por unidade federativa que oferecem plantas medicinais e/ou fitoterápicos, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul.....	14
Figura 3 - <i>Solanum guaraniticum</i> (A) e <i>Solanum paniculatum</i> (B).....	18
Figura 4 - Distribuição geográfica das espécies <i>Solanum paniculatum</i> (A) e <i>Solanum guaraniticum</i> (B) no Brasil.....	19
Figura 5 - <i>Syzygium jambos</i> (A) e <i>Syzygium cumini</i> (B).....	21
Figura 6 - Distribuição geográfica das espécies <i>Syzygium cumini</i> (A) e <i>Syzygium jambos</i> (B) no Brasil.....	22
Figura 7 - Mecanismos de ação antioxidante enzimático.....	26
Figura 8 - Principais classes de fitoquímicos naturais.....	29
Figura 9 - Estrutura básica dos flavonóides.....	30
Figura 10 - Larva de <i>Artemia salina</i> .....	36
Figura 11 - Ilustração esquemática do mecanismo catalítico da $\delta$ -ALA-D.....	44

### ARTIGO

Figure 1 - HPLC/DAD profile of extracts tested (detection UV at 271nm) and quantification of phenolic compounds founded.....	50
Figure 2 - Thiol peroxidase-like activity of aqueous extracts tested.....	52
Figure 3 - NO scavenging activity of aqueous extracts tested.....	52

### MANUSCRITO 1

Figure 1 - (A) Iron chelating effect, (B) $H_2O_2$ scavenging activity and (C) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of leaf extracts of <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> and Ascorbic acid as a function of their concentrations.....	81
Figure 2 - Effect of leaf extracts of <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> on erythrocyte $\delta$ -ALA-D activity.....	82
Figure 3 - Effect of <i>Solanum guaraniticum</i> and <i>Syzygium jambos</i> extract on $H_2O_2$ induced TBARS level (3A) and on NP-SH content of $H_2O_2$ induced (3B) or non-induced (3C) erythrocytes.....	82
Figure 4 - Protective effect of leaf extracts of <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> on AAPH-induced hemolysis.....	83
Figure 5 - Alteration of osmotic fragility in erythrocytes treated with AAPH or AAPH plus extracts.....	83

### MANUSCRITO 2

Figure 1 - Figure 1. HPLC/DAD profile of extracts tested and quantification of phenolic compounds found.....	100
Figure 2 - Viability tests of spleen lymphocytes treated with <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> extracts.....	101
Figure 3 - Effect of extracts tested on acetylcholinesterase activity of spleen lymphocytes.....	101

### MANUSCRITO 3

Figure 1– Open field exploration. The effect of different single doses of *S. guaraniticum* extract in rats was evaluated after 3 h, 48 h and 14 days of treatment.....128

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Categorias de avaliação de risco de toxicidade aguda.....37

### ARTIGO

Table 1 - Total phenols, total flavonoids and vitamin C contents in aqueous extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* .....51

Table 2 - Effect of extracts on tissue  $\delta$ -ALA-D and AChE activity in rat homogenates.....53

Table 3 - Effect of aqueous extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on lipid peroxidation level before and after sodium nitroprusside (SNP) incubation of rat homogenates.....54

Table 4 - Effect of aqueous extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on non-protein thiol (NPSH) content and catalase activity in the liver, brain and kidney of rats.....55

### MANUSCRITO 1

Table 1 - Effect of DTT or Zn on  $\delta$ -ALA-D inhibition caused by *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts .....80

### MANUSCRITO 2

Table 1 - *Artemia salina* lethality test of plant extracts under study.....99

### MANUSCRITO 3

Table 1 - Quantification of phenolic compounds found in HPLC analyses.....122

Table 2 - Body weight and organ body index of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment .....123

Table 3 - Hematological profile of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.....124

Table 4 - Serum biochemical parameters of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.....125

Table 5 - Tissue enzyme activity of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.....126

Table 6 - Oxidative status of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.....127

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-Azobis(-amidinopropano) dihidrocloridrato
ABIFISA	Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
$\delta$ – ALA-D	Delta- Aminolevulinato Desidratase
$\delta$ – ALA	Ácido Aminolevulínico
$Ag^{2+}$	Íon prata
BuChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
$Cu^{2+}$	Íon cobre
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DTNB	5´5´-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
$Fe^{2+}$	Íon ferro
FRAP	Capacidade redutora de Ferro
GSH	Glutationa Reduzida
GPx	Glutationa Peroxidase
$Hg^{2+}$	Íon mercúrio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MTT	brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) – 2, 5 - difeniltetrazólio
NAG	N-Acetyl-b-d-glucosaminidase
NO	Óxido nítrico
– NPSH	Grupamento Tiol não proteico
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Ânion Radical Superóxido
IO <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
OH <sup>•</sup>	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
$Pb^{2+}$	Íon chumbo
PBG	Porfobilinogênio Monopirrólico
PBG-sintase	Porfobilinogênio Sintase
- PSH	Grupamento Tiol proteicos
RBC	Células Vermelhas do Sangue
RO <sup>•</sup>	Radical Alcoxila
ROO <sup>•</sup>	Radical Peroxila
-SH	Grupamento Tiol
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Nitroprussiato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
$Zn^{2+}$	Íon zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>09</b>
<b>1.1 O uso de Plantas Medicinais</b> .....	<b>09</b>
<b>1.2 Uso de plantas medicinais no Brasil</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Família Solanacea: <i>Solanum guaraniticum</i> .....	16
1.2.2 Família Myrtaceae: <i>Syzygium jambos</i> .....	20
<b>1.3 Toxicidade de Plantas Medicinais</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4 Estresse Oxidativo</b> .....	<b>25</b>
<b>1.5 Plantas medicinais e estresse oxidativo</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6 Eritrócitos</b> .....	<b>31</b>
<b>1.7 Linfócitos</b> .....	<b>33</b>
<b>1.8 Teste de letalidade da <i>Artemia salina</i></b> .....	<b>35</b>
<b>1.9 Teste oral de toxicidade aguda</b> .....	<b>36</b>
<b>1.10 Marcadores enzimáticos</b> .....	<b>38</b>
1.10.1 Acetilcolinesterase .....	38
1.10.2 N-Acetyl-b-d-glucosaminidase.....	40
1.10.3 $\delta$ Aminolevulinato desidratase .....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>45</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>45</b>
<b>3 ARTIGO</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> Show Similar Antioxidant Properties but Induce Different Enzymatic Activities in the Brain of Rats</b> .....	<b>48</b>
<b>4 MANUSCRITOS</b> .....	<b>64</b>
<b>4.1 <math>\delta</math>-ALA-D inhibitory potential and antihemolytic activity of <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> leaf extracts</b> .....	<b>65</b>
<b>4.2 Assessment of cytotoxic effects on spleen lymphocytes and <i>Artemia salina</i> lethality test of <i>Syzygium jambos</i> and <i>Solanum guaraniticum</i> leaf extracts</b> ....	<b>85</b>
<b>4.3 Safety assessment and behavioral effects of leaf extract of <i>Solanum guaraniticum</i> in rats</b> .....	<b>103</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>129</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>135</b>

## **APRESENTAÇÃO**

O presente trabalho consiste na apresentação dos resultados obtidos, para fins de defesa de Tese de Doutorado. Tais resultados são apresentados na forma de um artigo publicado e três manuscritos submetidos em periódicos científicos.

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: a primeira parte refere-se à INTRODUÇÃO e OBJETIVOS, sendo seguida pelas seções ARTIGO e MANUSCRITOS, onde são apresentados os quatro trabalhos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências são apresentadas nos próprios artigo ou manuscritos, representando os resultados obtidos. Na sequência, os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO apresentam uma síntese dos resultados e comentários gerais sobre os trabalhos apresentados.

Por fim, as REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS utilizadas para as citações dos itens INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO deste trabalho.





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O uso de plantas medicinais

O uso medicinal de plantas para tratar diversas doenças em humanos e seus animais tem sido tradição por séculos em várias culturas (VERNANI; GARG, 2002). Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso (CALIXTO, 2000). Apesar dessa grande evolução da medicina alopática, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos, a carência de recursos dos órgãos públicos de saúde e incessantes aumentos de preço nos medicamentos alopáticos. Esses motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, bem como os efeitos colaterais apresentados por alguns medicamentos, contribuem para o crescente interesse na fitoterapia (PARENTE; ROSA, 2001; VEIGA Jr; PINTO; MACIEL, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2003), planta medicinal é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos, sendo planta fresca aquela coletada no momento de uso e planta seca aquela que foi precedida de secagem, equivalendo à droga vegetal. Já um fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais sendo que não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (BRASIL, 2004). Além disso, a produção de fitoterápicos requer necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. É essa fundamentação científica necessária para o desenvolvimento de um produto fitoterápico que o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et. al., 2007).

Atualmente, a OMS observa que 70% a 90% da população dos países em vias de desenvolvimento depende das plantas medicinais no que se refere à Atenção Primária a Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1993; 2011). Em alguns países industrializados, o uso de produtos naturais é igualmente significativo, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de sua população usam esses recursos da medicina tradicional sob a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (WHO, 2011).

Além de sua importância na medicina tradicional, as plantas podem fornecer para a indústria farmacêutica os princípios ativos que serão comercializados como remédios (DI STASI, 1996). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente das plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias ao conhecimento tradicional. No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, essa percentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2011). De fato, uma análise dos produtos naturais como fontes de novas drogas no período de 1981-2002 mostrou que 67% das novas entidades químicas são formalmente sintéticas. Entretanto, somente 39% dessas são verdadeiramente sintéticas, sendo que o restante deriva de algum produto natural, principalmente plantas medicinais (GURIB-FAKIM, 2006).

Nos dias de hoje, na maioria das sociedades, os sistemas de medicina alopática e tradicional ocorrem lado a lado de forma complementar. O primeiro trata condições sérias e agudas enquanto que o segundo é usado para enfermidades crônicas, reduzir sintomas e melhorar a qualidade de vida com uma boa relação custo-benefício (GURIB-FAKIM, 2006). Os estudos sobre a medicina popular tem demonstrado que as plantas medicinais são utilizadas na forma bruta (não processadas), como infusões, decocções e tinturas ou como fitoterápicos (extratos padronizados e formulados de plantas), geralmente como alternativa aos produtos medicinais alopáticos (GURIB-FAKIM, 2006; VALE, 2002). Ainda, as plantas medicinais e seus derivados (fitoterápicos) são usados como medicação prescrita ou sem receita, automedicação ou autocuidado, remédio caseiro, ou como suplemento dietético, alimentos para a saúde, alimentos funcionais, fitoprotetores, dentre outros (WHO, 2011).

## 1.2 Plantas medicinais no Brasil

No Brasil, diferentes tradições terapêuticas contribuíram para a formação da medicina popular (AMOROZO, 2004). Além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as colaborações trazidas pelos escravos e imigrantes representaram papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (SIMÕES et al., 1995).

No país, 20% da população brasileira é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006). Assim, cerca de 80% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde. Na maioria dos casos, as espécies são utilizadas de acordo com a tradição popular, transmitida entre gerações, na forma de automedicação e sem qualquer preocupação quanto à procedência e qualidade da droga vegetal, preparação derivada ou fitoterápica (RATES, 2001; RODRIGUES; SANTOS; DE SIMONI, 2010; SCHENKEL et al, 1986; SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Dentro da biodiversidade brasileira, alguns exemplos importantes de plantas medicinais são: *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Psidium guajava* (guava), *Spilanthes acmella* (jambu), *Tabebuia sp.* (lapacho), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) e *Copaifera sp.*(copaíba) (GURIB-FAKIM, 2006).

O possível benefício das medicações derivadas de plantas constitui uma área de pesquisa recompensadora, particularmente em países como o Brasil, que tem uma biodiversidade rica em fontes de plantas naturais juntamente com uma alta prevalência e variedade de doenças infecciosas (BRANDÃO et al, 2008). Entretanto, embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (PRANCE, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisa de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA; NODARI, 2001).

De fato, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são quase que na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China, Coréia e Japão, sendo que a contribuição dos outros países é bem menor (LOZOYA, 2001). Em termos globais, o mercado de

fitoterápicos movimentam anualmente cerca de US\$ 20 bilhões e é um segmento em ascensão. A previsão é de que o setor que utiliza plantas como matéria-prima (incluindo medicamentos, alimentos e cosméticos) deve atingir US\$ 93 bilhões em 2015 (VALÉCIO, 2013).

Nacionalmente, de acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa) atualmente o setor de medicamentos fitoterápicos representa 3% do mercado farmacêutico total do Brasil, com faturamento da ordem de US\$ 1 bilhão (VALÉCIO, 2013). Entretanto, o país importa cerca de 100% da matéria-prima utilizada na produção dos produtos sendo que a maioria dos extratos vegetais que originam os fitoterápicos consumidos é proveniente da Europa e da Ásia e os insumos mais comercializados, ginkgo biloba, valeriana, castanha-da-índia, entre outros hoje, são de origem estrangeira (ADAME; JACCOUD; COBRA, 2005; VALÉCIO, 2013). Portanto, apesar da rica biodiversidade, dos fitoterápicos registrados na ANVISA, apenas uma pequena parte é oriunda de espécies nativas, o que demonstra necessidade de investimentos em pesquisas com espécies da flora nacional (MIOTO, 2010).

Atualmente, aproximadamente 80% da população europeia e mais de 40% da população dos países asiáticos consome medicamento fitoterápico. No Brasil, apesar do crescimento expressivo registrado nos últimos anos, estima-se que apenas 10% das pessoas consumam esse tipo de produto industrializado. Em parte, isso se explica pelo fato de o mercado brasileiro de fitoterápicos ainda ser recente em comparação aos europeus e asiáticos, pela frequência inferior de prescrições médicas desses produtos e pela falta de conhecimento dos enormes benefícios dos medicamentos fitoterápicos por uma faixa considerável da população brasileira (VALÉCIO, 2013).

Por sua vez, o Ministério da Saúde tem encorajado o desenvolvimento de estudos com plantas medicinais tradicionais, com a esperança de obter os possíveis benefícios que as pesquisas sobre este assunto podem trazer e evitar efeitos irracionais ou prejuízos que esse tipo de medicina pode ocasionar (FRANCO; BARROS, 2006). As ações e programas do Ministério da Saúde com plantas medicinais e fitoterapia são distribuídos em todas as regiões do País e ocorrem de maneira diferenciada, principalmente com relação às espécies de plantas disponibilizadas em cada região em virtude dos diferentes biomas. Atualmente, os

principais instrumentos norteadores para o desenvolvimento das ações/programas com plantas medicinais e fitoterapia são: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, com diretrizes e linhas de ação para “Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS”, e a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, com abrangência da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2012).

Por meio da institucionalização dessa prática, houve grande expansão da oferta de ações e serviços de fitoterapia nos últimos anos. Em 2008, as ações e serviços fitoterápicos fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) eram ofertados em 350 municípios/estados, distribuídos em todas as regiões do país (Figuras 1 e 2). Nesses, os serviços disponibilizam plantas medicinais em uma ou mais das seguintes formas: planta *in natura*, planta seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado (BRASIL, 2008).

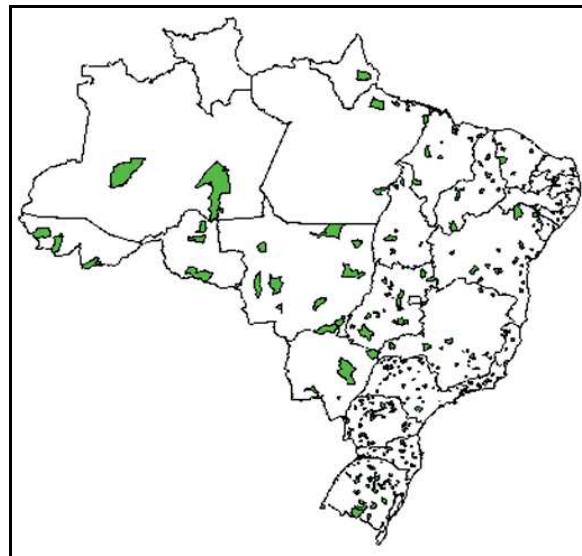


Figura 1 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas

Fonte: adaptado de BRASIL, 2012.

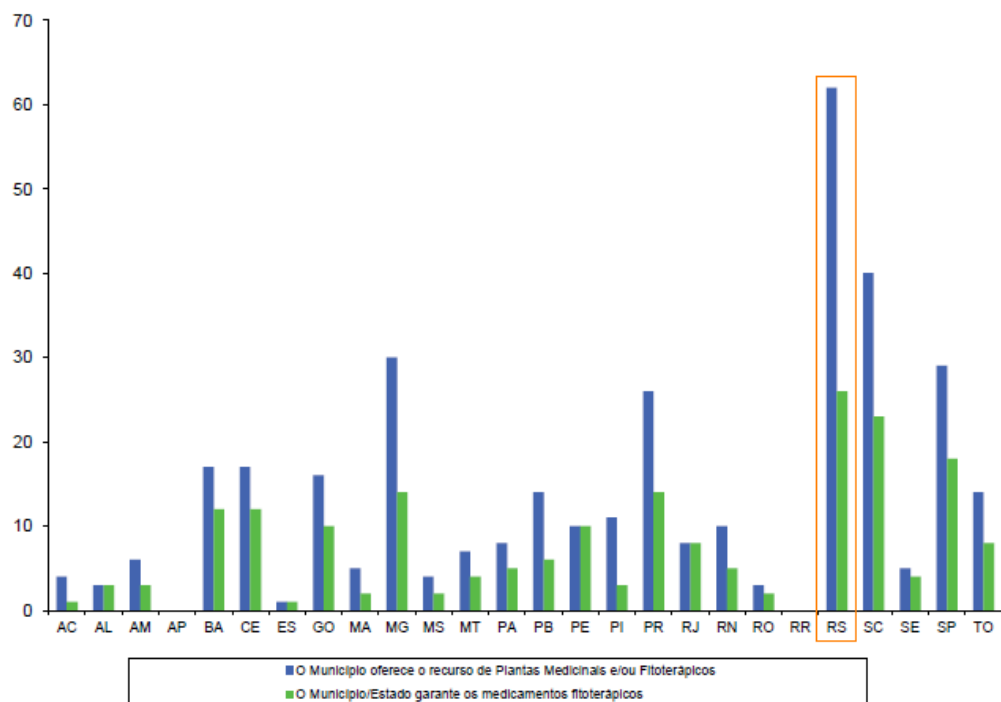


Figura 2 – Número de municípios que por unidade federativa que oferecem plantas medicinais e/ou fitoterápicos, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul.

Fonte: adaptado de BRASIL, 2012.

Os estudos sobre a utilização de plantas medicinais no Brasil são de modo geral realizados em municípios e comunidades específicas, mas têm permitido identificar algumas características do uso das plantas medicinais pela população brasileira. Alguns desses estudos demonstram o uso popular de plantas tanto nativas quanto exóticas (GARLET; IRGANG, 2001). No que se refere à forma de vida, a maioria das espécies são ervas, seguidas de árvores e arbustos e a parte mais utilizada nas preparações são as folhas. Frutos, cascas, flores e raízes e, em menor quantidade, sementes, resinas e látex também são utilizadas. A predominância do uso de folhas é freqüente no Rio Grande do Sul (GARLET; IRGANG, 2001; MARODIN; BAPTISTA, 2001), sendo que o uso de cascas e raízes é padrão mais comum em outras formações vegetais como o cerrado e a caatinga, onde a disponibilidade de folhas pode ser limitada (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; AMOROZO, 2002).

Além disso, a maior parte das plantas medicinais referidas nas pesquisas é cultivada nas moradias, em quintais e jardins, e em menor frequência adquirida na

forma de chás industrializados e comercializados em farmácias, drogarias e supermercados (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005; TAUFNER; FERRAÇO; RIBEIRO, 2006). Nesse sentido, a maioria das sociedades rurais brasileiras, quintais e pomares próximos à moradia desempenham importante função na manutenção de muitas espécies medicinais (AMOROZO, 1996).

As indicações terapêuticas mais frequentes estão relacionadas com as doenças do aparelho respiratório e digestivo, mas o tratamento de dores e febre e de afecções do sistema geniturinário e circulatório também são citadas (AMOROZO, 1998; AMOROZO, 2002; BENNET; PRANCE, 2000; HANAZAKI; LEITÃO FILHO; BEGOSSI, 1996; NEGRELLE et al., 2007; PILLA, AMOROZA, FURLAN, 2006; SILVA-ALMEIDA; GALLOTTE; RIBEIRO 2005;). Em relação à forma de utilização das plantas, 50% das espécies medicinais são consumidas como chás para beber, seguido de xaropes e alcoolaturas. Os chás das folhas são preparados por infusão ou decocção, revelando que algumas vezes a planta é utilizada de forma errônea já que só as partes duras (raiz, caule e casca) devem ser cozidas. Também, no estado do Rio Grande do Sul muitas plantas são colocadas no chimarrão e tomadas diariamente. Os xaropes, preparados no inverno, são usados principalmente para tosse, gripe e bronquite. Já dentre as alcoolaturas, destaca-se uma mistura de cachaça com grande quantidade de ervas que é preparado para uso tópico e usado em machucados, contusões, dores musculares, inflamações, dores reumáticas e outras enfermidades (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

O perfil da população que faz uso de plantas medicinais inclui principalmente pessoas de baixa renda e escolaridade, com acesso dificultado aos medicamentos alopáticos. A maioria dos usuários envolvidos nos estudos relata ter aprendido sobre plantas com seus ascendentes e demais familiares ou pessoas do convívio social. Assim, a preservação da sabedoria popular é importante, como uma forma de proteger o conhecimento das comunidades (SCHULTES, 1988). Entretanto, constatam-se perdas de conhecimento tradicional associado à biodiversidade brasileira e conseqüente diminuição do número de espécies empregadas para tratamento das enfermidades. Isso se deve à redução das áreas naturais e a desvalorização dos saberes tradicionais pelas novas gerações, associados ao crescente acesso à medicina convencional (AMOROZO, 2002).

Esse conhecimento popular a respeito das propriedades terapêuticas das plantas é um requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um

produto fitoterápico. Por isso, a pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas. Logo, a ampliação da produção científica referente a plantas medicinais é de grande importância, pois desta forma poderá ser criada uma base científica para a prescrição de drogas vegetais em que a eficácia e toxicidade possam ser previstas e posteriormente avaliadas, além da implantação de avaliações farmacológicas e metodologias para o controle de qualidade (CALIXTO, 2000). Além disso, há pouca difusão e divulgação desses resultados obtidos para a população em geral e consumidora, tornando urgente a difusão desses conhecimentos, principalmente no sentido de informar e alertar sobre os possíveis males causados por determinadas plantas ou grupos vegetais à população (AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007).

#### 1.2.1 Família Solanaceae: *Solanum guaraniticum*

A família Solanaceae A. Juss é uma das maiores famílias vegetais das plantas angiospérmicas e compreende cerca de 93 gêneros e 2.300 espécies com distribuição cosmopolita, tendo a América do Sul como um dos principais centros de diversidade e endemismo (HUNZIKER, 2001, MIZ, 2006). Diversas espécies possuem grande importância econômica, agrícola e farmacêutica, sendo algumas alimentícias, tais como: *Solanum tuberosum* L. (batata-inglesa), *Solanum melongena* L. (berinjela), *Lycopersicon esculentum* L. (tomate), *Capsicum anuum* L. (pimentão), além de outras de interesse regional e ornamental como *Petunia axillaris* e *Petunia violácea* (petúnias). Outras espécies são conhecidas por seus produtos naturais com propriedades farmacológicas e tóxicas que desempenham grande importância na medicina e na produção de drogas terapêuticas (RODDICK, 1991).

Da família Solanaceae, o gênero *Solanum* L. está amplamente distribuído em todas as regiões do mundo, compreendendo mais de 1400 espécies (BOHS, 2005) sendo que a maioria ocorre na América do Sul, principalmente ao longo da Cordilheira dos Andes e da costa do Pacífico (HUNZIKER, 2001). Os representantes nativos deste gênero são ervas, arbustos, árvores ou lianas, distribuídos em diversas formações vegetais, tanto campestres quanto florestais, sendo muito



comuns na borda de florestas e locais alterados, como margens de estradas (MENTZ; OLIVEIRA, 2004).

De modo geral, as espécies do gênero *Solanum* apresentam uma variedade grande de saponinas esteroidais e glicoalcalóides, os quais atuam promovendo a resistência natural destas plantas contra as pragas (OLIVEIRA et al., 2006) e a indústria farmacêutica utiliza tais produtos do metabolismo secundário como fonte de substâncias ativas. Por exemplo, os alcalóides esteroidais encontrados em *Solanum* são utilizados na produção de esteróides farmacêuticos e também se mostram relacionados com compostos antitumorais e com agentes que auxiliam contra a esquistossomíase (RODDICK, 1991; SILVA; AGRA; BHATTACHARYYA, 2005). Além dos alcalóides, os compostos fenólicos constituem um dos grupos de substâncias frequentes em espécies desse gênero (ARAÚJO et al., 2010; SILVA et al., 2003).

Esse gênero é bem representado no Brasil e amplamente distribuído do norte ao sul em diversas regiões fitogeográficas. Muitas dessas espécies são endêmicas do país e bem representadas na região nordeste onde se encontram aproximadamente 80 espécies. No Rio Grande do Sul foram registradas 61 espécies nativas de *Solanum* (MENTZ et al., 2007). Cerca de 20 dessas espécies de *Solanum* são amplamente usadas na medicina popular, tanto regional quanto nacional, conhecidas como Jurubeba e utilizadas sem distinção. Tal denominação é derivada do tupi-guarani “Yuru’peebe”, que significa *papagaio achatado*, sendo uma alusão aos espinhos amarelos, achatados e curvos semelhantes a bicos de papagaios, comuns em várias espécies do gênero *Solanum* (JOLY, 1987). Segundo Correa, Batista, Ovinhes (2003) essas plantas apresentam atividade farmacológica e tóxica e são utilizadas nas afecções hepáticas, das vias biliares, dispepsia, quadros febris, astenia, úlceras pépticas, anemias carenciais e diabetes mellitus, possuindo ainda, atividade diurética. As folhas são utilizadas em cataplasmas, como cicatrizantes, porém, deve-se evitar uso prolongado, pois em sua composição estão alcalóides e esteróides, isopirubidina, panicutmina A e B, isopaniculidina, alquilaminas, saponinas (jurubina) e substâncias resinosas.

Entretanto, a Farmacopéia Brasileira descreve a espécie *Solanum paniculatum* L. como a “jurubeba verdadeira” (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1929). Essa espécie é a mais amplamente distribuída no país, acompanhando a costa Atlântica do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, em todas as formações

vegetais (Figura 3). É exclusiva da América do Sul, sendo encontrada também no Paraguai e Argentina (NEE,1999). Essa espécie tem sido extensamente estudada devido a seus efeitos protetores hepáticos e propriedades gástricas anti-secretórias (COMISSÃO GEOGRÁFICA E GEOLOGIA, 1972). De fato, estudos prévios em camundongos apresentaram uma associação direta da atividade antiúlcera dos extratos metabólicos de *S. paniculatum* com a atividade anti-secretora do suco gástrico, validando o uso folclórico da planta para o tratamento de doenças gástricas (MESIA-VELA et al, 2002). Também, extratos de todas as partes da planta têm sido mencionados como antiviral (VALADARES et al., 2009), antiinflamatório (ENDRINGER et al., 2010), antioxidante (RIBEIRO et al., 2007), diurético e hepatoprotetor (AGRA et al., 2007). Do ponto de vista químico, são encontrados saponinas e alcalóides, cujos compostos apresentam algum efeito tóxico (MIZ, 2006).

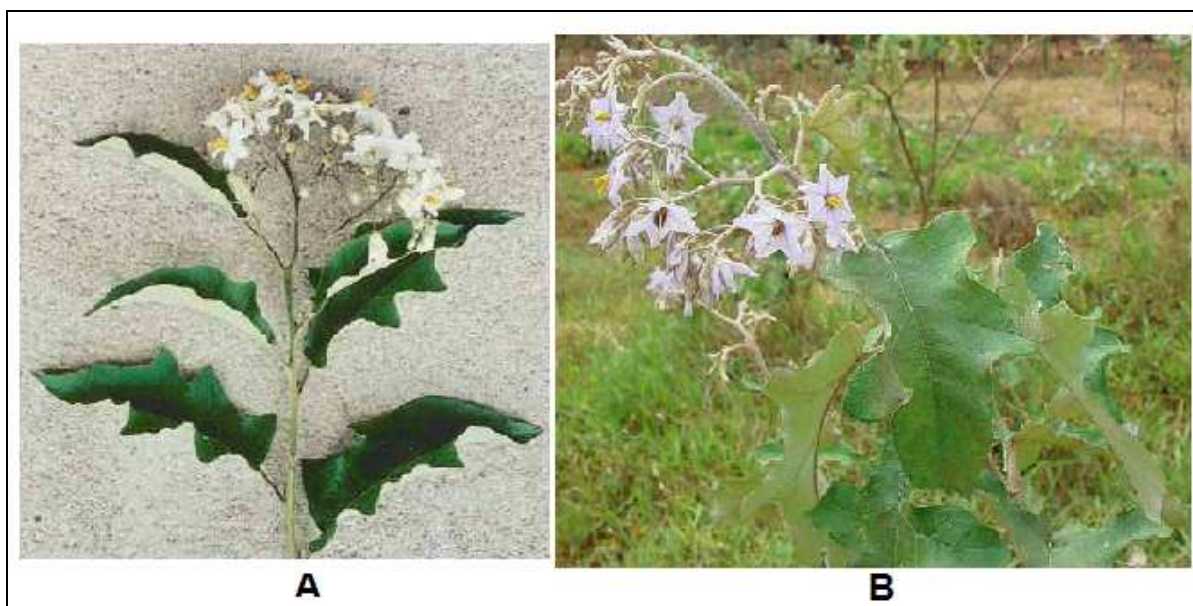


Figura 3 – *Solanum guaraniticum* (A) e *Solanum paniculatum* (B).

Fonte: adaptado de MOREIRA; BRAGANÇA, 2010.

A espécie *Solanum guaraniticum* A. St-Hil (sinônimo: *Solanum fastigiatum* var. *acicularium* Dunal), ocorre no Paraguai, Uruguai, Argentina e no Brasil nos estados

de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 4). É utilizada na farmacopéia popular em substituição à verdadeira jurubeba, no entanto têm sido registrados casos de intoxicação em bovinos que ingeriram partes da planta (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). De fato, essa planta se apresenta no Uruguai e no sul do Brasil como um arbusto que atinge cerca de um metro de altura, com folhas largas e flores brancas, de forma invasora das pastagens e terrenos abandonados, podendo afetar o sistema nervoso central de bovinos após o consumo de grande quantidade da planta, causando crises tipo epileptiformes, com perda de equilíbrio, quedas e tremores musculares (PAULOVICH et al., 2002; RIET-CORREA et al, 1983). Além disso, em outros países, as espécies *S. fastigiatum var fastigiatum* (DE BARROS et al., 1987; RIET-CORREA et al, 1983;), *S. bonariensis* (VERDES et al., 2006) e *S. dimidiatum* (MENZIES; BRIDGES; BAILEY, 1979) também causam dano neuronal em bovinos, sugerindo que outras espécies dessa família possam apresentar sérios efeitos tóxicos.

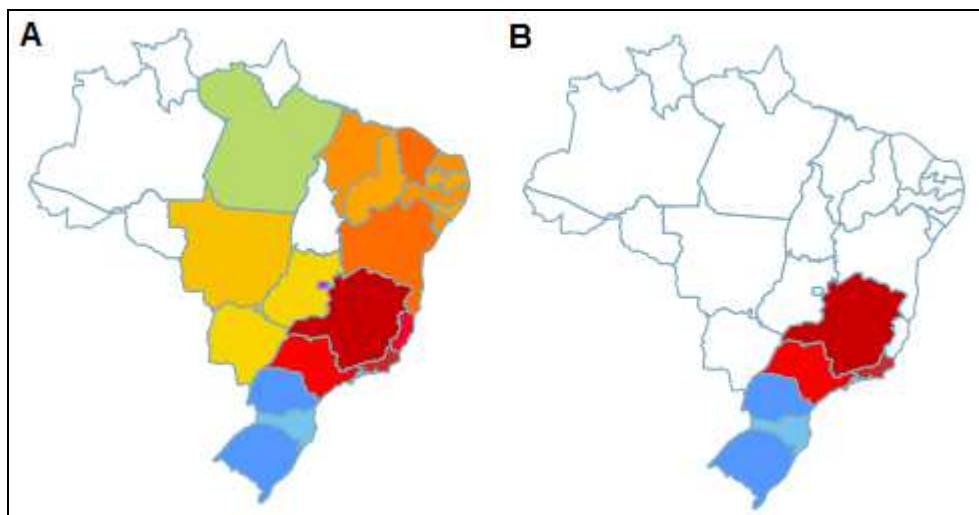


Figura 4 – Distribuição geográfica das espécies *Solanum paniculatum* (A) e *Solanum guaraniticum* (B) no Brasil.

Fonte: adaptado de STEHMANN et al., 2013.

Em outros estudos envolvendo animais, o extrato de *S. fastigiatum* apresentou efeito hepatoprotetor, reduzindo o nível das transaminases e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes em modelo de dano hepático induzido por paracetamol. Também apresentou efeito antioxidante em tecidos hepático e cerebral expostos a agentes oxidantes sob condições *in vitro* (SABIR; ROCHA, 2008). Um estudo de toxicidade aguda conduzido em camundongos demonstrou que *S. fastigiatum* é relativamente não-tóxica quando administrado em camundongos por dois dias consecutivos, já que a DL<sub>50</sub> calculada foi maior do que 4g/kg (valor máximo testado). Entretanto, houve um pequeno aumento das enzimas hepáticas na mais alta dose testada, sugerindo que o uso da planta em humanos deve ser acompanhado de uma delicada e cuidadosamente conduzida curva dose-resposta (SABIR; ROCHA, 2008).

Assim, apesar de evidências de toxicidade hepática e neuronal de algumas espécies da família Solanaceae, essas plantas são comumente vendidas no Brasil por pessoas não informadas e utilizadas muitas vezes em substituição à verdadeira jurubeba, que já tem seus efeitos farmacológicos reconhecidos.

### 1.2.2 Família Myrtaceae: *Syzygium jambos*

A família Myrtaceae é nativa nos trópicos, particularmente na América tropical e Austrália. Compreende 75 gêneros e em torno de 3000 espécies (HUTCHINSON, 1960). Dentre esses, o gênero *Syzygium* Gaertn (sinônimo *Eugenia*) tem sido bastante reportado por seus diferentes usos medicinais. *Syzygium cumini*, *Syzygium aromaticum* e *Syzygium jambos* são as espécies mais estudadas farmacologicamente e têm sido recomendadas para o tratamento de hemorragia, desordens gastrointestinais (CRUZ, 1979; MOREIRA, 1978), diabetes (KELKAR; KAKLIJ, 1996; PRINCE; MENON; PARI, 1998) e inflamação (CHAUDHURI, et al. 1990; KIM et al., 1998; MURUGANANDAN et al., 2001). Também tem sido usadas como sedativos e anticonvulsivantes (DE LIMA et al., 1998), antihipertensivos (BHARGAVA; WESTFALL; SIEHR, 1968), inibidores da liberação de histamina (KIM et al., 1998) e antimicrobiano (DJADJO DJIPA; DELMEE; QUETIN-LECLERCQ, 2000).

No Brasil, tanto *Syzygium cumini* (sin. *Syzygium jambolanum*; *Eugenia jambolana*) e *Syzygium jambos* (sin. *Eugenia jambos* L.) são conhecidos pelo nome comum de Jambolão, podendo ser encontrados em diversos estados incluindo Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul (BRAGANÇA, 1996) (Figura 5). A casca, o fruto, a semente e a folha dessa planta, são freqüentemente utilizadas no tratamento do diabetes mellitus e administrados de diferentes formas (PEPATO et al., 2001). A mais comum é o consumo de uma decocção ou infusão preparada com as folhas em água (2,5g de folhas secas/L aproximadamente, variando de 0,2 a 6 g/L) na quantidade de 1 litro por dia, em substituição à água (TEIXEIRA et al, 1992).



Figura 5. *Syzygium jambos* (A) e *Syzygium cumini* (B).

Fonte: adaptado de FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO, 2011; PLANTS OF HAWAII, 2005.

Embora estudos em indivíduos normoglicêmicos não tenham apontado alterações de glicemia pelos chás preparados com folhas de *S. cumini* e *S. jambos* (TEIXEIRA et al, 1990; 2000), estudos em animais já descreveram efeito hipoglicemiante dos extratos (KEDAR; CHAKRABARTI, 1983; RATSIMAMANGA et al., 1973; RAVI et al., 2004; SHARMA et al., 2006). Ainda há o relato de controle da

glicemia de três pacientes diabéticos, de um total de sete, que usaram semente de *E. Jambolana* por 70 dias (SEPAHA; BOSE, 1956).

Além disso, particularmente as folhas de *S. jambos* também são utilizadas na medicina popular como digestivas e antiinflamatórias, e algumas preparações de extrato já demonstraram efeitos analgésico, antiinflamatório, além de hepato e gastro protetor e hipotensor em diversos modelos experimentais (D'AVILA-PENA, 2007; DONATINI et al. 2009; ISLAM, PARVIN, ISLAM, 2012; ROMERO, 1995; SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1994).

Devido à sua rica composição em compostos fenólicos e flavonóides, a atividade antioxidante do jambolão também é reportada com frequência na literatura, em modelos *in vivo* e *in vitro* (DE BONA et al., 2011; ISLAM, PARVIN, ISLAM, 2012; JAYASINGHE, 2007; PRINCE; MENON; PARI, 1998).

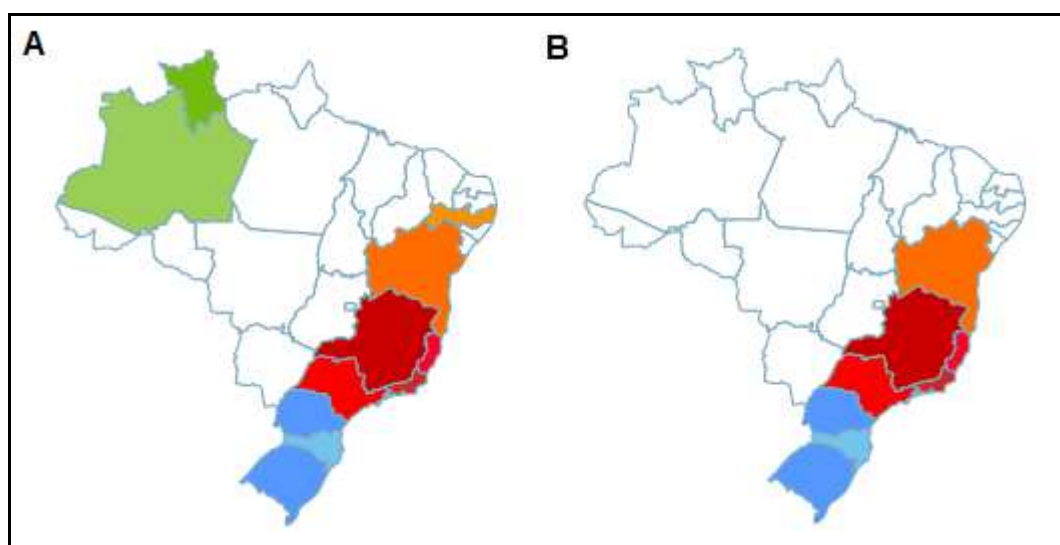


Figura – 6. Distribuição geográfica das espécies *Syzygium cumini* (A) e *Syzygium jambos* (B) no Brasil.

Fonte: adaptado de SOBRAL et al., 2013.

### 1.3 Toxicidade de plantas medicinais

O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseados em conhecimentos populares, aliado à “naturalidade inócua” atribuída às espécies vegetais, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA, 2006). Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Entretanto, diversos estudos têm reportado um grande número de espécies vegetais usadas como alimento, ingredientes ou na medicina tradicional com propriedades mutagênicas, carcinogênicas e tóxicas (DÉCIGA-CAMPOS et al, 2007; FERREIRA; VARGAS, 1999; MOHD-FUAT; KOFI; ALLAN, 2007).

Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Contudo, esse é um problema sério de saúde pública já que efeitos adversos como possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA Jr., PINTO, MACIEL, 2005). Também se deve considerar o aumento do risco de toxicidade humana especialmente quando as plantas são utilizadas em idades extremas, durante a gravidez ou na presença de doenças crônicas que interferem no metabolismo (PINN, 2001). A utilização inadequada de um produto vegetal, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos (AMORIM et al., 2007; COELHO, 1998; CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005;).

Toda planta medicinal deve ser considerada um agente xenobiótico, ou seja, um composto estranho ao organismo humano, que apresenta produtos de biotransformação potencialmente tóxicos. Assim, seu consumo não possui somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com sua ingestão, mas também efeitos que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, podendo levar a um quadro clínico severo, algumas vezes fatal (LAPA et al., 2004).

Além disso, os medicamentos tradicionais estão cada vez mais sendo usados fora dos limites das culturas tradicionais e muito além das áreas geográficas

tradicionais, sem o conhecimento adequado da sua utilização e os princípios subjacentes. Isso faz com que esses “remédios naturais” sejam usados em diferentes doses, extraídos de maneiras diferentes e utilizados para indicações não tradicionais. Ainda, o uso concomitante com outros medicamentos alopáticos, que hoje é bastante freqüente, é completamente fora do contexto tradicional e tornou-se uma preocupação de segurança especial (WHO, 2004). O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto, ou seja, para cada parte a ser usada, grupo de princípio ativo a ser extraído ou doença a ser tratada, existe formas de preparo e uso mais adequados (ARNOUS, SANTOS, BEINNER, 2005), entretanto, muito freqüentemente os produtos derivados de plantas são usados de maneira não padronizada (GURIB-FAKIM, 2006).

No Brasil, no ano de 2010, 1.377 casos de intoxicação humana por plantas foram registrados pelo Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), sendo que a Região Sul foi responsável por 24% destes casos. Nessa região, a maioria das intoxicações ocorre na zona urbana e de forma de acidental. Também, é de extrema importância a observação de que 50% dos casos ocorrem com crianças de 1 a 4 anos e que, considerando crianças de 1 a 9 anos, esse número aumenta para 65% (SINITOX, 2013).

De modo geral, os efeitos colaterais são poucos na utilização dos fitoterápicos, desde que utilizados na dosagem correta. A maioria dos efeitos colaterais conhecidos, registrados para plantas medicinais, estão relacionados a diversos problemas de processamento, tais como identificação incorreta das plantas, necessidade de padronização, prática deficiente de processamento, contaminação, substituição e adulteração de plantas, preparação e/ou dosagem incorretas (CALIXTO, 2000; WHO, 2004). Por exemplo, tem sido reportado danos hepáticos agudos como hepatites, com plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos, principalmente envolvendo plantas como a cavalinha (*Teucrium chamaedrys L.*), confrei (*Symphytum officinale L.*), valeriana (*Valeriana officinalis L.*), escuteária chinesa (*Scutellaria serbaicalensis Georgi*) ou aloe vera (*Aloe barbadensis Mill.*) (CAPASSO et al., 2000; LANGMEAD; RAMPTON, 2001), demonstrando a importância de estudos que investiguem as possíveis propriedades tóxicas das espécies vegetais tradicionalmente consumidas.



## 1.4 Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é um termo que denota um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e os respectivos sistemas de defesa de um organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os agentes oxidantes englobam Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) e vários outros que podem ser gerados a partir de processos como, por exemplo, radiação ionizante, reações químicas ou enzimáticas (ABUJA; ALBERTINI, 2001). As espécies radicalares, conhecidas como Radicais Livres são moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (SLATER, 1984) que, juntamente com as espécies não-radicalares, são altamente reativas a outras biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (POLI et al., 2004). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) e alcoxila ( $RO^{\bullet}$ ); e as não-radicalares: oxigênio singlete ( $IO_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (SIES, 1997).

De acordo com a definição clássica, antioxidantes são moléculas que, quando presente em baixas concentrações comparadas a de um substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O corpo humano possui um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e glutathione peroxidase (GPx, E.C. 1.11.1.9), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs.

A SOD é uma metaloenzima, abundante nas células aeróbias e uma das defesas antioxidantes mais efetivas (VALKO et al., 2006). Cabe à SOD catalisar a reação de dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ) (McCORD; FRIDOVICH, 1969). O  $H_2O_2$  é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como CAT ou GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). A CAT é uma heme proteína que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a água ( $H_2O$ ). Está presente em maiores quantidades no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e no interior nos peroxissomas (VASCONCELOS et al, 2007).

Já a GPx age catalisando a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da oxidação da glutaciona (VALKO et al., 2006) (Figura 7).

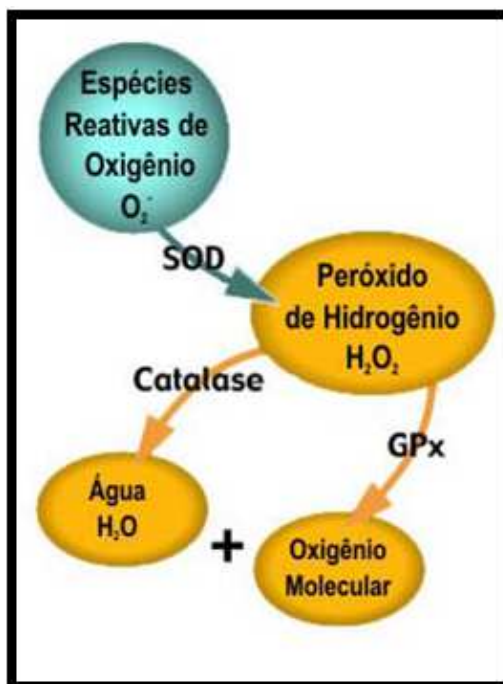


Figura 7 – Mecanismos de ação antioxidante enzimático.

Fonte: NORDBERG; ARNER, 2001.

Os antioxidantes não-enzimáticos podem ser divididos em compostos produzidos *in vivo*, como a glutaciona (GSH), a ubiquinona e o ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta, como as vitaminas E, C,  $\beta$ -caroteno, flavonóides, dentre outros (VASCONCELOS et al., 2007). A GSH está presente na maioria das células, podendo estar livre ou ligada a proteínas, sendo o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH reativo de sua cisteína, o qual também pode ser encontrado em proteínas (tióis proteicos - PSH) ou em tióis de baixo peso molecular (tióis não proteicos - NPSH), como a cisteína (REISCHL et al., 2007). O papel protetor da GSH contra a geração do estresse oxidativo se deve à direta detoxificação de EROs, a

participação como cofator para outras enzimas antioxidantes como a GPx, bem como a redução de outros antioxidantes à sua forma ativa (ARTEEL; SIES, 2001).

Em condições normais, há um equilíbrio entre as reações que envolvem os oxidantes e os antioxidantes, sendo mantidas as condições de vida. Entretanto, vários processos patológicos como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes melito, hipertensão arterial, obesidade, assim como o processo de envelhecimento e intoxicação por xenobióticos rompem esse balanço entre a formação e neutralização de pró-oxidantes ao aumentar a proporção de espécies reativas em relação às defesas antioxidantes disponíveis (DALLE-DONNE et al., 2006; GIULIANO; CERIELLO; PAOLISSO, 1996; PICONI; QUAGLIARO; CERIELLO, 2003).

Nesse sentido, há uma variedade de biomarcadores que podem ser usados para indicar danos causados pelo estresse oxidativo às macromoléculas, como por exemplo, medidas da oxidação de lipídeos (lipoperoxidação) e de proteínas (carbonilação de proteínas) (HWAN; KIMB, 2007). O processo de lipoperoxidação, resultado do ataque de espécies reativas aos lipídios das membranas, forma diversos produtos secundários. Esses produtos são principalmente aldeídos, com a habilidade de aumentar o dano oxidativo (UCHIDA, 2000) e, entre eles, o principal e mais estudado é o malondialdeído (MDA) cuja concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES; GUÉRIN, 1992).

## **1.5 Plantas medicinais e estresse oxidativo**

Estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em frutas e verduras estão associadas a uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas (GAZIANO et al., 1995; GAZIANO, 1996; HARTMAN et al., 2006; JOHN et al., 2002; ZIBADI et al., 2007). Um dos principais aspectos relacionados ao efeito protetor desses alimentos é o fato de alguns produtos naturais com atividade antioxidante poderem ser úteis no auxílio do sistema protetor endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos (KANTER, 1998). Dentre eles, os antioxidantes presentes em extratos de espécies vegetais, vêm atraindo cada vez mais a atenção dos

consumidores e pesquisadores (DECKER, 1997). Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Esses antioxidantes inativam radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (PODSEDEK, 2007).

Além da ingestão de frutas e vegetais, recomendados como fontes de compostos antioxidantes, acredita-se que a suplementação da dieta com ervas, contendo altas concentrações de compostos capazes de neutralizar radicais livres, tenha também efeitos benéficos (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005). Embora as plantas medicinais sejam raramente utilizadas como antioxidantes na medicina tradicional, suas características terapêuticas poderiam ser sustentadas devido, em parte, à sua capacidade varredora de radicais livres que podem estar envolvidos em muitas doenças (SPENCER et al., 1988). Os extratos de ervas aromáticas, uvas e citros estão entre as principais fontes de antioxidantes naturais estudadas e, apesar da grande quantidade de trabalhos desenvolvidos, muito do potencial existente permanece inexplorado (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Os fitoquímicos são classificados como compostos bioativos provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas (RAMARATHNAM et al., 1995). Englobam carotenóides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno); compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estibenos, cumarinas e taninos; alcalóides; compostos azotados (derivados da clorofila, aminoácidos e aminas) e compostos organossulfurados: (isotiocianatos, indoles, compostos de enxofre alílicos) (HALL; CUPPETT, 1997). Dentre esses, os mais estudados são os compostos fenólicos e os carotenóides (Figura 8).

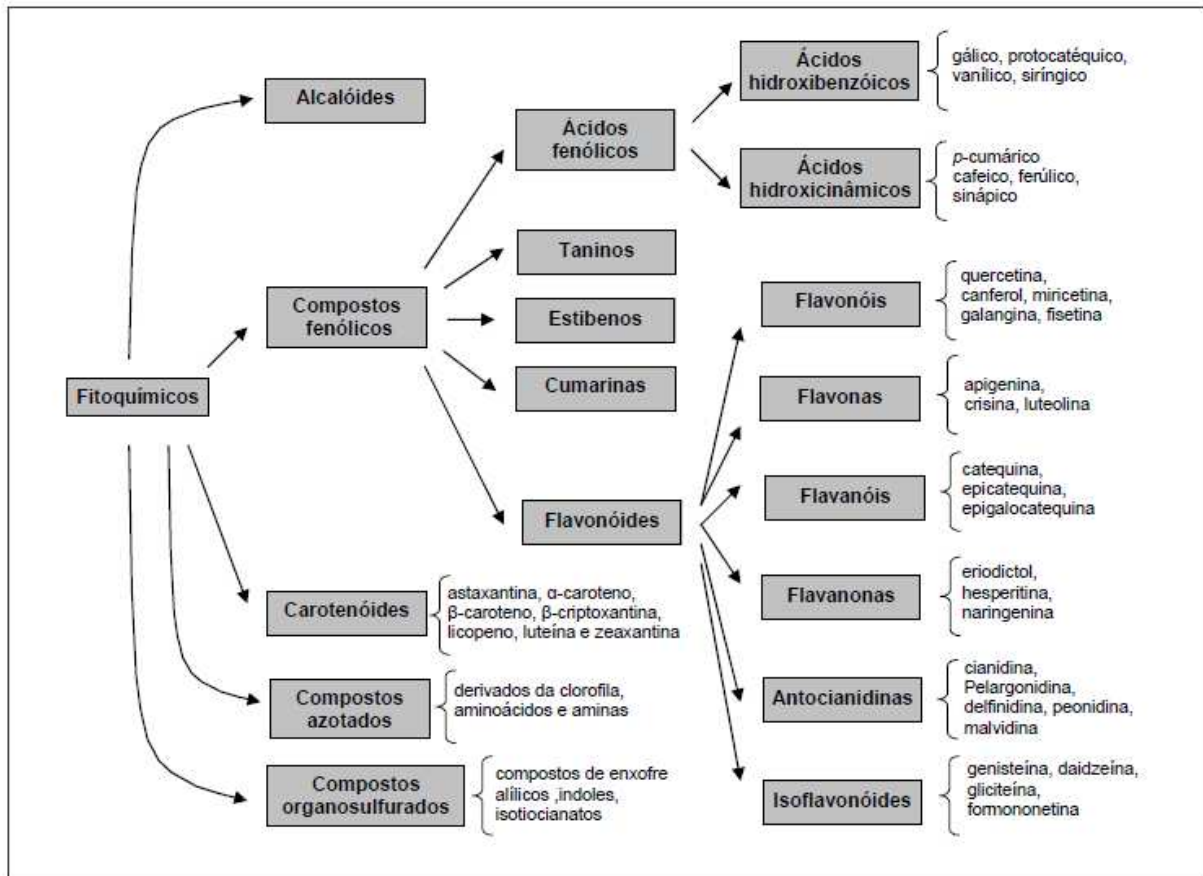


Figura 8 - Principais classes de fitoquímicos naturais.

Fonte: FERREIRA; ABREU, 2007

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais ativos e mais freqüentemente encontrados nos vegetais. Apresentam em sua estrutura vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999), sendo que os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes e as duplas ligações dos anéis benzênicos garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante. Por apresentarem ressonância após atuarem no combate aos radicais livres, os compostos fenólicos possuem uma determinada estabilidade, que os permite reter o elétron desemparelhado sem causar danos às estruturas celulares (SOARES, 2002).

Essa classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos). (HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Os

flavonóides apresentam-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e especialmente chá, que contém, sobretudo, catequinas em sua composição (GRAHAM, 1992; VAN ACQUIRE, 1996). A ação antioxidante dos flavonóides baseia-se na inativação dos radicais livres, nos compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico, devido a sua capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelas espécies reativas. Os flavonóides mais investigados são: a quercetina, a miricetina, a rutina e a naringenina. (ARORA; MURALEEDHARAN; STRASBURG, 1998; HARTMAN, SHANKEL, 1990) (Figura 8).

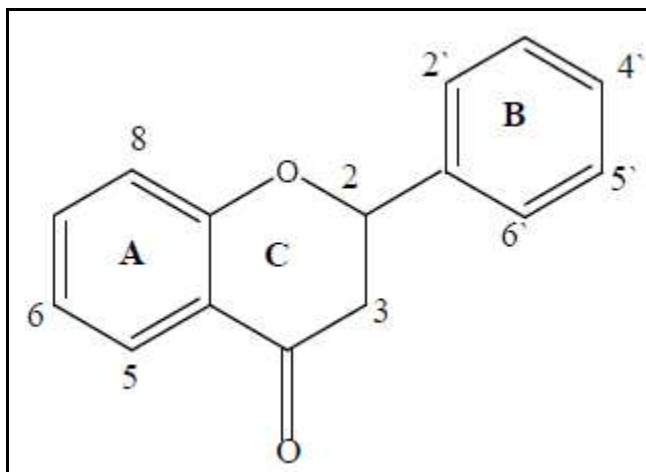


Figura 9 - Estrutura básica dos flavonóides.

Fonte: DORNAS et al., 2007.

Estudos demonstram que os flavonóides são responsáveis pela inibição de oxidação do ácido linolêico, oxidação de LDL, peroxidação de fosfolipídeos da membrana, peroxidação lipídica microssomal e mitocondrial, peroxidação de eritrócitos e fotoxidação e peroxidação de cloroplastos (ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2003). Mais especificamente, a (-)-epicatequina e a rutina apresentaram atividade antioxidante sobre o íon  $\text{OH}\cdot$  superior ao antioxidante manitol, um conhecido seqüestrador de radicais hidroxila (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994). Já

miricetina, quercetina e rutina foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo  $H_2O_2$  no DNA de linfócitos humanos (NOOROZI; ANGERSON; LEAN; 1998). Entretanto, a quercetina, flavonóide mais abundante encontrado no vinho tinto, pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (GASPAR et al., 1993), demonstrando que, apesar de poderem inibir os processos de oxidação em certos sistemas, não significa que os compostos fenólicos possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos, pois podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Dentre os compostos não-flavonóides temos os derivados dos ácidos hidroxicinâmico (ésteres dos ácidos caféico, cumárico e felúrico) que estão presentes em alimentos como maçã, pêra, cereja e damasco, e hidroxibenzóico (ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico) que são encontrados em morango, uva, laranja, limão e tangerina (BELITZ; GROSCH, 2004). Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas presente na estrutura (HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970).

Apesar de diversos estudos já terem evidenciado que antioxidantes exógenos, obtidos dos alimentos e vegetais, são essenciais para a resistência ao estresse oxidativo (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007), essa constatação, no entanto, não garante a sua inocuidade e requer estudos toxicológicos sobre estes compostos fitoquímicos (MELO; GUERRA, 2002). A aplicação farmacológica desses agentes pode interferir em mecanismos celulares, incluindo as alterações de atividade enzimática e estrutura de membranas. Assim, o uso de antioxidantes na prevenção e modulação das conseqüências patológicas dos radicais livres precisa de definição de doses e de protocolos de tratamento, sendo necessários mais estudos sobre o mecanismo de ação desses agentes antes da sua prescrição em larga escala (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

## 1.6 Eritrócitos

Nos mamíferos, os eritrócitos (RBCs) não possuem núcleo, mitocôndria, lisossomos e complexo de Golgi. Contudo, sua simplicidade estrutural e funcional os

torna um modelo *in vitro* conveniente para estudar as interações oxidantes/antioxidantes (SADOWSKA-WODA et al., 2010). Devido ao fato de serem células carregadoras de oxigênio, estão constantemente expostas a danos oxidativos. Isso porque, o oxigênio carregado pela hemoglobina atua como oxidante, produzindo derivados reativos como o radical livre superóxido e o peróxido de hidrogênio, o qual pela reação com o ferro forma o radical hidroxila que é altamente reativo (CALDIN et al., 2005).

Ainda, sua membrana é rica em ácidos graxos poliinsaturados, que são extremamente suscetíveis a peroxidação mediada por radicais livres além de ser considerada uma boa representante das membranas plasmáticas em geral (SHIVA SHANKAR REDDY et al., 2007). Os resultados da peroxidação lipídica podem ser, por exemplo, danos estruturais na membrana e a geração de produtos oxidados, sendo que alguns destes produtos são quimicamente reativos e têm a capacidade de modificar macromoléculas (MONTINE et al., 2004). A maioria das metodologias utilizadas para avaliar a magnitude de peroxidação lipídica mede a formação de produtos gerados desse processo e um dos métodos mais utilizados é a verificação da formação do malondialdeído (MDA) através da sua reação colorimétrica com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (AUGUSTO, 2006). Outro método bastante utilizado, o teste da hemólise oxidativa, monitora espectrofotometricamente a quantidade de hemoglobina liberada no solvente quando as células vermelhas se rompem devido ao comprometimento estrutural de sua membrana causado pela ação das EROs (TEDESCO et al., 2000).

Portanto, a ação dos radicais livres nos eritrócitos pode levar a uma série de alterações, como formação de lipoperóxidos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUN; TERAQ, 2002; SATO et al., 1995). Para conter esse processo, o eritrócito apresenta vários sistemas enzimáticos que mantêm o estado normal da célula como, por exemplo, a meta-Hb redutase, SOD Cu-Zn dependente, a catalase, GSH-Px e a glutathione redutase que apresentam cooperação sinérgica para manter os níveis de espécies reativas de oxigênio dentro dos níveis fisiológicos (HARRIS, 1991, MAGALHÃES, 2009).

Além disso, os eritrócitos humanos são células abundantes e podem ser obtidos durante procedimentos pouco invasivos, sustentando o seu uso em modelos de estudo *in vitro*.



## 1.7 Linfócitos

Os linfócitos são as células imunocompetentes que auxiliam os fagócitos na defesa do organismo contra a infecção e outras invasões. Estas células são de vital importância nas funções do sistema imunológico como a capacidade de gerar especificidade antigênica e o fenômeno da memória imunológica. Morfologicamente, são células simples e completamente desprovidas de granulações citoplasmáticas, recebendo também o nome de agranulócitos. Originam-se de células indiferenciadas da medula óssea, passando por poucas fases intermediárias até a célula madura. As células maduras são encontradas no sangue circulante em porcentagem que varia em condições fisiológicas (idade, sexo) ou patológicas (estímulo antigênico, proliferações benignas e malignas). Além disso, são encontradas também nos órgãos linfoides primários (medula óssea e timo) e secundários (linfonodos e baço). De modo geral, correspondem a cerca de 30% das células circulantes no sangue sendo que em esfregaços de baço atingem cifras superiores a 90% (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2004; VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 1996).

Os linfócitos provenientes do baço de animais de laboratório são células bastante utilizadas em testes de citotoxicidade com a vantagem de serem facilmente obtidas e em grandes quantidades. Nesse sentido, alguns testes *in vitro* podem ser realizados a fim de se determinar a viabilidade celular após a exposição dessas células a substâncias tóxicas, com propósito de avaliações preliminares. Dentre os ensaios de viabilidade mais utilizados estão o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), vermelho neutro e azul tripan, que empregam o uso de corantes vitais, e a avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).

O MTT é um sal tetrazólico solúvel em água que é convertido a cristais de formazan insolúveis de cor roxa através da clivagem do anel tetrazólico pela enzima succinato desidrogenase no interior da mitocôndria. Assim, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSSMANN, 1983). Além disso, considerando que o MTT somente pode ser clivado pelas enzimas ativas presentes nas mitocôndrias das células viáveis, esse teste também pode ser usado para monitorar a ativação e/ou proliferação celular (GERLIER; THOMASSET, 1986).

O teste de azul trypan é baseado na habilidade de as células vivas expulsarem esse corante vital, sendo que a sua absorção pelas células é indicativo de dano irreversível na membrana que precede a morte celular. Assim, as células que apresentam danos nas membranas apresentam-se na cor roxa, enquanto que células saudáveis apresentam-se translúcidas. Além de detectar efeitos citotóxicos, esse teste é geralmente utilizado para quantificar a redução na porcentagem de células viáveis (CHAROENPORNSOOK; FITZPATRICK; SMITH, 1998; MINERVINI; FORNELLI; FLYNN, 2004).

Já o teste do vermelho neutro baseia-se no fato de que as células vivas apreendem o corante vital vermelho neutro, que fica incorporado no interior dos lisossomas, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Assim, é possível distinguir entre as células vivas e danificadas ou mortas pela medida de intensidade de cor da suspensão celular, já que danos nas membranas resultam em decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro (CIAPETTI et al., 1996). Desse modo, o teste do vermelho neutro é uma ferramenta útil para detectar dano lisossomal quando usado em conjunto com outros testes que permitam distinguir danos na membrana plasmática e dano em organelas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O ensaio de avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) é baseado na medida da atividade da LDH no meio extracelular. A perda da LDH intracelular e sua liberação para o meio externo é um indicador de morte irreversível devido a dano na membrana celular. Confiabilidade, rapidez e simplicidade são características desse ensaio (DECKER; LOHMANN-MATTHES, 1988; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

De modo geral, os ensaios de toxicidade são utilizados para prever toxicidade humana e para avaliação preliminar geral de uma série de substâncias químicas (CLEMEDSON; EKWALL, 1999; SCHEERS; EKWALL; DIERICKX, 2001). Diferentes ensaios podem fornecer resultados distintos dependendo do agente testado e do teste utilizado (WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005). Portanto, recomenda-se o uso de um conjunto de testes com diferentes finalidades a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos e evitar a subestimação ou superestimação do nível de toxicidade (KADAN, 2013).

### 1.8 Teste de letalidade da *Artemia salina*

A *Artemia salina* L. (Artemiidae) é a larva do camarão de água salgada (brine shrimp), um invertebrado da fauna dos ecossistemas aquáticos, e possui de 8 a 10 mm de comprimento. Esse crustáceo reproduz-se com facilidade e rapidez, sendo que seus ovos, quando secos, podem ser conservados durante anos estando sempre aptos a eclodirem, desde que sejam colocados em água salgada. Além da sua importância na aquicultura, a *A. salina* tem sido utilizada como teste alternativo para determinar a toxicidade de produtos químicos e naturais (MCLAUGHIN, 1991; BARAHONA; SÁNCHEZ-FÓRTUN, 1996; LOGARTO et al., 2001). O ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, segundo Meyer et al. (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, que não requer equipamentos especiais e que utiliza quantidades de amostras relativamente pequenas (MEYER et al., 1982). Nesse teste, o nível de toxicidade é dado através da estimativa da concentração letal média (valor de  $CL_{50}$ ), ou seja, a concentração da substância teste capaz de causar morte da metade das larvas *A. salina* envolvidas no ensaio (LEWAN; ANDERSSON; MORALES-GOMEZ, 1992). E é considerada bioativa a substância que apresentar valores de  $CL_{50}$  menores que 1000  $\mu\text{g/mL}$ , podendo então ser considerada potencialmente tóxica para o consumo humano (MEYER et al., 1982).

Esse ensaio biológico tem sido utilizado como método de avaliação toxicológica preliminar de diversas toxinas, metais, compostos sintéticos e produtos de origem vegetal. Considerando-se a atual tendência de substituição dos testes toxicológicos em animais de laboratório, o teste de letalidade da *A. salina* pode ser uma boa alternativa na avaliação da toxicidade de plantas medicinais. De fato, estudos já demonstraram que há uma boa correlação entre a  $CL_{50}$  obtida no teste da *A. salina* e a  $DL_{50}$  obtida no teste de toxicidade oral aguda em camundongos. Baseados nessa correlação, um valor de  $CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  representa um valor de  $DL_{50}$  entre 100 e 1000 mg/kg,  $CL_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$  representa um valor de  $DL_{50}$  entre 1000 e 2500 mg/kg e  $CL_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$  representa um valor de  $DL_{50}$  entre 2500 e 8000 mg/kg (LOGARTO et al., 2001). De fato esse teste tem sido aplicado na avaliação da toxicidade de diversas preparações vegetais (ASHAFA, 2013; NGUTA; MBARIA, 2013; RAHMAN et al., 2013).

Por outro lado, o teste da *A. salina* também tem sido relacionado à inibição do crescimento de linhagens celulares de tumores sólidos, sugerindo que esse ensaio também possa ser útil na pesquisa de drogas com atividade antitumoral (ANDERSON et al., 1991; NAZIR et al., 2013; RAJEH et al., 2012).

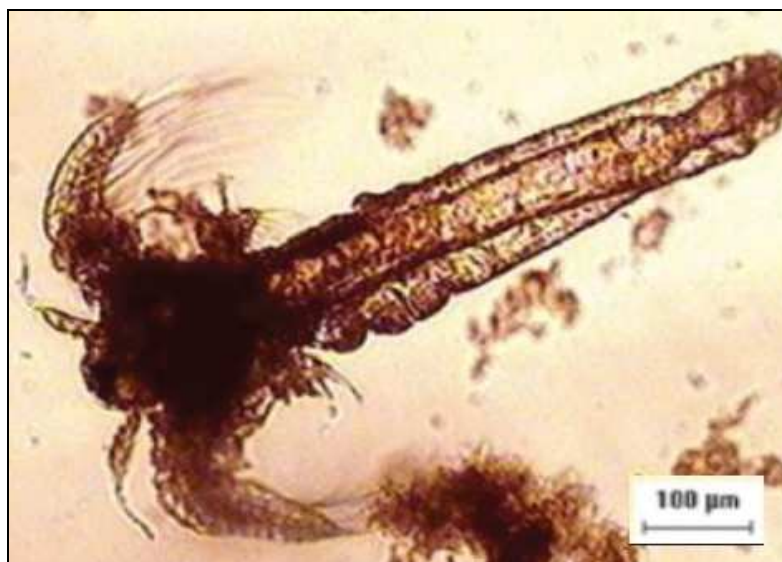


Figura 10 – Larva de *Artemia salina*.

Fonte: Adaptado de RAJEH et al., 2012.

### 1.9 Teste oral de toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta (BLAAUBOER, 2003; PRIETO et al., 2006).

Conceitualmente, o termo toxicidade oral aguda refere-se aos efeitos adversos ocorridos após a administração oral de uma única dose de uma substância, ou de múltiplas doses dentro de um período de 24 horas, sendo que o cálculo da

dose que causa a morte de 50% dos animais envolvidos (dose letal média - DL<sub>50</sub>) é um dos objetivos do teste. Dessa forma, conforme o valor de DL<sub>50</sub> obtida, as substâncias são classificadas em 5 categorias de nível crescente de toxicidade (Tabela 1). Segundo essa classificação substâncias pertencentes à categoria 1 são as mais tóxicas, enquanto que substâncias pertencentes à categoria 5 são consideradas relativamente de baixa toxicidade aguda (UNITED NATIONS, 2011).

Tabela 1: Categorias de avaliação de risco de toxicidade aguda

<b>Categoria</b>	<b>Dose letal média (DL<sub>50</sub>)</b>
1	5 mg/kg peso corporal
2	50 mg/kg peso corporal
3	300 mg/kg peso corporal
4	2000 mg/kg peso corporal
5	5000 mg/kg peso corporal

Fonte: adaptado de UNITED NATIONS, 2011.

Esse teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana Food and Drugs Administration (FDA), responsável pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (STAMMATI et al., 2005).

Nesse sentido, os estudos de avaliação da toxicidade aguda de substâncias químicas, compostos químicos e naturais e até plantas medicinais seguem algumas diretrizes padronizadas. Dentre essas, as mais utilizadas são as propostas pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) (VALADARES, 2006).

Com relação à legislação brasileira, através de um Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica alguns métodos padronizados para estudos de toxicidade pré-clínica para fins de registro de produtos fitoterápicos. Segundo esse documento, os estudos de toxicidade aguda avaliam a toxicidade dos produtos fitoterápicos ou

derivados vegetais após a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24h. Devem ser empregados para o estudo animais mamíferos, sem características genéticas especiais, de ambos os sexos, em idade adulta e em grupos de, no mínimo, seis animais. A via de administração utilizada deve ser a mesma via proposta para o uso do produto e as doses empregadas devem ser as suficientes para observação dos possíveis efeitos tóxicos e estimativa da dose letal média ( $DL_{50}$ ). Também, deve ser observado o maior número possível de parâmetros, tais como alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos, assim como hemograma completo e análises bioquímicas de sangue. A avaliação desses parâmetros deve ser realizada, durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e, após, diariamente durante 14 dias após administração, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, visando observar reversão ou não destes sinais. Ainda, desde a 24<sup>a</sup> hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser observados a variação de peso e o consumo de alimentos dos grupos de animais envolvidos no estudo (ANVISA, 2004).

## **1.10 Marcadores enzimáticos**

### **1.10.1 Acetilcolinesterase**

O sistema colinérgico é um dos mais importantes caminhos de modulação do sistema nervoso central (SNC) desempenhando um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM et al., 2002). Os principais componentes do sistema colinérgico são: a acetilcolina (ACh), colina-acetiltransferase, o transportador de colina, o transportador de acetilcolina vesicular, os receptores muscarínicos e nicotínicos e a acetilcolinesterase (AChE) (SARTER;

PARIKH, 2005). Além disso, estudos tem demonstrado que os linfócitos possuem a maioria dos componentes necessários para a constituição de um sistema colinérgico não neuronal independente que está envolvido na regulação da função imune (KAWASHIMA; FUJII, 2003).

A ACh é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico. Seus efeitos no SNC são principalmente excitatórios, efetivados pela ativação de receptores específicos (RANG et al., 2004). Após exercer sua ação, a ACh sofre hidrólise pelas colinesterases com a liberação de ácido acético e colina; esta é, em parte recaptada para o terminal pré-sináptico (SOREQ, SEIDMAN, 2001). Já nos linfócitos, onde essa molécula sinalizadora também é sintetizada e liberada, sua função é imunomodulatória, com ação nos receptores nicotínicos e muscarínicos (KAWASHIMA; FUJII, 2003).

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxicação de xenobióticos (DELFINO, RIBEIRO, FIGUEROA-VILLAR, 2009). Estas enzimas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ et al., 1993). A acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), chamada também de colinesterase verdadeira ou específica, hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a acetilcolina) e é predominante no cérebro, junção neuromuscular, linfócitos e eritrócitos (COKUGRAS, 2003). Já a butirilcolinesterase, ou pseudocolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8), hidrolisa, preferencialmente, outros tipos de ésteres como a butirilcolina (TAYLOR, BROWN, 1999) e é amplamente distribuída nos rins, intestinos, pulmão, fígado e plasma, mas tem distribuição neuronal muito restrita se comparada a AChE (MESULAM et al., 2002).

Além de ser aceita como o indicar bioquímico mais importante da sinalização colinérgica do sistema nervoso central (SILMAN; SUSSMAN, 2005), AChE também apresenta funções em tecidos não-neuronais, incluindo a regulação da função imune (KAWASHIMA; FUJII, 2003). Nos tecidos linfóides, essa enzima regula a quantidade de ACh na vizinhança das células de acordo com as demandas imunológicas, contribuindo de forma importante para o controle dos processos inflamatórios (NIETO-CERÓN et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrado que inibidores da

AChE reduzem a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas e podem atenuar a inflamação por aumentar a concentração de ACh no espaço extracelular (NIZRI; HAMRA-AMITAY, 2006).

Diversos estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de determinar o efeito de algumas plantas medicinais na atividade das colinesterases, principalmente a AChE. De fato, várias espécies têm demonstrado a capacidade de inibição da atividade da AChE (TREVISAN et al., 2003). Essa possibilidade de elevação do nível de ACh pode ser útil no desenvolvimento de fármacos para a melhora das funções cognitivas como memória e aprendizagem e na sintomatologia de doenças como o Alzheimer (BIERER et al., 1995).

#### 1.10.2 N-Acetyl-b-d-glucosaminidase

A N-Acetyl-b-d-glucosaminidase (NAG; EC 3.2.1.30) é uma enzima lisossomal hidrolítica com peso molecular entre 140–160 kDa (MAZAHERI, 2011). Encontrada em diversos tecidos animais (KITCHEN, MASTERS, 1985), predomina nas células tubulares proximais do sistema renal, onde tem por função a degradação de glicoproteínas (OLBRICHT, 1992). Essas proteínas são degradadas, em aminoácidos, que são levados, via membrana basolateral, para a circulação sangüínea. Portanto, baixos níveis da NAG são normalmente encontrados na urina como resultado das atividades de exocitose e pinocitose das células epiteliais tubulares (PRINCE, 1992).

Devido ao seu peso molecular que não permite a sua filtração glomerular fisiológica, um aumento na excreção urinária de NAG denota lesão renal, sugerindo dano celular nos túbulos proximais (BOSOMWORTH, APARICIO; HAY; 1999; JUNG et al., 1988; SALEM et al., 2002). Essa enzima demonstra alta atividade nas células tubulares renais e é liberada para o fluído tubular quando o ultrafiltrado passa através dos túbulos proximais. Entretanto, quando há alguma lesão lisossomal das células dos túbulos proximais, por alguma doença ou agente nefrotóxico, a NAG é liberada em maior quantidade e sua excreção urinária aumenta (DALTON, 1999).

Assim, a excreção urinária da NAG tem sido recomendada como marcador útil para detecção de alterações na funcionalidade dos túbulos proximais muito antes



da elevação de outros marcadores como proteinúria e aumento na creatinina sérica (JUNG et al., 1988). A determinação da sua atividade enzimática ajuda a identificar o local e o nível de dano renal que, juntamente com os sintomas clínicos, facilita o diagnóstico correto de processos inflamatórios e explica o mecanismo de ação patogênico de substâncias tóxicas (MARCHEWKA et al., 1994).

### 1.10.3 $\delta$ Aminolevulinato desidratase

$\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) (E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase (PBG-sintase) ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 e é uma metaloenzima citoplasmática participante da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, como o heme e a clorofila (DRESEL; FALK, 1953; JAFFE et al., 1995). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferriprotoporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e dos sistemas de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (JAFFE et al., 1995). Portanto, a  $\delta$ -ALA-D é uma enzima essencial para os seres vivos, já que está envolvida nos processos de metabolismo aeróbico e fixação de CO<sub>2</sub> (JAFFE, 2000; SHOOLINGIN-JORDAN, 1998; WARREN et al., 1998). Conseqüentemente, agentes tóxicos ou metabólitos que rompem ou interferem essa síntese de compostos tetrapirrólicos possuem profundos efeitos no metabolismo celular (HEINEMANN; JAHN; JAHN, 2008).

A enzima  $\delta$ -ALA-D tem sido purificada de diversas fontes, incluindo fígado bovino, eritrócitos humanos, plantas, bactérias e leveduras (ANDERSON; DESNICK, 1979; GIBSON, NEUREBERGER, SCOTT, 1955; LIEDGENS, LUTZ, SCHNEIDER 1983; NANDI; SHEMIN, 1968; NANDI, SHEMIN 1973). Apesar de as propriedades catalíticas fundamentais serem similares, algumas diferenças na estrutura primária, necessidade de íon metálico e sensibilidade dos tióis têm sido observadas entre as várias enzimas purificadas (KONUK et al. 2010).

A  $\delta$ -ALA-D de mamíferos é dependente de zinco (Zn<sup>2+</sup>) para a máxima atividade catalítica, possui um pH ótimo entre 6,3 e 7,1 (CHEN; NEILANDS 1976;

SHEMIN, 1972) e apresenta maior atividade nos tecidos hepático, renal e os tecidos hematopoiéticos (GIBSON, NEUREBERGER, SCOTT, 1955). Sua estrutura química é homo-octamérica e seu sítio catalítico é composto por dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina, resíduos de aminoácido hidrofóbicos além de resíduos de cisteína (grupamentos tióis), que são altamente reativos e devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (CHEN; NEILANDS, 1976; TSUKAMOTO, YOSHINAGA, SANOS, 1979). A proximidade entre os grupamentos tióis faz a enzima particularmente sensível à oxidação (FARINA et al., 2002; MARKHAM et al., 1993; SARAIVA et al., 2012), e esses grupos estão envolvidos em coordenação com o íon essencial  $Zn^{2+}$  (DENT; BEYERSMANN; HASNAIN, 1990; ERSKINE et al., 2000). Isso porque, a oxidação dos grupos tióis é acompanhada pela perda estequiométrica dos íons metálicos ligantes e por uma diminuição da atividade catalítica da  $\delta$ -ALA-D (TSUKAMOTO; YOSHINAGA; SANOS, 1979), demonstrando que os resíduos de cisteína são necessários para a ligação com  $Zn^{2+}$ . Assim como a remoção do íon zinco por agentes quelantes pode acelerar a autooxidação da enzima, demonstrando que o íon metálico também está envolvido na estabilização dos grupos tióis (BEBER et al., 1998; EMANUELLI et al., 1998).

Dessa forma, a  $\delta$ -ALA-D é inibida por agentes que oxidam grupos tióis, metais com alta afinidade por grupos tióis ou que competem com zinco pelo seu sítio de ligação (FARINA et al. 2002, NOGUEIRA et al. 2003a-b, SANTOS et al. 2004) além de estar ligada a situações associadas ao estresse oxidativo (FOLMER, SOARES, ROCHA, 2002; PANDE et al. 2001, PANDE; FLORA 2002, TANDON et al. 2002). De fato, a diminuição da atividade enzima tem sido considerada um biomarcador em potencial para a avaliação de condições patofisiológicas, especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo.

A  $\delta$ -ALA-D sanguínea mostrou-se inibida em pacientes hemodialisados (VALENTINI et al., 2008), após transplante de medula óssea (GONÇALVES et al., 2009) em pacientes com câncer cervical (GONÇALVES et al., 2005) e pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 (FERNANDEZ-CUARTERO et al., 1999; BONFANTI et al., 2011). Também, modelos animais de patologias humanas como hipotireoidismo (GRAVINA et al., 2007), hiperglicemia (FOLMER; SOARES; ROCHA, 2002), intoxicação com paracetamol (OLALEYE; ROCHA, 2008) dentre outros, já foram relacionados com a inibição da atividade da enzima.

Clinicamente, a atividade da  $\delta$ -ALA-D é usada como um dos mais confiáveis indicadores de intoxicação por chumbo ( $Pb^{2+}$ ) em humanos e outros animais. A exposição ao chumbo causa uma importante inibição da  $\delta$ -ALA-D sanguínea (MEREDITH; MOORE; GOLDBERG, 1979; PAPPAS et al., 1995; PIRES; MIEKELEY; DONANGELO, 2002), e está associada com intensa anemia e acompanhada por aumento na excreção do seu substrato, o ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) (OSKARSSON, 1989). Entretanto, a modulação da  $\delta$ -ALA-D por outros metais, como mercúrio ( $Hg^{2+}$ ), cobre ( $Cu^{2+}$ ) ou prata ( $Ag^{2+}$ ), demonstra que esse indicador pode ser inespecífico em intoxicações simultâneas com outros metais (THOMPSON; JONES; BEASLEY, 1977).

Na rota biosintética do grupamento heme, a  $\delta$ -ALA-D catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de  $\delta$ -ALA formando o porfobilinogênio monopirrólico (PBG) (Figura 9). A inibição da enzima pode prejudicar a rota biosintética do heme, diminuindo sua produção e causando consequências patológicas (SASSA; FUJITA; KAPPAS, 1989). Além disso, pode resultar no acúmulo do substrato  $\delta$ -ALA no sangue que em pH entre 7-8, sofre uma reação de enolização que por fim promove a formação de radicais superóxido e hidroxil (NEAL et al., 1997). Assim, o  $\delta$ -ALA pode apresentar propriedades pro-oxidantes sob condições fisiológicas (BECHARA, 1996). Consequentemente, a inibição da  $\delta$ -ALA-D por agentes tóxicos ou condições patológicas associadas ao estresse oxidativo pode iniciar um ciclo vicioso oxidativo que continuará a inibir a  $\delta$ -ALA-D e aumentar a concentração de compostos potencialmente tóxicos, como o  $\delta$ -ALA e seus metabólitos relacionados (BECHARA et al., 2007). Exemplos são os indivíduos portadores de porfirias ou intoxicados por chumbo, onde o acúmulo de  $\delta$ -ALA e a geração *in situ* de EROs está sendo reconhecida como indutores das anormalidades típicas dessas patologias (HINDMARSH, 1986).

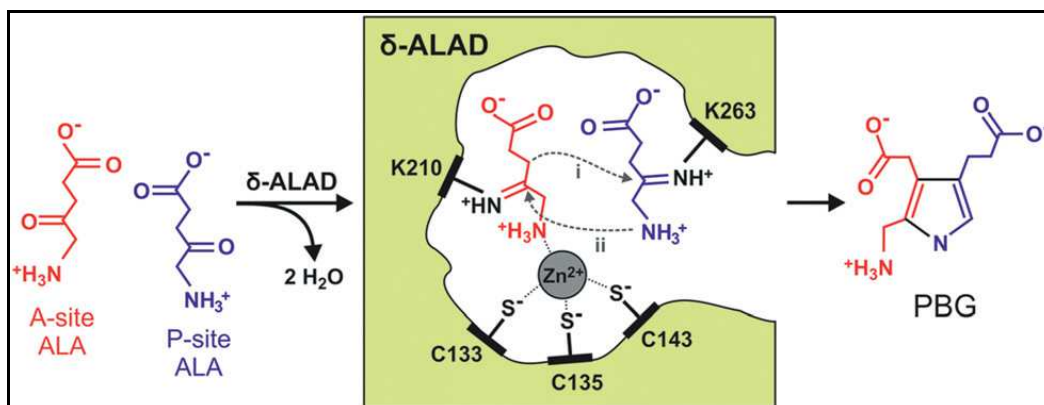


Figura 11 – Ilustração esquemática do mecanismo catalítico da  $\delta$ -ALA-D.

Fonte: ROCHA et al., 2012.

Em algumas situações a inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-D pode ser revertida pela adição de Zn ou ativadores tiólicos como o ditioneitol (DTT), *in vitro*, obtendo-se o índice de reativação da enzima. Assim, o índice de reativação enzimática com DTT é empregado como forma de reverter a atividade da enzima cujo decréscimo tenha sido consequência da oxidação dos grupos tióis e o índice de reativação enzimática com Zn como forma de reverter o decréscimo de atividade causado por quelação, deslocamento ou interação com o íon metálico do centro ativo da enzima (EMANUELLI et al., 1996; ROCHA et al., 2012).

Considerando sua importância no metabolismo celular, diversos estudos têm utilizado a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D como marcador de exposição a diferentes compostos tóxicos exógenos e situações fisiopatológicas pro-oxidantes (NOGUEIRA et al., 2003; SOUZA et al., 2009; ROCHA et al., 2012).

Assim, apesar do amplo uso de plantas para o tratamento e/ou prevenção de diversas condições patológicas, muitas espécies são usadas sem respaldo científico quanto a sua eficácia e segurança. Dessa forma é de grande interesse o estudo dos efeitos de extratos de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum*, espécies vegetais amplamente utilizadas como medicinais no Rio Grande do Sul, em diferentes modelos experimentais que possam contribuir para o conhecimento de suas propriedades bioquímicas, farmacológicas e toxicológicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos extratos de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum* sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em modelos *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos através de:

- a) nível de vitamina C e compostos fenólicos e flavonóides totais,
- b) capacidade removedora de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical de óxido nítrico (NO);
- c) avaliação do poder redutor pelo método de ferro (FRAP);
- d) atividade quelante de íons ferro (Fe<sup>2+</sup>);
- e) atividade mimética das enzimas tiol-peroxidases;

2.2.2 Verificar os efeitos dos extratos de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum*:

2.2.2.1 Em eritrócitos humanos, através de modelos de indução de estresse oxidativo e hemólise; sob condições *in vitro*;

2.2.2.2 Sob parâmetros de estresse oxidativo induzido em tecido renal, hepático e cerebral de ratos, assim como sob as atividades das enzimas δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) em fígado, rim e cérebro total e acetilcolinesterase (AChE) em cérebro total, sob condições *in vitro*;

2.2.2.3 Em linfócitos de baço de ratos parâmetros de viabilidade celular e a atividade da acetilcolinesterase (AChE);

2.2.3 Estimar a toxicidade dos extratos de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum* pelo teste de letalidade da *Artemia salina*;

2.2.4 Com relação ao extrato de *Solanum guaraniticum*, em modelo de avaliação de toxicidade aguda em ratos, *in vivo*, avaliar:

- a) comportamento dos animais, por meio do teste do campo aberto;
- b) parâmetros de toxicidade gerais como consumo de água e comida, ganho de peso, peso relativo dos órgãos (rim, fígado, baço) e alterações de comportamento;
- c) marcadores séricos bioquímicos hepáticos (enzimas transaminases e fosfatase alcalina), renais (uréia e creatinina) e albumina, assim como o perfil glicídico e lipídico (níveis de colesterol total e triglicerídeos);
- d) o perfil hematológico: contagem de leucócitos totais (WBC), contagem eritrócitos (RBC), hematócrito (HT), hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (MCV), concentração corpuscular média de hemoglobina (MCHC), distribuição de volume das células vermelhas (RDW).
- e) parâmetros de estresse oxidativo como capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) em soro, atividade da enzima catalase, níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupamentos tióis não proteicos (NPSH) em tecidos hepático, renal e córtex cerebral;
- f) atividades das enzimas N-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG) em tecido renal, acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral e  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) em fígado, rim e córtex cerebral;

### 3 ARTIGO

**3.1** *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* show similar antioxidant properties but induce different enzymatic activities in the brain of rats

Publicado no periódico **Molecules**.

Article

## ***Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* Show Similar Antioxidant Properties but Induce Different Enzymatic Activities in the Brain of Rats**

Gabriela Bonfanti<sup>1</sup>, Paula Rodrigues Bitencourt<sup>2</sup>, Karine Santos de Bona<sup>1</sup>, Priscila Sabino da Silva<sup>1</sup>, Leticia B. Jantsch<sup>1</sup>, Aline S. Pigatto<sup>3</sup>, Aline Boligon<sup>2</sup>, Margareth L. Athayde<sup>2</sup>, Thissiane L. Gonçalves<sup>1</sup> and Maria Beatriz Moretto<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil; E-Mails: gabriela\_bonfanti@yahoo.com.br (G.B.); ksbona@yahoo.com.br (K.S.B.); pry\_sabino@hotmail.com (P.S.S.); letii\_jantsch@hotmail.com (L.B.J.); thissianegoncalves@yahoo.com.br (T.L.G.)

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil; E-Mails: bitencourt.paula@yahoo.com.br (P.R.B.); alineboligon@hotmail.com (A.B.); margareth@smail.ufsm.br (M.L.A.)

<sup>3</sup> Franciscan University Center (UNIFRA), Santa Maria, RS 97010-032, Brazil; E-Mail: alinepi@unifra.br

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: beatriz@smail.ufsm.br; Tel.: +55-55-3220-8749; Fax: +55-55-3220-8018.

Received: 21 May 2013; in revised form: 9 July 2013 / Accepted: 22 July 2013 /

Published: 31 July 2013

---

**Abstract:** *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* are both employed in Brazil as medicinal plants, even though their potential toxicity is not well established and they are frequently misused. The aim of this study was investigate the effect of the aqueous leaf extracts of both plants on  $\delta$ -aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) and acetylcholinesterase (AChE) activities and the antioxidant action against oxidative damage induced by sodium nitroprusside in rats, using *in vitro* assays. In addition, the presence of gallic, caffeic and chlorogenic acids, as well as rutin, quercetin and kaempferol as bioactive compounds in the extracts was identified by HPLC and their levels quantified. The antioxidant activities of both extracts were assessed by their capabilities to scavenge nitric oxide and to inhibit lipid peroxidation. Only *Syzygium jambos* presented thiol-peroxidase-like activity. Although



neither extract affected the AChE activity, the aqueous extract of *Solanum guaraniticum* inhibited brain  $\delta$ -ALA-D activity, suggesting a possible impairment effect on the central nervous system. Our results showed that both extracts exhibited efficient free radical scavenger activity and are an interesting source of bioactive compounds, justifying their use in folk medicine, although *Solanum guaraniticum* extract could have neurotoxicity properties and we therefore suggest that its use should be restricted to ensure the health of the population.

**Keywords:** *Solanum guaraniticum*; *Syzygium jambos*;  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase; lipid peroxidation; induced oxidative stress

---

## 1. Introduction

Free radicals are accepted as important mediators of tissue injury in several human diseases, such as arthritis inflammation, atherosclerosis, diabetes, cirrhosis and cancer [1]. The efficiency of the antioxidant defense system is altered under pathological conditions and thus, the ineffective scavenging process and/or overproduction of free radicals may play a crucial role in causing tissue damage [2]. Therefore attention has been focused on the search for natural antioxidants with the potential to scavenge free radicals and enhance the antioxidative defense system [3,4].

Medicinal plants have been traditionally used in the treatment of several human diseases and their pharmacological and therapeutic properties have been attributed to the different chemical constituents isolated from their crude extracts [5]. As an example, the leaves of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae) have used as a diuretic, in the treatment of rheumatism, as a febrifuge and present antiviral, anti-inflammatory and digestive properties [6–8]. In Brazil this plant is known by the common name “jambolão” and its leaf infusions are also used traditionally in the treatment of diabetes, even though some studies have shown its ineffectiveness as a antihyperglycemic agent [9]. Likewise, *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil (Solanaceae) is known by the folk name “falsa-jurubeba” in southern Brazil. Its traditional uses include the treatment of anemia, fevers and liver and gastric dysfunctions such as hepatitis and ulcers [10–12]. However, although previous studies have demonstrated the hepatoprotective and antioxidant activities of aqueous extract of *Solanum guaraniticum*, they also showed that it promoted an increase in the level of serum hepatic enzymes in mice and it is related to cattle intoxications [13–15]. Thus, although medicinal plants may have biological activities that are beneficial to humans, the potential toxicity of these bioactive substances has often not been well established [16]. In particular, data on the toxic effects of Brazilian *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* are scarce and they are often misused in folk medicine.

The enzyme  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D, EC 4.2.1.24) is a sulfhydryl-containing enzyme of heme pathway [17]. Due to its active sulfhydryl groups and the role of heme proteins in many cellular metabolic processes [18], the enzyme presents high sensitivity to pro-oxidant situations and impairment of metabolic processes and has been used to evaluate toxic effects [19,20]. Another important enzyme present in all animals, acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is important for function of the cholinergic system, by hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine [21]. The

crucial role of cholinesterases in neural transmission makes them a primary target of a large number of cholinesterase-inhibiting drugs and toxins [22], and making them valuable diagnostic tools for verifying exposure to chemical agents [23].

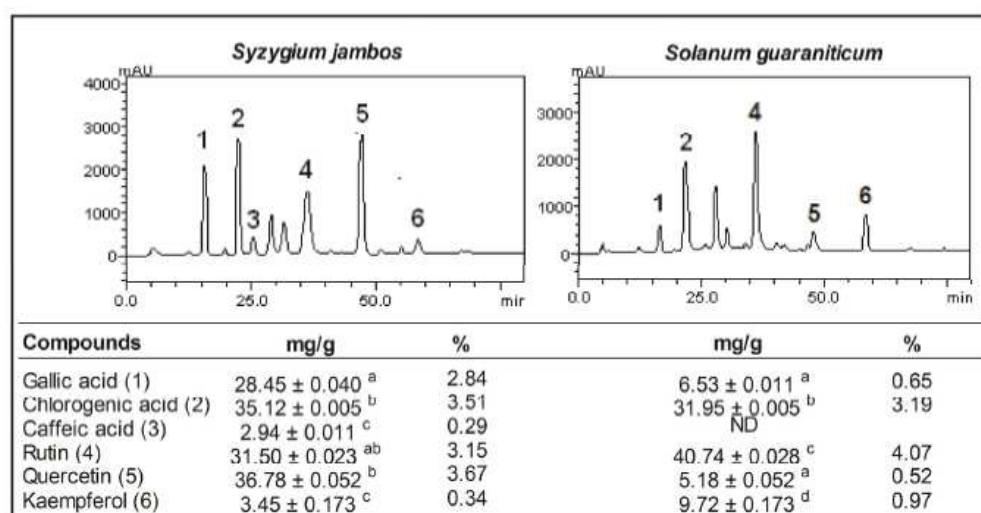
The purpose of this study was to evaluate the effects of aqueous extracts of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* on  $\delta$ -ALA-D and AChE activities. The effects of both extracts on the lipid peroxidation, thiol status and catalase activity on induced oxidative stress in tissue of rats were assessed using *in vitro* assays.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Phytochemical Screening of Aqueous Extract of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum*

In order to ascertain the phytochemicals responsible for the *in vitro* biological activities of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum*, the aqueous leaf extracts of these plants were screened for various compounds. HPLC fingerprinting revealed the presence of gallic and chlorogenic acids, as well as rutin, quercetin and kaempferol in both extracts and the percentage of each compound is shown in Figure 1. Furthermore, considering the chromatographic conditions used, caffeic acid was only detected in the *Syzygium jambos* extract. The characterization of these aqueous leaf extracts is particularly important since there is scarce data available about this local species and any new studies represent a significant contribution to the knowledge of these plants [7,24].

**Figure 1.** HPLC/DAD profile of extracts tested (detection UV at 271 nm) and quantification of phenolic compounds found [Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and kaempferol (peak 6). Quantification results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test. Means marked with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). ND = not detected.



The contents of total phenol, flavonoids, and vitamin C are also shown in Table 1. As can be seen, *Syzygium jambos* aqueous leaf extract has a higher content of total phenolic compounds ( $p = 0.0002$ ) whereas *Solanum guaraniticum* extract has higher total flavonoids content levels ( $p < 0.0001$ ). This result agrees with the proportion of phenolic acids found in the HPLC analysis of the extracts (Figure 1). Along this line, *Solanum guaraniticum* extract has higher levels of vitamin C ( $p = 0.0010$ ) than *Syzygium jambos* extract. As an electron donor, vitamin C is a potent water-soluble antioxidant in humans and an essential dietary nutrient required as a co-factor for several enzymes [25,26]. However, the human body lacks the ability to synthesize this compound, therefore the vegetal species with high content of vitamin C are valuable sources of this nutrient. Furthermore, vitamin C has been reported to contribute to the antioxidant activities of plant food and is present substantially in the extracts. Ascorbic acid is a good reducing agent and exhibits its antioxidant activities by electron donation [27].

Polyphenols are considered to be strong antioxidants due to the redox properties of their hydroxyl groups [28]. Phenolic compounds are capable of removing free radicals, chelating metal catalysts, activating antioxidant enzymes, reducing  $\alpha$ -tocopherol radicals, and inhibiting oxidases [29].

**Table 1.** Total phenols, total flavonoids and vitamin C contents in aqueous extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum*.

Extract content	<i>Syzygium jambos</i>	<i>Solanum guaraniticum</i>
Total phenolic (mg GAE/g)	108.2 $\pm$ 3.34	58.76 $\pm$ 1.72 **
Total flavonoid (mg QE/g)	85.55 $\pm$ 2.54	237.90 $\pm$ 7.12 ***
Vitamin C (mg VIT C/g)	21.07 $\pm$ 0.64	58.01 $\pm$ 4.21 **

Data are reported as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). GAE: gallic acid equivalents; QE: quercetin equivalents; VIT C: vitamin C. Statistically significant differences as determined by Student's *t*-test. (\*\*) and (\*\*\*) denotes  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ .

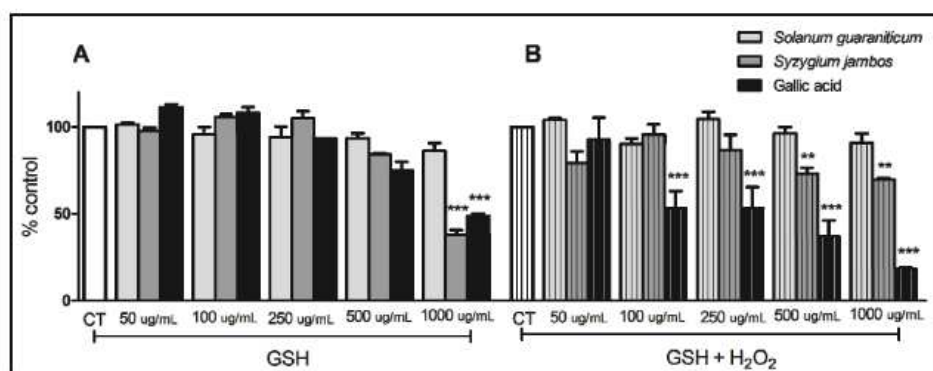
## 2.2. Thiol Peroxidase-Like Activity of Both Extracts Evaluated

In Figure 2B, we can observe a decrease in SH groups when *Syzygium jambos*, at 500  $\mu\text{g/mL}$  and 1,000  $\mu\text{g/mL}$ , was incubated with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Considering this effect, *Syzygium jambos* seems to catalyze the reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with the consumption of glutathione (GSH), thus mimicking the properties of glutathione peroxidase (GPx). GPx is an antioxidant selenoenzyme that protects various organisms from oxidative damage by catalyzing the reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and other organic peroxides with the help of GSH as the reducing agent [30]. Taking into account that mimetic activities of this enzyme have been investigating in synthetic compounds to explore their antioxidant capacity [20], this results give us an insight into the possible mechanisms by which *Syzygium jambos* extract exerts its effects, which are under investigation in our laboratory.

However, we also noticed that *Syzygium jambos* extract at 1,000  $\mu\text{g/mL}$  was able to promote the consumption of GSH even in the absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 2A), which might have occurred due to a possible reaction between thiols and extract components or GSH oxidation. In fact, plant extracts can present a pro-oxidant or antioxidant behavior depending on the dose [31]. However, in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , due to a likely competition of this reactive species and GSH as well as due to the extract components, the polyphenol extracts may be used to detoxify  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Moreover, *Solanum guaraniticum*

extract did not cause any changes on SH groups level, neither in the presence nor in the absence of  $H_2O_2$  suggesting that this extracts, at the concentrations tested, did not present thiol-peroxidase like activity such as antioxidant capacity.

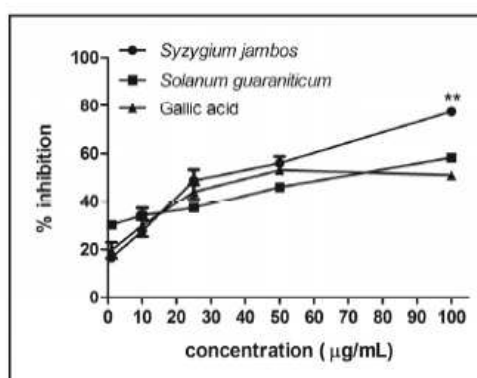
**Figure 2.** Thiol peroxidase-like activity of aqueous extracts tested in the absence of  $H_2O_2$  (A), and in the presence of  $H_2O_2$  (B). Data are reported as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test. (\*\*) and (\*\*\*) denotes  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , compared to respective controls (CT).



### 2.3. Nitric Oxide-Scavenging Activity Assay of Extracts

Figure 3 shows that both aqueous extracts studied can scavenge nitric oxide (NO) radical, but *Syzygium jambos* had a significantly higher scavenging ability than *Solanum guaraniticum*. At the higher concentration tested (100  $\mu\text{g/mL}$ ), the scavenging capacity of *Syzygium jambos* extract was around 77%, while *Solanum guaraniticum* demonstrated a scavenging power around 58% ( $p < 0.001$ ).

**Figure 3.** NO scavenging activity of aqueous extracts tested. Data are reported as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test. \*\* denotes  $p < 0.001$  compared to *Solanum guaraniticum* and gallic acid (100  $\mu\text{g/mL}$ ).



#### 2.4. Effect of Extracts on $\delta$ -ALA-D and AChE Activity in Rat Tissues

In this study, *Solanum guaraniticum* extract inhibited brain  $\delta$ -ALA-D activity at 1,000  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ). Taking into account that: (i) some studies have related *Solanum guaraniticum*, under its synonym *S. fastigiatum*, to bovine intoxications affecting the central nervous system of the animals and causing neuronal degeneration and sporadic seizures [13,14,32]; and (ii)  $\delta$ -ALA-D activity can be inhibited during seizures [33]; this finding may be considered an indication of the toxic properties of this plant. Furthermore, the inhibition of the  $\delta$ -ALA-D causes an accumulation of its substrate 5-aminolevulinic acid (ALA), which has already demonstrated neurotoxicity by inducing seizures and death after intracerebroventricular administration in rodents [34]. ALA may also rapidly oxidize to generate reactive oxygen species [35], which could intensify the toxicological process. Free radicals are one of the main causes of cellular dysfunction in the brain [36], and seizures, oxidative stress and  $\delta$ -ALA-D activity have already been suggested as linked events [37]. On the other hand,  $\delta$ -ALA-D activity of liver and kidney tissues was not affected by *Solanum guaraniticum* extract. *Syzygium jambos* was not able to inhibit  $\delta$ -ALA-D activity of any tissue tested (Table 2). Furthermore, none of the concentrations of any extracts tested was able to alter enzymatic activity of AChE (Table 2).

**Table 2.** Effect of extracts on tissue  $\delta$ -ALA-D and AChE activity in rat homogenates.

Treatment	$\delta$ -ALA-D			AChE
	Liver	Brain	Kidney	Brain
Control (PBS)	4.33 $\pm$ 0.48	1.23 $\pm$ 0.18	1.49 $\pm$ 0.43	2.78 $\pm$ 0.14
Lead acetate 10 $\mu\text{M}$	2.92 $\pm$ 0.23	0.95 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.43	-
Paraoxon 1 $\mu\text{M}$	-	-	-	1.26 $\pm$ 0.07 ***
<i>Syzygium jambos</i> 100 $\mu\text{g/mL}$	4.85 $\pm$ 0.71	1.10 $\pm$ 0.06	1.89 $\pm$ 0.49	2.65 $\pm$ 0.14
<i>Syzygium jambos</i> 250 $\mu\text{g/mL}$	4.09 $\pm$ 0.46	1.38 $\pm$ 0.28	1.97 $\pm$ 0.53	2.75 $\pm$ 0.14
<i>Solanum guaraniticum</i> 500 $\mu\text{g/mL}$	4.24 $\pm$ 0.52	0.91 $\pm$ 0.11	1.66 $\pm$ 0.32	2.73 $\pm$ 0.14
<i>Solanum guaraniticum</i> 1000 $\mu\text{g/mL}$	4.31 $\pm$ 0.72	0.66 $\pm$ 0.14 *	1.35 $\pm$ 0.18	2.79 $\pm$ 0.14

Data are reported as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) and assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test.  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity ( $\delta$ -ALA-D) results are presented as nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h. Acetylcholinesterase activity (AChE) results are presented as  $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$  of protein. (\*) and (\*\*\*) denotes  $p < 0.05$  and  $p < 0.0001$  as compared to the respective control samples.

#### 2.5. Effects of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on Lipid Peroxidation, NPSH Content and Catalase Activity of Sodium Nitroprusside (SNP)-Induced Tissues

The ability of both studied aqueous extracts to inhibit SNP-induced lipid peroxidation was measured by the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the results are presented in Table 3. The data revealed that the incubation of the tested homogenates in the presence of SNP caused a significant ( $p < 0.05$ ) increase in TBARS content (484.75% to liver, 911.01% to brain and 295.06% to kidney) when compared with the basal value (100%). However, the presence of aqueous extract of *Syzygium jambos* or *Solanum guaraniticum* at all concentrations tested inhibited TBARS production, with a more pronounced effect in the brain tissue.

**Table 3.** Effect of aqueous extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on lipid peroxidation level before and after sodium nitroprusside (SNP) incubation of rat homogenates.

Treatments	Liver	Inhibition (%)	Brain	Inhibition (%)	Kidney	Inhibition (%)
Control	2.23 ± 0.54	-----	3.36 ± 0.93	-----	1.62 ± 0.57	-----
Gallic acid 25 µg/mL	1.26 ± 0.42	43.49	1.57 ± 0.51	53.27	1.29 ± 0.13	20.37
<i>Syzygium jambos</i> 100 µg/mL	1.98 ± 0.52	11.21	1.53 ± 0.18 *	54.46	0.93 ± 0.25	42.59
<i>Syzygium jambos</i> 250 µg/mL	2.01 ± 0.51	9.86	1.19 ± 0.26 **	64.58	0.73 ± 0.18	54.93
<i>Solanum guaraniticum</i> 500 µg/mL	2.36 ± 0.53	-----	1.49 ± 0.26 *	55.65	0.81 ± 0.15	50.00
<i>Solanum guaraniticum</i> 1000 µg/mL	2.41 ± 0.40	-----	1.89 ± 0.35 *	43.75	0.84 ± 0.14	48.14
Induced (SNP)	10.81 ± 1.45 ***	-----	30.61 ± 3.41 ***	-----	4.78 ± 1.47 *	-----
Gallic acid 25 µg/mL	1.08 ± 0.09 ###	90.00	27.88 ± 1.15	8.91	1.30 ± 0.22 ###	74.26
<i>Syzygium jambos</i> 100 µg/mL + SNP	2.39 ± 0.51 ###	77.89	2.97 ± 0.61 ###	90.29	1.09 ± 0.30 ##	77.19
<i>Syzygium jambos</i> 250 µg/mL + SNP	2.33 ± 0.47 ###	78.44	1.95 ± 0.78 ###	93.62	0.86 ± 0.10 ##	82.00
<i>Solanum guaraniticum</i>						
500 µg/mL + SNP	2.58 ± 0.65 ###	76.13	1.86 ± 0.80 ###	93.92	1.00 ± 0.20 ##	79.07
<i>Solanum guaraniticum</i>						
1000 µg/mL + SNP	2.75 ± 0.59 ##	74.56	2.77 ± 0.74 ###	90.95	1.18 ± 0.17 ##	75.31

Data are reported as mean ± SEM ( $n = 6$ ) and assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test. Results are presented as nmol MDA (malondialdehyde)/mg protein. (\*), (\*\*) and (\*\*\*) denotes  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively, as compared to the respective control samples. (#), (##) and (###) denotes  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively, as compared to the respective induced samples.

These findings are in accordance with the NO scavenging effect of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* verified in Figure 3. SNP cause cytotoxicity through the release of cyanide and/or nitric oxide (NO) [38]. Therefore, a plausible mechanism by which these extracts are conferring protective action against SNP-induced lipid peroxidation could be the ability of the extract phytochemicals to scavenge NO radicals produced by SNP. The phenolic compounds in the extracts can also quench free radicals which may have been resulted from lipid peroxidation chain reaction [39]. In fact, phenolics present in plant sources have received considerable attention over the past decade because of their potential to prevent lipid peroxidation and diseases associated with it [40]. In line with this, we can associate the antioxidant activity of extracts studied here with their folk medicinal use. *Syzygium jambos* leaves are often used to manage diabetes mellitus, a disease for which the involvement of lipid peroxidation is well known [41]. *Solanum guaraniticum* is also used mainly to treat liver diseases and the lipid peroxidation process can contribute to the initiation and progress of liver damage [42].

The non-protein thiol (NPSH) status of the tested homogenates was also verified. Table 4 shows that the extracts did not affect thiol status of tissues alone and that the presence of SNP decreased thiol levels (56.63% to liver and 65.13% to brain tissue) when compared with the basal value, except for kidney tissue. However, both *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts, at all concentrations tested, were capable of maintaining thiol level at the brain homogenate when they were present in the SNP incubation.

**Table 4.** Effect of aqueous extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on non-protein thiol (NPSH) content and catalase activity in the liver, brain and kidney of rats.

Treatments	Thiol content			CAT		
	Liver	Brain	Kidney	Liver	Brain	Kidney
Control	11.16 ± 2.16	7.57 ± 1.01	5.66 ± 1.19	38.14 ± 6.49	6.36 ± 1.49	17.71 ± 2.22
Galic acid 25 µg/mL	11.44 ± 2.6	9.85 ± 0.29	7.31 ± 0.78	40.28 ± 9.87	6.34 ± 0.34	26.53 ± 1.53 *
<i>Syzygium jambos</i> 100 µg/mL	7.41 ± 0.84	9.12 ± 0.50	6.21 ± 1.81	37.65 ± 7.81	4.16 ± 1.25	15.41 ± 2.75
<i>Syzygium jambos</i> 250 µg/mL	7.32 ± 1.89	10.66 ± 0.73	9.73 ± 1.36	28.72 ± 6.54	2.80 ± 1.10	13.84 ± 2.33
<i>Solanum guaraniticum</i> 500 µg/mL	6.42 ± 1.82	9.20 ± 1.00	10.52 ± 1.76 *	41.98 ± 6.18	3.43 ± 1.07	20.80 ± 2.03
<i>Solanum guaraniticum</i> 1000 µg/mL	10.94 ± 2.35	10.91 ± 1.69	8.84 ± 0.20	49.10 ± 6.45	3.37 ± 1.17	18.82 ± 1.65
Induced (SNP)	4.84 ± 1.69 *	2.64 ± 0.57 **	5.42 ± 1.70	46.78 ± 9.98	4.04 ± 1.17	16.74 ± 1.01
Galic acid 25 µg/mL	5.51 ± 0.57	3.01 ± 0.20	5.43 ± 0.54	53.47 ± 10.44	2.95 ± 0.56	26.52 ± 3.08 #
<i>Syzygium jambos</i> 100 µg/mL + SNP	5.80 ± 1.46	7.52 ± 0.79 ##	6.13 ± 1.00	48.04 ± 7.70	4.13 ± 1.42	17.92 ± 1.52
<i>Syzygium jambos</i> 250 µg/mL + SNP	6.66 ± 0.90	9.40 ± 0.65 ###	10.56 ± 1.96 #	40.04 ± 9.82	2.37 ± 1.37	19.47 ± 3.23
<i>Solanum guaraniticum</i> 500 µg/mL + SNP	8.45 ± 1.87	7.30 ± 0.52 ##	6.95 ± 0.62	47.69 ± 13.39	4.17 ± 1.01	19.18 ± 1.17
<i>Solanum guaraniticum</i> 1000 µg/mL + SNP	7.96 ± 1.67	9.03 ± 0.86 ###	9.50 ± 1.51	41.60 ± 11.14	3.52 ± 1.06	19.18 ± 1.69

Data are reported as mean ± SEM ( $n = 6$ ) and assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test. Results are presented as nmol NPSH (non-protein thiol)/mg protein and units of catalase (CAT)/mg protein. (\*) and (\*\*) denotes  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively, as compared to the respective control samples. (#), (##) and (###) denotes  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively, as compared to the respective induced samples.

The brain and nervous system are particularly vulnerable to oxidative stress due to their limited antioxidant capacity [43]. In this context, the thiol redox state is an essential parameter associated with major biologic processes such as oxidative stress and intracellular redox homeostasis [44]. In fact, the results observed in Table 4 demonstrated that brain NP-SH level was more sensitive to SNP and more responsive to both extracts tested than the liver and kidney. This effect could be linked to the phytochemical compounds identified on the extracts since several studies of polyphenol rich foods or individual flavonoids have demonstrated their neuroprotective properties against oxidative and inflammatory stressors [45].

In relation to enzymatic antioxidants, the SNP treatment was not able to alter significantly the CAT activity, even the extracts alone, in any of the tissue tested. Similar results were observed in previous studies [20,46]. Catalase is a heme protein that catalyzes the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protects tissue from highly reactive hydroxyl radicals [47]. Thus, the effect observed here may have occurred because this enzyme is not directly effective towards the reactive species formed on the *in vitro* system.

Previous studies have already demonstrated the radical scavenging properties and antioxidant effect of *Solanum guaraniticum* on ferrous-induced lipid peroxidation [24]. In relation to *Syzygium jambos*, radical scavenging properties and *in vivo* antioxidant power have already been demonstrated [48] although this is the first study involving the aqueous extract of this plant, which is its most popular form of medicinal use [9]. In this sense, a deep evaluation of the antioxidant activity by different methods is substantial for a better understanding of biological potential activities of plant extracts, since the distinct antioxidant properties could indicate that they were acting via distinct mechanisms.

### 3. Experimental

#### 3.1. Chemicals and Apparatus

5'-Aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA), thiobarbituric acid (TBA), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), gallic acid, ascorbic acid and quercetin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sodium nitroprusside (SNP) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), comprising a Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser, CBM 20A integrator and SPD-M20A UV-VIS diode array detector (DAD) and Software LC solution 1.22 SP1. Absorbance measurements were recorded on a Hitachi U-18,000 UV-Visible Reading Spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) using disposable cuvettes for the visible range, and quartz cuvettes for measurements in the ultraviolet (UV) range.

#### 3.2. Plant Material and Preparation of Extracts

Leaves of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* were collected in the cities of Boca do Monte and Tupanciretã, respectively. A voucher specimen was identified and deposited at the herbarium of Federal University of Santa Maria. The leaves were dried in a greenhouse, smashed in a



knife mill and submitted to extraction with ethanol 80% in a Soxhlet apparatus until exhaustion. After extraction, the solvent was evaporated on a rotavapor, supplying the crude extract.

### 3.3. Phytochemical Analysis

#### 3.3.1. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Characterization

HPLC characterization under gradient conditions using C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm) packed with 5 μm diameter particles; the mobile phases were water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 min and then changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume 40 μL and the detection wavelengths were 271 nm for gallic acid, 325 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention times with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm).

#### 3.3.2. Total Polyphenols Content

Total phenolic content of extracts (1 mg/mL) was determined with Folin-Ciocalteu's reagent in alkaline medium and expressed as milligram of gallic acid equivalents per gram of extract powder (mg GAE/g) [49].

#### 3.3.3. Total Flavonoid Content

The total flavonoid content, as milligram of quercetin equivalents per gram of extract powder (mg QE/g), was measured on extracts (1 mg/mL) based on aluminum chloride colorimetric method reported by Zhishen and Mengcheng [50].

#### 3.3.4. Determination of Vitamin C Content

The vitamin C content was determined in extracts (1 mg/mL) using the method of Benderitter *et al.* [51], based on its reaction with 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), calculated using a vitamin C standard curve and expressed as milligram of vitamin C per gram of extract powder (mg VIT C/g).

### 3.4. Nitric Oxide-Scavenging Assay of Extracts

The scavenging effect of extracts on nitric oxide (NO) was measured according to the method of Sreejayan and Rao [52]. Gallic acid was used as positive control. For the assay, sodium nitroprusside (10mM), was mixed with different gallic acid or extracts concentrations, incubated 150 min and then mixed with 0.5 mL of Griess reagent and measure at 546 nm. In the control, sample extract was substituted by PBS. The capability of scavenging NO was calculated using the following equation:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100 \quad (1)$$

### 3.5. Thiol Peroxidase-Like Activity of Extracts

The catalytic effect of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* on the reduction of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by reduced glutathione (GSH) was assessed using the rate of GSH oxidation. Different concentrations of extracts were incubated in the medium containing GSH (1mM) with and without  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.3 mM). At 120 min, aliquots of the reaction mixture (200  $\mu\text{L}$ ) were checked for the amount SH groups according to Ellman [53]. Gallic acid was used as positive control. The values are expressed in percentage of control [20].

### 3.6. Animals

Male adult albino Wistar rats (200–250 g) from our own breeding colony, that are maintained at  $22 \pm 2$  °C, on a 12 h light/dark cycle, with water and food were provided *ad libitum*. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil (Process number 23081.009003/2012-01). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The rats were euthanized and the brain, liver and kidney tissues were rapidly dissected, weighted and placed on ice. The tissues were immediately homogenate in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10 w/v). The homogenates were centrifuged at  $4,000 \times g$  at 4 °C for 10 min to yield a low-speed supernatant (S1) that was used for  $\delta$ -ALA-D and AChE activity besides TBARS, thiol content and catalase activity assays. Moreover, protein content of S1 was measured by Peterson [54].

#### 3.6.1. $\delta$ -ALA-D Activity

$\delta$ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa [55] with some modifications. An aliquot of S1 (200  $\mu\text{L}$ ) was incubated at 37 °C in the presence or absence of aqueous extracts at different concentrations (100 and 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *Syzygium jambos* and 500 and 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *Solanum guaraniticum*), based on previous studies in our laboratory. Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate  $\delta$ -aminolevulinic acid and the incubation was carried out at 37 °C for 1 h to liver and kidney and for 3 h to brain homogenate. The porphobilinogen which is formed during the incubation period, was mixed with modified Ehrlich's reagent, and the color developed was measured spectrophotometrically (555 nm) against a blank. A set of tubes was assessed with lead acetate (AcPb, 10  $\mu\text{M}$ ) as positive control of inhibition enzymatic activity [56] Results were expressed as nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h.

#### 3.6.2. Acetylcholinesterase Activity Assay for Brain

The AChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman *et al.* [57] as previously described [58]. An aliquot of brain homogenate (50  $\mu\text{L}$ ) was pre-incubated for 1 h at 37 °C in the presence or absence of aqueous extracts at different concentrations (100 and 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *Syzygium jambos* and 500 and 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *Solanum guaraniticum*). The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh) to the reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM TFK; pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion measured by absorbance at 412 nm

during 2-min incubation at 25 °C. Paraoxon (1 µM, an organophosphate inhibitor of AChE), was used as positive control [59]. The enzyme activity was expressed in µmol AcSCh/h/mg of protein.

### 3.6.3. Sodium Nitroprusside (SNP) induced Oxidative Stress

This assay was carried out to determine if the extracts protect against oxidative stress induced by SNP in rat brain, liver and kidney homogenates *in vitro*. SNP was used as classical inductor of oxidative stress. The supernatant of each tissue was incubated with or without freshly prepared SNP (50 µM) and different concentrations of the plants extract (100 and 250 µg/mL of *Syzygium jambos* and 500 and 1,000 µg/mL of *Solanum guaraniticum*) at 37 °C for 1 h. After the incubation time, lipid peroxidation was measure by TBARS levels according to the method of Niehaus and Samuelsson [60], nonprotein thiols (NPSH) content was determined according to Ellman [53] and catalase activity as described by Aebi [61]. Gallic acid 25 µg/mL was used as positive control in all assays [5].

### 3.7. Statistical Analysis

The analyses were performed using STATISTICA for Windows, version 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). All data were analyzed using Student's *t*-test or one way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test, when appropriate and presented as mean ± standard error of mean (SEM). A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant for all analyses.

## 4. Conclusions

The study of medicinal plants is important, in particular because the population generally believes that plant extracts are safe due their natural origin, although studies have shown that even plants used popularly with therapeutic purposes can present different degrees of toxicity. The current study has unequivocally demonstrated the antioxidant effect of both aqueous leaf extracts tested, evidencing properties to justify their popular use, meanwhile, *Solanum guaraniticum* extract inhibited the brain δ-ALA-D activity, suggesting a possible impairment on the central nervous system. The results presented in this study indicate that *Solanum guaraniticum* may be neurotoxic and caution must be exercised in its administration. Therefore, more studies are needed to clarify its mechanisms of action.

## Acknowledgments

We are gratefully acknowledge the financial support provided by CNPq (Proc. 477029/2011-6) and FAPERGS (Proc. 11/1167-5) and the offer of doctoral fellowship to Gabriela Bonfanti by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil as well as Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for support in this study.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Nordberg, J.; Arner, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *3*, 1287–1312.
2. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence. *Lancet* **1994**, *344*, 721–724.
3. Cho, E.J.; Lee, Y.A.; Yoo, H.H.; Yokozawa, T. Protective effects of broccoli (*Brassica oleracea*) against oxidative damage *in vitro* and *in vivo*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2006**, *52*, 437–444.
4. Bahramikia, S.; Yazdanparast, R. Antioxidant efficacy of nasturtium officinale extracts using various *in vitro* assay systems. *J. Acupunct. Meridian Stud.* **2010**, *3*, 283–290.
5. Pereira, R.P.; Fachineto, R.; de Souza Prestes, A.; Puntel, R.L.; Santos da Silva, G.N.; Heinzmann, B.M.; Boschetti, T.K.; Athayde, M.L.; Bürger, M.E.; Morel, A.F.; *et al.* Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem. Res.* **2009**, *34*, 973–983.
6. Morton, J.F. *Rose Apple. USA: Fruits of Warm Climates*; Florida Flair Books: Miami, FL, USA, 1987; pp.383–386.
7. Slowing, K.; Carretero, E.; Villar, A. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. *J. Ethnopharmacol.* **1994**, *43*, 9–11.
8. Slowing, K.; Carretero, E.; Villar, A. Anti-inflammatory compounds of *Eugenia jambos*. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 8126–8127.
9. Teixeira, C.C.; Fuchs, F.D.; Blotta, R.M.; Knijnik, J.; Delgado, I.C.; Netto, M.S.; Ferreira, E.; Costa, A.P.; Mussnich, D.G.; Ranquetat, G.G.; *et al.* Effect of tea prepared from leaves of *Syzygium jambos* on glucose tolerance in nondiabetic subjects. *Diabetes Care* **1990**, *13*, 907–908.
10. Costa, O.A. Jurubeba. *Revista Brasileira De Farmácia* **1940**, *21*, 404–416.
11. Costa, O.F. *Farmacognosia*, 2nd ed; Ed Lisboa-Fundacao Calouste-Gulbenkian: Lisboa, Portugal, 1975.
12. Penna, M. *Dicionario Brasileiro de Plantas Mediciniais*; Kosmos: Rio de Janeiro, Brazil, 1964.
13. Paulovich, F.B.; Portiansky, E.L.; Gimeno, E.J.; Schild, A.L.; Mendez, M.C.; Riet-Correa, F. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol Clin. Med.* **2002**, *49*, 473–477.
14. Rech, R.R.; Rissi, D.R.; Rodrigues, A.; Pierezan, F.; Piazer, J.V.M.; Kommers, G.D.; Barros, C.S.L. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. *Pesq. Vet. Bras.* **2006**, *26*, 183–189.
15. Sabir, S.M.; Rocha, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 226–232.
16. Rosidah; Yam, M.F.; Sadikun, A.; Ahmad, M.; Akowuah, G.A.; Asmawi, M.Z. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 244–249.
17. Bevan, D.R.; Bodlaender, P.; Shemin, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of  $Zn^{2+}$  for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 2030–2035.

18. Brito, V.B.; Folmer, V.; Soares, J.C.M.; Silveira, I.D.; Rocha J.B.T. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in mice. *Nutrition* **2007**, *23*, 818–826.
19. Nogueira, C.W.; Borges, V.C.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T. Organochalogen effects on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells *in vitro*. *Toxicology* **2003**, *191*, 169–178.
20. Souza, A.C.G.; Luchese, C.; Santos Neto, J.S.; Nogueira, C.W. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci.* **2009**, *84*, 351–357.
21. Silver, A. *The Biology of Cholinesterases*; North-Holland Publishing Company: Amsterdam, The Netherlands, 1974; p. 596.
22. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Papers* **2011**, *155*, 219–223.
23. Shenouda, J.; Green, P.; Sultatos, L. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **2009**, *241*, 135–142.
24. Zadra, M.; Piana, M.; Brum, T.F.; Boligon, A.A.; de Freitas, R.B.; Machado, M.M.; Stefanello, S.T.; Soares, F.A.A.; Athayde, M.L. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules* **2012**, *17*, 12560–12574.
25. Banerjee, A.; Nabasree, D.; De, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.* **2005**, *90*, 727–733.
26. Padayatty, S.J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J. H.; Chen, S.; Corpe, C.; Dutta, A.; Dutta, S.K.; *et al.* Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* **2003**, *22*, 18–35.
27. Obboh, G. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy G vegetables. *Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 513–517.
28. Materska, M.; Perucka, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1750–1756.
29. Amic, D.; Davidovic-Amic, D.; Beslo, D.; Trinajstic, N. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croat. Chem. Acta* **2003**, *76*, 55–61.
30. Flohe, L.; Gunzler, W.A.; Schock, H.H. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett.* **1973**, *32*, 132–134.
31. Sakihama, Y.; Cohen, M.F.; Grace, S.C.; Yamasaki, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **2002**, *177*, 67–80.
32. Riet-Correa, F.; Méndez, M.C.; Schild, A.L.; Summers, B.A.; Oliveira, J.A.; Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration of cattle. *Cornell Vet.* **1983**, *73*, 240–256.
33. Prigol, M.; Wilhelm, E.A.; Schneider, C.C.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Involvement of oxidative stress in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups. *Brain Res.* **2007**, *1147*, 226–232.
34. Emanuelli, T.; Prauchner, C.A.; Dacanal, J.; Zeni, A.; Reis, E.C.; de Mello, C.F.; de Souza, D.O. Intrastriatal administration of 5-aminolevulinic acid induces convulsions and body asymmetry through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* **2000**, *868*, 88–94.

35. Hermes-Lima, M.; Pereira, B.; Bechara, E.J. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* **1991**, *21*, 1085–1090.
36. Floyd, R.A.; Zaleska, M.M.; Harmon, J. *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*; Armstrong, D., Sohal, R.S., Cutler, R.G., Slater, T.F. Raven Press: New York, NY, USA, 1984; pp. 143–161.
37. Freitas, R.M. Lipoic acid alters d-aminolevulinic dehydratase, glutathione peroxidase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities and glutathione reduced levels in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2010**, *30*, 381–387.
38. Oboh, G.; Rocha, J.B.T. Water extractable phytochemicals from *Capsicu pubescens* (tree pepper) inhibit lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents in brain: *In vitro*. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 707–713.
39. Manian, R.; Anusuya, N.; Siddhuraju, P.; Manian, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1000–1007.
40. Awaha, F.M.; Uzoegwua, P.N.; Ifeonua, P.; Oyugib, J.O.; Rutherford, J.; Yao, X.; Fehrmann, F.; Fowke, K.R.; Eze, M.O. Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1279–1286.
41. Giugliano, D.; Ceriello, A.; Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **1996**, *19*, 257–267.
42. Zhu, R.; Wang, Y.; Zhang, L.; Guo, Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol. Res.* **2012**, *42*, 741–749.
43. Vega-Naredo, I.; Poeggeler, B.; Sierra-Sánchez, V.; Caballero, B.; Tomás-Zapico, C.; Alvarez-García, O.; Tolivia, D.; Rodríguez-Colunga, M.J.; Coto-Montes, A. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. *J. Pineal Res.* **2005**, *39*, 266–275.
44. Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 916–921.
45. Calabrese, V.; Cornelius, C.; Dinkova-Kostova, A.T.; Iavicoli, I.; di Paola, R.; Koverech, A.; Cuzzocrea, S.; Rizzarelli, E.; Calabrese, E.J. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 753–783.
46. Posser, T.; Moretto, M.B.; Dafre, A.L.; Farina, M.; da Rocha, J.B.; Nogueira, C.W.; Zeni, G.; Ferreira, J.S.; Leal, R.B.; France, J.L. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An *in vitro* evaluation. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *164*, 126–135.
47. Li, S.; Yan, T.; Yang, J.Q.; Oberley, T.D.; Oberley, L.W. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3927–3939.
48. Islam, M.R.; Parvin, M.S.; Islam, M.E. Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of *Syzygium jambos* (L.) leaves. *Drug Discov. Ther.* **2012**, *6*, 205–211.
49. Subramanian, K.N.; Padmanaban, G.; Sarma, P.S. Folin-Ciocalteu reagent for the estimation of siderochromes. *Anal. Biochem.* **1965**, *12*, 106–112.
50. Zhishen, J.; Mengcheng, T.W.J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **1999**, *64*, 555–559.

51. Benderitter, M.; Maupoil, V.; Vergely, C.; Dalloz, F.; Briot, F.; Rochette, L. Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: Effects of iron chelators. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1998**, *12*, 510–516.
52. Sreejayan, N.; Rao, M.N.A. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 105–107.
53. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
54. Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **1977**, *83*, 346–356.
55. Sassa, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* **1982**, *28*, 133–145.
56. Peixoto, N.C.; Roza, T.; Pereira, M.E. Sensitivity of d-ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals *in vitro* depends on the stage of postnatal growth and tissue. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18*, 805–809.
57. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. JR.; Feather-stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
58. Rocha, J.B.; Emanuelli, T.; Pereira, M.E. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.* **1993**, *53*, 431–437.
59. Herkerta, N.M.; Freudeb, G.; Kunzb, U.; Thiermanna, H.; Woreka, F. Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase. *Toxicol. Lett.* **2012**, *209*, 173–178.
60. Niehaus, W.G.J.; Samuelsson, B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.* **1968**, *6*, 126–130.
61. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–125.

*Sample Availability:* Not available.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 4 MANUSCRITOS

### 4.1 $\delta$ -ALA-D inhibitory potential and protective action of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts on oxidatively stressed erythrocytes

Manuscrito submetido ao periódico **Redox Report**



**$\delta$ -ALA-D inhibitory potential and protective action of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts on oxidatively stressed erythrocytes**

Gabriela Bonfanti<sup>1</sup>, Karine Santos De Bona<sup>1</sup>, Leidiane de Lucca<sup>1</sup>, Leticia Jantsch<sup>1</sup>, Aline Schirmer Pigatto<sup>2</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>1</sup>, Thissiane de Lima Gonçalves<sup>1</sup> \*

**Affiliation**

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Franciscan University Center (UNIFRA), 97010-032 - Santa Maria, RS, Brazil.

**Email addresses:**

Gabriela Bonfanti: gabriela\_bonfanti@yahoo.com.br;

Karine Santos De Bona: ksbona@yahoo.com.br;

Leidiane de Lucca: leidi\_lucca@hotmail.com;

Letícia Jantsch : letii\_jantsch@hotmail.com;

Aline Schirmer Pigatto: alinepi@unifra.br;

Maria Beatriz Moretto: beatriz@smail.ufsm.br.

**\*Correspondence**

thissianegoncalves@yahoo.com.br

Av. Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS-Brasil.

CEP: 97105-900

Prédio 26 – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Fone: +55 55 3220 8749.

Fax: +55 55 3220 8018.

## ABSTRACT

**Objective:** The present study aimed to study the effect of the leaf extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on the  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity, which has been used to evaluate harmful properties of compounds, and their antioxidant activity and potential protective action on oxidatively stressed erythrocytes.

**Methods:** In erythrocyte samples, the effect of both extracts on  $\delta$ -ALA-D activity, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, and AAPH-induced hemolysis, as well as some antioxidant mechanisms, was evaluated.

**Results:** Both extracts inhibited  $\delta$ -ALA-D activity (*Solanum guaraniticum* > *Syzygium jambos*), and an involvement of the zinc ion of the  $\delta$ -ALA-D structure on the inhibition of enzyme activity was verified. *Syzygium jambos* leaf extract showed marked efficiency in countering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lipid peroxidation and in maintaining cellular integrity against AAPH-induced hemolysis. Furthermore, *Syzygium jambos* exhibited greater H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity and stronger reduction power than *Solanum guaraniticum*.

**Discussion:** Considering that the inhibition of  $\delta$ -ALA-D can adversely affect erythrocyte metabolism, we may suggest that this enzyme can be an interesting tool to assess harmful properties of vegetal extracts. Also, both extracts bear potent antioxidant property and should have prospective clinical use against oxidative stress-related diseases, after further elucidation regarding their toxicological properties.

**Keywords:** *Solanum guaraniticum*; *Syzygium jambos*; delta-aminolevulinate dehydratase; antioxidant; erythrocytes; hemolysis.

## INTRODUCTION

Oxidative stress and the production of reactive oxygen species (ROS) have been implicated as one of several mechanisms to induce toxicity in different organs<sup>1</sup>. The erythrocytes are constantly exposed to oxidative injury, but their metabolic activity is capable of reversing the injury under normal conditions<sup>2</sup>. Erythrocytes are protected by the powerful action of the endogenous antioxidant enzymes present in its membranes and cytoplasmic compartments against the continuous production of free radicals by preventing the production of ROS, reducing the generated molecules, or repairing the damage caused by them<sup>3</sup>. However, following an increase in oxidative stress, irreversible damage to erythrocytes occurs, resulting in their ultimate loss by hemolysis and removal from circulation<sup>4</sup>.

A rich dietary of phenolic antioxidants is believed to play an important role in the prevention of many oxidative and inflammatory diseases<sup>5</sup>. Because plants can represent a source of natural compounds with antioxidant activities, many studies have been conducted searching for the antioxidant activities of many plant extracts and their constituents<sup>6</sup>. Among the several medicinal plants, we can highlight *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil (Solanaceae) and *Syzygium jambos* (L.) (Myrtaceae). The first one has its leaves used traditionally to treat liver and gastric dysfunctions and anemia<sup>7,8</sup>. The second one, *Syzygium jambos*, has its leaves widely used in folk medicine due to their anti-inflammatory and digestive properties<sup>9,10</sup> and for the treatment of diabetes, although there are contradictory reports about its anti-hyperglycemic effects<sup>11</sup>.

Although previous studies already demonstrated some antioxidant properties of these vegetal species, few data are founded about its pharmacological and toxic properties. One common problem is their misidentification in popular usage. *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* are frequently used without distinction or by replacing the species *Solanum paniculatum* and *Syzygium cumini*, respectively, which have pharmacological and toxic properties better clarified in the literature.

$\delta$ -Aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) (porphobilinogen synthase, EC 4.2.1.24) is the first cytosolic enzyme in the heme metabolic pathway, being directly related to the production of red blood cells<sup>12, 4</sup>. It is a sulfhydryl-containing enzyme, requiring zinc ions for maximum catalytic activity, which is extremely sensitive to the presence of oxidizing agents<sup>13</sup> and situations associated to oxidative stress<sup>14, 15</sup>.

Therefore, the inhibition of  $\delta$ -ALA-D may adversely affect the biosynthesis of heme and iron uptake in erythropoieses and can result in the accumulation of the substrate 5-aminolevulinic acid, which has some pro-oxidant activity<sup>16</sup>.

Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts on  $\delta$ -ALA-D activity and investigate their antioxidant activity and potential protective action on oxidatively stressed human erythrocytes.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

5'-Aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA), thiobarbituric acid (TBA), dithiothreitol (DTT), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH) and ascorbic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade.

### **Plant material and extracts of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* preparation**

Leaves of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* were collected in the cities of Santa Maria and Tupanciretã, Brazil, respectively. The material was authenticated by Prof. Aline S. Pigatto, and a voucher specimen was deposited at the herbarium of the Federal University of Santa Maria. The leaves were dried in a greenhouse, smashed in the knife mill, and submitted to extraction with ethanol 80% in a Soxhlet apparatus.

### **Antioxidant activity of extracts in cell-free systems**

Iron ion-chelating activity was measured based on a published procedure<sup>17</sup>, except that 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) was used instead of ferrozine. EDTA-2Na (200  $\mu$ g/mL) was used as the positive control.

The ability of extracts to scavenge hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) also was determined<sup>18</sup> and calculated according to the formula: % scavenged  $H_2O_2$  =  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , where  $A_0$  was the control absorbance and  $A_1$  the absorbance in the presence of extract or standard (ascorbic acid).

The extract' reducing power was determined using a Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay and was presented as  $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mL extract}$  <sup>19</sup>.

### **Preparation of erythrocytes**

Blood samples were collected in heparinized tubes from 10 healthy volunteers (approved bioethical protocol: 0049.0.243.000-08). Samples were centrifuged (10 min, 3500 rpm), and plasma and buffy coat were removed. Then, packed cells were washing three times with 0.9% NaCl and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) with a pH of 7.4.

### **Erythrocyte $\delta$ -ALA-D activity evaluation**

Erythrocyte samples at 25% hematocrit (in PBS) were pre-incubated for 2 hours at 37°C in the presence or absence of *Solanum guaraniticum* or *Syzygium jambos* leaf extracts at different concentrations (50-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS). Enzyme reaction was initiated by adding the substrate ( $\delta$ -ALA), and the incubation was carried out. The porphobilinogen, which is formed during the incubation period, was mixed with modified Ehrlich's reagent, and the color developed was measured spectrophotometrically (555 nm) against a blank. Results were expressed as nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h <sup>20</sup>.

To investigate for the possible involvement of sulfhydryl groups or zinc ions in the effect of extract on ALA-D activity, the protective effect of a thiol-reducing agent (dithiothreitol, DTT) or zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ) was examined. A set of tubes was assayed using a similar incubation medium, except that DTT (2 mM) or  $\text{ZnCl}_2$  (1 mM) was added when the reaction was started by the addition of substrate ( $\delta$ -ALA). These effects were measured as the Reactivation Index (R% DTT and R% Zn) by the formula:  $A-B/A*100$ , where A = absorbance of assay with DTT/ $\text{ZnCl}_2$  and B=absorbance of assay without DTT/ $\text{ZnCl}_2$ .

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress**

Erythrocyte suspensions (10% in PBS) were pre-incubated with 2 mM sodium azide for 60 min at 37°C to inhibit catalase. Extracts of *Solanum guaraniticum* or *Syzygium jambos* (final concentration 100, 250, 500, and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diluted in PBS) were added at 30 min of the pre-incubation period with sodium azide. Subsequently, 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to the cell suspension and incubated for a

further 2 h at 37°C. At the end of the incubation time, the lipid peroxidation of erythrocyte membranes was measured by TBARS levels<sup>21</sup> as well as by the levels of non-protein sulfhydryl groups (NP-SH)<sup>22</sup> and protein content<sup>23</sup>.

The highest concentration of each extract (1000 µg/mL) also was tested alone, without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, to verify its *per se* effect on SH groups and lipid peroxidation. In case of a positive response, other concentrations (50-1000 µg/mL) were also tested.

### **Oxidative hemolysis inhibition assays**

Based on the most effective doses on induced oxidative stress tests mentioned above, the protective effect of extracts was also tested against AAPH-induced hemolysis. The thermal decomposition of AAPH generates aqueous peroxy radicals, which induce free-radical chain oxidation in erythrocytes. Thus, an erythrocyte suspension at 10% hematocrit was pre-incubated with extracts of *Syzygium jambos* (final concentration 100 and 250 µg/mL, diluted in PBS) and *Solanum guaraniticum* (final concentration 500 and 1000 µg/mL, diluted in PBS) at 37°C for 30 min, followed by incubation with 50 mM AAPH for 2 h. A negative control (erythrocytes in PBS) was used. At the end of the incubation time, the percentage of hemolysis was determined on the supernatant at 540 nm and calculated in relation to 100% hemolysis caused by adding deionised water to the erythrocyte suspension<sup>24</sup>.

To measure osmotic fragility, aliquots (20 µL) of packed erythrocyte were added to buffered saline solutions of decreasing concentrations (0 – 150mM), were allowed to stand for 30 min, and then were centrifuged. The amount of lysis was determined and expressed as percentage of hemolysis of each saline solution (NaCl mM)<sup>25, 26</sup>. Furthermore, the corresponding NaCl concentration that caused 50% hemolysis of erythrocytes was considered the Mean Corpuscular Fragility Index (MCF), which is determined by plotting the percentage of lysis versus NaCl concentrations<sup>27</sup>.

### **Statistical analysis**

The analyses were performed using Graph Pad Prism for Windows, version 5.03 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Because data had normal distribution, according to the Kolmogorov–Smirnov (KS) test, all data were analyzed using Student's *t*-test or one-way ANOVA, followed by Tukey's Multiple Comparison post hoc test, when appropriate, and were presented as mean ± standard error of

mean (SEM). A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant for all analyses.

## RESULTS

### Chelating activity, scavenging activity, and FRAP assay

Antioxidant activities of the extracts studied and ascorbic acid, used as positive control, as a function of their concentrations, were verified (see Figure 1). Both extracts showed a similar ferrous chelating activity. However, *Syzygium jambos* extract exhibited greater  $H_2O_2$  scavenging activity and stronger reduction power (as FRAP assay) than *Solanum guaraniticum*. Ascorbic acid presented lower chelating and  $H_2O_2$  scavenging activities and higher reducing power than both extracts.

### Inhibition of erythrocyte $\delta$ -ALA-D activity by extracts

All concentrations tested of *Solanum guaraniticum* leaf extract (50-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) were capable of inhibiting erythrocyte  $\delta$ -ALA-D activity ( $p < 0.05$ ). In relation to *Syzygium jambos* extract, the highest concentrations tested (250, 500, and 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) also caused an inhibition on  $\delta$ -ALA-D activity (see Figure 2).

As can be seen on Table 1, no concentrations of leaf extract of *Solanum guaraniticum* or *Syzygium jambos* presented DTT reactivation index (R% DTT) different from controls. Furthermore, all concentrations tested from both extracts showed increased reactivation index when  $ZnCl_2$  was added (R% Zn) compared with controls.

### Protective effects of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts against $H_2O_2$ -induced oxidative stress

When erythrocyte samples were exposed to 1000  $\mu\text{g/mL}$  of *Solanum guaraniticum* or *Syzygium jambos* extracts, we did not observe an increase in TBARS level, suggesting that the extracts were not able to induce lipid peroxidation by themselves (data not shown). However, in the presence of  $H_2O_2$ , *Solanum guaraniticum* extract was able to protect cells from  $H_2O_2$ -induced lipid peroxidation at concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$ , whereas *Syzygium jambos* extract was effective at all concentrations tested (100-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) (see Figure 3A).

In relation to erythrocytes of the non-protein sulfhydryl groups (NP-SH), none of the extracts was able to prevent the reduction caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. Meanwhile, unexpectedly, the highest concentration of *Syzygium jambos* extract was capable of reducing the level of NP-SH by itself (see Figure 3B). After investigating this action, we noted that the other concentrations tested (50-1000 µg/mL) of this extract also presented this effect. On the other hand, the NP-SH levels of erythrocytes were not affected by any concentration of *Solanum guaraniticum* extract alone (see Figure 3C).

### Anti-hemolytic effect

When the suspensions of erythrocytes were incubated with 50 mM AAPH, 86.00 ± 4.55% of erythrocytes were hemolysed. The percentage of hemolysis decreased when the suspensions were treated with extracts, whereas *Syzygium jambos* leaf extract was more effective than *Solanum guaraniticum*. At 100 µg/mL and 250 µg/mL, *Syzygium jambos* extract reduced 96.34% and 91.66% of AAPH-induced hemolysis, respectively, whereas *Solanum guaraniticum* extract promoted 82.75% and 72.19% of hemolysis reduction at 500 µg/mL and 1000 µg/mL, respectively. There was no significant difference between different concentrations of the same extract (see Figure 4) and, when the cells were incubated with each extract alone, the hemolysis was maintained at a similar level to the control samples (data not shown).

Furthermore, Figure 5 shows the osmotic fragility profiles of erythrocytes treated with AAPH or AAPH plus extracts. It can be seen clearly that AAPH shifts the osmotic fragility curve, decreasing membrane osmotic resistance against hypotonic pressure, and the pre-incubation of erythrocytes with extracts prevents this effect. The Mean Corpuscular Fragility Index of AAPH-treated cells (132 mM NaCl) was moderately diminished by the exposure of erythrocytes to *Solanum guaraniticum* extract (500 µg/mL = 84 mM and 1000 µg/mL = 107 mM NaCl) and, more markedly, by the *Syzygium jambos* extract (100 µg/mL = 66 mM and 250 µg/mL = 68 mM NaCl).



## DISCUSSION

In this report, the inhibitory effect of both extracts studied on  $\delta$ -ALA-D activity can be an indicative of their possible harmful properties. The inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity has been used to evaluate toxic effects of synthetic compounds<sup>28, 29</sup> and that might be applied to natural compounds. In particular, *Solanum guaraniticum* extract presented this effect even at the lower concentrations tested. It is well known that some alkaloids commonly found in Solanaceae may have toxic effects and this specie, under the name *S. fastigiatum*, already was related to hepatotoxicity and cattle intoxications<sup>30, 31</sup>.

The oxidation of essential sulfhydryl groups of the active site of the enzyme does not appears to be involved, because DTT was ineffective in counteracting  $\delta$ -ALA-D inhibition caused by the extracts. Meanwhile, the differences found in R% Zn among erythrocytes exposed to extracts and control erythrocytes may suggest a possible involvement of the zinc ion of the  $\delta$ -ALA-D structure in the inhibition of the enzyme activity. Furthermore, both extracts presented considerable iron chelating activity, and considering that this effect can be applied to other metallic ions, a zinc chelating activity of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* extracts may also be involved in  $\delta$ -ALA-D inhibition.

We have also demonstrated that the extracts studied can protect membrane integrity, providing complementary evidence of their antioxidant potency. The extracts improved the fragility of erythrocyte exposure to AAPH and stabilized erythrocyte membrane structures. The high content of phenolic compounds of the extracts already was described in a previous study of our workgroup<sup>32</sup> and might be responsible for this property. Other studies have shown a protective interaction of flavonoids with lipid bilayers increasing membrane fluidity<sup>33</sup>. Moreover, besides a probable interaction with erythrocyte membranes, the capacity of the extracts to prevent access of free radicals to the bilayer by trapping radicals should also be considered.

Additionally, this property of *Syzygium jambos* extract could be related to its beneficial effects on traditional use because diabetes patients with hyperglycemia can disturb the hemorheology, and erythrocyte deformability is an important factor in the cause of organ damage in diabetes<sup>34</sup>. Similarly, the folk use of *Solanum guaraniticum* leaves to treat anemia may be associated with its anti-hemolytic and

membrane stabilizing effect, as disease processes or oxidative stress may act by destabilizing the lipid bilayer of the erythrocyte and by decreasing its deformability in ways that accelerate the removal of red cells from the circulation, shortening their life span and contributing to anemia <sup>35</sup>.

In addition, the antioxidant activity of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* extracts and their possible mechanisms of action were also investigated. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity and iron chelating capacity were mechanisms by which extracts can exert their antioxidant effects <sup>36, 37</sup>. The results of the FRAP assay reveal that polyphenolic compounds of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts may act as electron donors that are capable of neutralizing free radicals by converting them to more stable products and terminating the free radical chain reaction <sup>38</sup>.

The inhibitory effect of both extracts on erythrocyte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lipid peroxidation was demonstrated. The scavenging capacity of *Syzygium jambos* extract and its ability to inhibit lipid peroxidation processes may be related to its bioactive properties involved in its traditional use to the treatment of diabetes, since it is well known that diabetic patients have an enhanced level of oxidative damage <sup>14</sup>. Likewise, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is also involved in inflammation and gastric mucosal damage <sup>38</sup>, thus, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging ability of *Solanum guaraniticum* leaf extract may also be related to its indication to treat liver and gastric dysfunctions.

Interestingly, all concentrations of the *Syzygium jambos* extract promoted a decrease in the NP-SH levels of extract-treated erythrocytes. Previous studies have been suggested that phenoxyl radicals, which are oxidation products of dietary polyphenols, are capable of presenting prooxidant *in vitro* activity <sup>39</sup>, but are unlikely to cause problems *in vivo* due to the concentration range of bioactive compounds found in their diet. We cannot rule out that the prooxidant effects of *Syzygium jambos* extract may also have affected δ-ALA-D activity due to the sulfhydryl nature of the enzyme and may have modified the enzyme conformation in such a way that DTT could not restore the enzymatic activity.

Another point that needs to be highlighted is the fact that the effective doses of *Syzygium jambos* extract (in relation to its antioxidant activities, anti-lipid peroxidation, anti-hemolytic, and membrane stabilizing effect) are lower than those that promote δ-ALA-D inhibition, consistently with the absence of reports about toxic reactions involving this specie. However, data presented on this study warn on the

need to investigate the safe daily or chronic doses prior to its suggestion as a phytotherapeutic.

## **CONCLUSIONS**

In summary, one of the most important and novel findings of this study is the effect of the extracts studied on the  $\delta$ -ALA-D activity, especially the fact that the extract of *Solanum guaraniticum* was a more potent inhibitor of  $\delta$ -ALA-D activity than *Syzygium jambos*, suggesting that this enzyme is an interesting tool to assess harmful properties of vegetal extracts. Furthermore, the results obtained in this study indicated that both extracts bear potent antioxidant property and should have prospective clinical use as a preventive medicine against oxidative stress-related diseases after further elucidation regarding their toxicological properties.

## **Acknowledgments**

The authors acknowledge the offer of doctoral fellowship to Gabriela Bonfanti by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil as well as Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for support in this study.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

1. Shiva Shankar Reddy CS, Subramanyam MV, Vani R, Asha Devi S. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicol In Vitro*. 2007; 21: 1355-64.
2. Gradinski-Vrbanac B, Stojevic Z, Milinkovic-Tur S, Balenovic T, Pirslijin J, Zdelar-Tuk M. *In vitro* susceptibility of ducks, chicken and pig erythrocyte lipids to peroxidation. *Vet Med Czech*. 2002; 47: 303–308
3. Adesanoye OA, Molehin OR, Delima AA, Adefegha AS, Farombi EO. Modulatory effect of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* (MEVA) on tert-butyl hydroperoxide–induced erythrocyte haemolysis. *Cell Biochem Funct*. 2013; 31: 545–550.
4. Jaffe EK, Ali S, Mitchell LW, Taylor KM, Volin M, Markham GD. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochemistry*. 1995; 34: 244–251.
5. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: 317-325.
6. Suboh SM, Bilto YY, Aburjai TA. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother Res*. 2004; 18: 280–284.
7. Costa OA. Jurubeba. *Rev Bras Farm*. 1940; 21: 404-416.
8. Corrêa M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, III. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Brasil; 1984.
9. Slowing K, Carretero E, Villar A. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. *J Ethnopharmacol*. 1994; 43, 9-11.
10. Slowing K, Carretero E, Villar A. Anti-inflammatory compounds of *Eugenia jambos*. *Phytother Res*. 1996; 10: 8126–8127.
11. Teixeira CC et al. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *J Ethnopharmacol*. 2000; 71: 343-347.
12. Shemin, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1976; 273: 109–115.

13. Nogueira, CW, Soares FA, Nascimento PC, Muller D, Rocha JBT. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of d-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology*. 2003; 184: 85–95.
14. Bonfanti G et al.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress. *Clin Biochem*. 2011; 44: 1105-1109.
15. Santos FW, Rocha JBT, Nogueira CW. 2,3-Dimercaptopropanol, 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase lead-induced inhibition of d-aminolevulinic acid dehydratase in vitro and ex vivo. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20: 317–323.
16. Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJM. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol*. 1992; 72: 226–230.
17. Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*. 1990; 38: 674–677.
18. Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 1989; 10: 1003-1008.
19. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239: 70-76.
20. Berlin K, Schaller H. European standardized method for the determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 1974; 12: 389–90.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95: 351-358.
22. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959; 82: 70-77.
23. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977; 83: 346-356.
24. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*, 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995.

25. Oladele SB, Ogundipe S, Ayo JO, Esievo KAN. Seasonal and species variations in erythrocyte osmotic fragility of indigenous poultry species in Zaria. Northern Guinea Savannah zone of Nigeria. *Bul Animal Health Prod in Africa*. 2003; 51: 204–214.
26. Oyewale JO. Effects of storage of blood on the osmotic fragility of mammalian erythrocyte. *J Vet Med*. 1993; 40: 258–264.
27. Chikezie PC, Uwakwe AA. Membrane stability of sickle erythrocytes incubated in extracts of three medicinal plants: *Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, and *Terminalia catappa*. *Pharmacogn Mag*. 2011; 7: 121-125.
28. Borges VC, Dadalt G, Savegnago L, Moro AV, Rocha JBT, Nogueira CW. 1,1,2-Tris-organoselenide alkene derivatives, but not 1,2-bis-organoselenide alkene derivatives, inhibited d-aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicol in Vitro*. 2007; 21: 387–39.
29. Souza AC, Luchese C, Santos Neto JS, Nogueira CW. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. *Life Sci*. 2009; 84: 351–357.
30. Rech RR et al. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. *Pesq Vet Bras*. 2006; 26: 183-189.
31. Sabir SM, Rocha JB. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false "Jurubeba") against paracetamol-induced liver damage in mice. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120: 226-32.
32. Bonfanti G et al. *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* show similar antioxidant properties but induce different enzymatic activities in the brain of rats. *Molecules*. 2013; 18: 9179-94.
33. Martínez V, Ugartondo V, Vinardell MP, Torres JL, Mitjans M. Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 4090–4095.
34. Shin S, Ku Y, Babu N, Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J Exp Biol*. 2007; 45: 121–128.
35. Christopher MM. Of human loss and erythrocyte survival: uremia and anemia in chronic kidney disease. *Israel J Vet Med*. 2008; 63: 1.

36. Bahramikia S, Yazdanparast R. Antioxidant Efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various in vitro assay systems. *J Acupunct Meridian Stud.* 2010; 3: 283–290.
37. Ramful D, Tarnus E, Rondeau P, Da Silva CR, Bahorun T, Bourdon E. Citrus fruit extracts reduce advanced glycation end products (AGEs) – and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human adipocytes. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 11119-11129.
38. Maity P, Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. The use of neem for controlling gastric hyperacidity and ulcer. *Phytother Res.* 2009; 23: 747–755.
39. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 2002; 177: 91–104.

**Table 1:** Effect of DTT or Zn on  $\delta$ -ALA-D inhibition caused by *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts.

	<i>Syzygium jambos</i>		<i>Solanum guaraniticum</i>	
	R% DTT	R% Zn	R% DTT	R% Zn
<b>Control</b>	78.89 $\pm$ 2.65	65.78 $\pm$ 2.19	84.52 $\pm$ 1.50	63.41 $\pm$ 3.68
<b>50 <math>\mu</math>g/mL</b>	79.30 $\pm$ 2.34	73.73 $\pm$ 1.48*	82.17 $\pm$ 3.46	87.95 $\pm$ 0.97 ***
<b>100 <math>\mu</math>g/mL</b>	80.52 $\pm$ 1.64	84.12 $\pm$ 2.04***	83.01 $\pm$ 3.79	89.46 $\pm$ 1.16 ***
<b>250 <math>\mu</math>g/mL</b>	75.70 $\pm$ 5.97	92.59 $\pm$ 0.80***	75.14 $\pm$ 3.64	90.02 $\pm$ 1.68 ***
<b>500 <math>\mu</math>g/mL</b>	73.45 $\pm$ 4.28	94.06 $\pm$ 0.87***	73.75 $\pm$ 5.91	86.48 $\pm$ 1.82 ***
<b>1000 <math>\mu</math>g/mL</b>	72.07 $\pm$ 5.27	83.82 $\pm$ 2.19***	69.96 $\pm$ 6.46	77.16 $\pm$ 3.14 **

**Legend:** R% DTT = dithiothreitol reactivation index; R% Zn = Zinc reactivation index.  
 \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  different from control erythrocytes (incubated with PBS only). Data were analyzed by ANOVA followed Tukey's Multiple Comparison post hoc test (n=10).



## LEGENDS FOR FIGURES

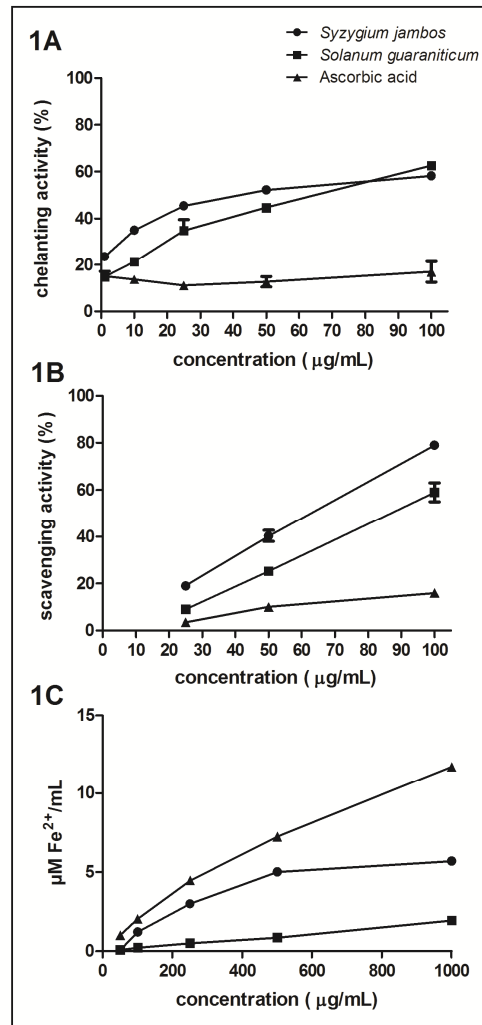


Figure 1: (A) Iron chelating effect, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity and (C) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of leaf extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* and Ascorbic acid as a function of their concentrations. Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 3.

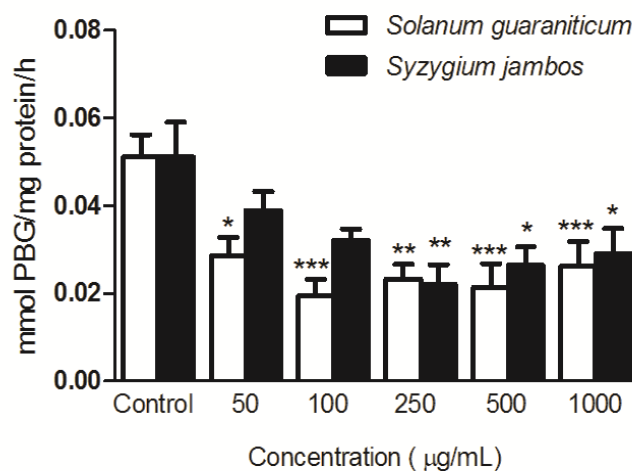


Figure 2. Effect of leaf extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on erythrocyte  $\delta$ -ALA-D activity. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  different from control erythrocytes (0  $\mu\text{g/mL}$  extracts). Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison post hoc test ( $n=10$ ).

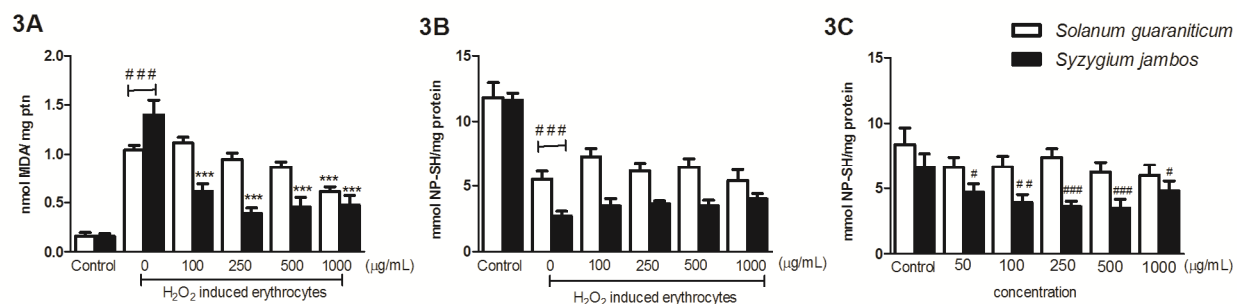


Figure 3. Effect of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* extract on  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced TBARS level (3A) and on NP-SH content of  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced (3B) or non-induced (3C) erythrocytes. ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  different from control erythrocytes (incubated with PBS only). \*\*\* $p < 0.001$  different from 20mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -exposure erythrocytes (0  $\mu\text{g/mL}$  extracts). Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison post hoc test ( $n=10$ ).

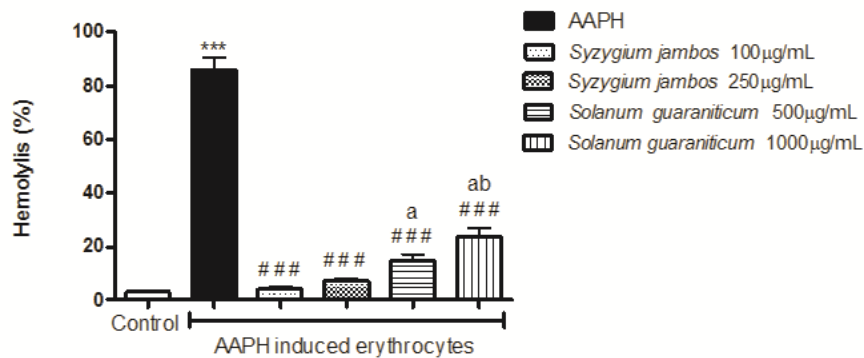


Figure 4: Protective effect of leaf extracts of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* on AAPH-induced hemolysis. \*\*\* $p < 0.001$ , different from control erythrocytes (incubated with PBS only); ### $p < 0.001$ , different from AAPH-exposed erythrocytes (incubated with 50 mM AAPH); a = different from *Syzygium jambos* 100 µg/mL ( $p < 0.05$ ); b = different from *Syzygium jambos* 250 µg/mL ( $p < 0.05$ ). Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison post hoc test ( $n = 10$ ).

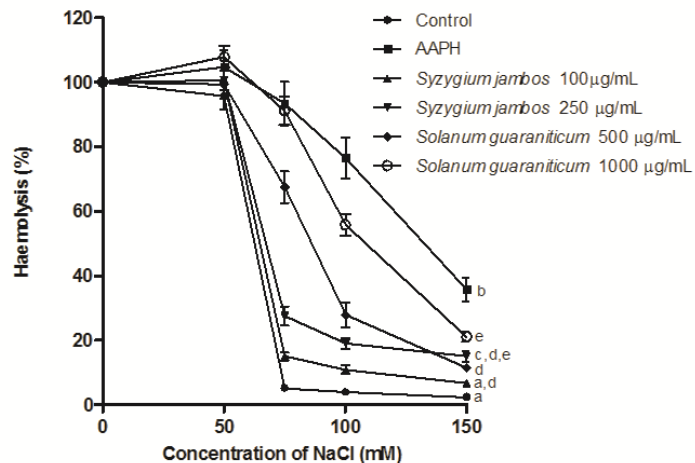


Figure 5. Alteration of osmotic fragility in erythrocytes treated with AAPH or AAPH plus extracts. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ . Means values at 150 mM with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison post hoc test.

4.2 Assessment of cytotoxic effects on spleen lymphocytes and *Artemia salina* lethality test of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Phytotherapy Research*

#### 4.2 Assessment of cytotoxic effects on spleen lymphocytes and *Artemia salina* lethality test of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts

Gabriela Bonfanti<sup>a</sup>, Karine S. De Bona<sup>a</sup> Paula Eliete Rodrigues Bitencourt<sup>b</sup>, Lariane Cargnelutti<sup>b</sup>, Thainan Paz da Silva<sup>b</sup>, Mayara L. De Freitas<sup>a</sup>, Ricardo Brandão<sup>b</sup>, Aline A. Boligon<sup>b</sup>, Margareth L. Athayde<sup>b</sup>, Aline S. Pigatto<sup>c</sup>, Thissiane L. Gonçalves<sup>a</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre, Federal University of Santa Maria (UFSM)

<sup>c</sup> Franciscan University Center (UNIFRA), 97010-032 - Santa Maria, RS, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Maria Beatriz Moretto

beatriz@smail.ufsm.br

Av. Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS-Brasil.

CEP: 97105-900

Prédio 26 – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Fax: +55 55 3220 8018.

## Abstract

*Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaves are used as medicinal mainly to treat diabetes and gastric or liver diseases, respectively, even though their pharmacological and toxicological properties are unsubstantiated by scientific studies. Hence, this study aimed to investigate the toxicity of the leaf extracts of these vegetal species through *Artemia salina* lethality test and cytotoxicity evaluations in rat spleen lymphocytes, as such as methyl tetrazolium (MTT), neutral red uptake, trypan blue dye exclusion and lactate dehydrogenase (LDH) leakage assays, beyond their effects on lymphocytic AChE activity, *in vitro*. The median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) calculated on *A. salina* bioassay demonstrated that both extract are biologically active and might be toxic. Furthermore, *Solanum guaraniticum* extract presented cytotoxic effects against lymphocytes, starting from the concentration of 250 µg/mL, as demonstrated by the reduction of viable cells count and neutral red uptake, as well as the increase in LDH leakage. In contrast, *Syzygium jambos* extract (50-1000 µg/mL) seems to increase mitochondrial activity of lymphocytes, as shown in MTT assay, in addition to inhibit AChE at 1000 µg/mL, suggesting an immunomodulatory property. These results demonstrated that the use of medicinal preparations of both vegetal species studied needs to be monitored closely because of their potential toxic effects.

Keywords: cytotoxicity, spleen lymphocytes, *Syzygium jambos*, *Solanum guaraniticum*, medicinal plants

## 1 Introduction

Herbal medicines have received great interest as an alternative to clinical therapy. They offer a potential natural health care approach that focuses on protecting and restoring health. However, the increase in the number of users as opposed to the scarcity of scientific evidences on the safety of medicinal plants, have raised concerns regarding the toxicity and detrimental effects of these remedies (Pour, Latha, Sasidharan, 2011).

In Brazil, medicinal plants are extensively used in rural and urban areas, but little is known or recorded about the popular healing culture (Gurib-Fakim, 2006). Some examples are *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae) and *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil (Solanaceae), which are recognized vegetal species used as medicinal. The first one is known by the Brazilian population as “jambolão” and has its leaves used mainly to the treatment of diabetes (Teixeira et al., 2000), while its anti-inflammatory and digestive properties are also explored in folk medicine of other countries (Slowing, Carretero, Villar, 1994). The second specie mentioned above, *Solanum guaraniticum*, is known by the common name “falsa-jurubeba” and used to treat liver and gastric dysfunctions and anemia (Costa, 1940, Penna, 1964). One common problem regarding the medicinal use of these plants is the mistaken identity of these species and their use in replacement to *Syzygium cumini* and *Solanum paniculatum*, which already have their therapeutic properties more elucidated. Therefore, the safe use of medicinal preparations of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* in folk medicine is unsubstantiated by scientific studies.

In this sense, toxicity screening models provide important preliminary data to help select natural remedies with potential health beneficial properties for future work (Pour, Latha, Sasidharan, 2011) and *in vitro* cytotoxicity assays are widely used for this purpose. The neutral red uptake (NRU), trypan blue dye exclusion, 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) leakage assays are the most common employed for the detection of cytotoxicity or other negative effects on cell viability following exposure to toxic substances (Fotakis, Timbrell, 2006; Dhamija et al., 2013). The loss of intracellular LDH and its release into the medium is an indicator of cell membrane damage; NRU assay measure the uptake of the dye by functional lysosomes; the trypan blue dye exclusion assay is based on the ability of live cells to exclude the

vital dye Trypan blue; and MTT assays is mainly based on the enzymatic conversion of MTT in the mitochondria (Fotakis, Timbrell, 2006; Charoenpornsook, Fitzpatrick, Smith, 1998; Minervini, Fornelli, Flynn, 2004). In general, in order to increase the reliability of the results obtained and to avoid overestimation or underestimation of the toxicity level, more than one assay should be used to determine cell viability in *in vitro* studies.

Other alternative test to determine toxicity of chemical and natural products is based on the lethality of *Artemia salina* L. (Artemiidae), the brine shrimp, that is an invertebrate component of the fauna of saline aquatic and marine ecosystems and has been employed in a simple screening method to investigate the cytotoxicity of plant extracts (Agrios, 2005). Considering the current tendency for substituting the use of laboratory animals in toxicological evaluations, the *A. salina* lethality test is used in order to determine toxicity through the estimation of the medium lethal concentration (LC<sub>50</sub> values) (Lewan, Andersson, Morales-Gomez, 1992), which has been reported for a series of toxins and plant extracts (Meyer et al., 1982).

Also, acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7, AChE) plays an essential role in physiological events involving the turnover of acetylcholine in the central nervous system. Beyond that, this enzyme also has been accepted as having roles in non-neuronal tissues including regulation of the immune function (Anglister et al., 2008, Kawashima, Fujii, 2003). Interestingly, several studies have demonstrated that natural substances and dietary components can affect the AChE activity in different tissues suggesting that they can modulated its action (Ahmed, Gilani, 2009; Schmatz et al., 2009).

Hence, the current study has been undertaken to investigate the toxicity of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts through *Artemia salina* lethality test and cytotoxicity evaluations in rat spleen lymphocytes, *in vitro*. Moreover, the effects of the extracts on AChE activity in these cells also were assessed.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Materials**



5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT), trypan blue, neutral red, catechin, epicatechin, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and rutin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile and phosphoric, gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

## 2.2 Plant material and preparation of extracts

Leaves of *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* were collected in the cities of Santa Maria and Tupanciretã, respectively. A voucher specimen was identified and deposited at the herbarium of Federal University of Santa Maria. The leaves were dried in a greenhouse, smashed in the knife mill and submitted to extraction with ethanol 80% in a Soxhlet apparatus until exhaustion. After extraction, the solvent was evaporated by a rotavapor, supplying the crude extract.

## 2.3 High-performance liquid chromatography (HPLC) characterization of the extracts

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C18 column (4.6 mm × 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phases were the mobile phase was: (A) acetonitrile: water (95:5, v/v) and (B) water: phosphoric acid (98:2, v/v), and the composition gradient was: 5% of A until 10 min and changed to obtain 20%, 40%, 60%, 70% and 100% A at 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume 40 µl and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for chlorogenic, ellagic and caffeic acids, and 365 nm for rutin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and quercetin. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention times with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm).

## 2.4 Animals and preparation of spleen lymphocytes

Male adult albino Wistar rats (200-250g) were maintained at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , on a 12h light:dark cycle and tap water and standard pellet diet were provided *ad libitum*.

The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil (Process number 23081.009003/2012-01) and all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

The rats were euthanized and the spleen was aseptically removed. Then lymphocytes were isolated from the spleen under aseptic conditions as described by Sai Ram et al (1997). Briefly, spleens were taken out, washed with cold phosphate buffered saline (PBS), cut into several pieces and gently crushed in PBS. Subsequently, cells were collected by centrifugation. Erythrocytes were lysed with erythrocytes lysis buffer (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and cells were finally washed and resuspended in PBS. The cell count was adjusted to contain  $3 \times 10^6$  cells/ml by trypan blue exclusion.

#### 2.4.1 Spleen lymphocytes treatments and cell viability assays

In order to evaluate if *Solanum guaraniticum* and *Syzygium jambos* had an effect on the viability of spleen lymphocytes, extracts in different dilutions were added to the suspensions of cells at final concentrations of 100, 250, 500, 750 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Then, lymphocytes exposed with extracts were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h.

After the incubation time several assays were done to evaluate different cell viability parameters. Treated cells were used to MTT assay (Mosmann, 1983), neutral red uptake test (NRU) (Borenfreund, Puerner, 1984) and trypan blue dye exclusion test (Mischell, Siingi, 1980). Furthermore, the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) leakage from cells was performed by determining the activity of LDH in the supernatant using a commercially kit (LABTEST, MG, Brazil). The results of MTT, NRU and LDH tests are presented as percentage of control whereas the results of trypan blue dye exclusion test are presented as number of live cells.

#### 2.4.2 Acetylcholinesterase activity assay

After the treatment of the lymphocytes, AChE activity was determined according to the method described by Ellman et al (1961) modified by Fitzgerald, Costa (1993). 0.1 mL of intact cells were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine, 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), and 0.1 M phosphate

buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 min at 27°C the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. The results are expressed as  $\mu\text{mol AcSch/h/mg protein}$ .

## 2.5 *Artemia salina* lethality test

Different concentrations of the extract dilutions in distilled water were evaluated for *Artemia salina* (brine shrimp larvae) lethality as the procedure described by Meyer et al. (1982). Briefly, dried shrimp eggs were obtained in saline medium (35 g of sea salt, pH 8.0), under controlled conditions of aeration and lighting. After 24 h of hatching, the larvae (10 per vial) were transferred to 10 ml vials containing the extract dilutions and saline solution. The number of survivors was counted after 24 h and 48 h of incubation and the percentage of death were calculated. The assay was performed using three triplicates of each concentration. The number of dead larvae was recorded and used to calculate the 50% lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) by trimmed Spearman-Kärber, the conventional Spearman-Kärber method described by Finney (1971). Extracts was considered bioactive if the  $\text{LC}_{50}$  was less than 1 mg/mL (Meyer et al., 1982).

## 2.6 Statistical Analysis

In *Artemia salina* test, the lethal concentration fifty ( $\text{LC}_{50}$ ) and 95% confidence interval were determined from the 24 h and 48 h counts using the Finney (1971) computer programme. All other analyzes were performed using STATISTICA for Windows, version 6.0 (StatSoft. Inc. Tulsa, OK, USA). All data were analyzed using one way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test and presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant for all analyses.

# 3 Results

## 3.1 Pytochemical screening of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts

HPLC fingerprinting revealed the presence of gallic, chlorogenic and ellagic acids, catechin, epicatechin, rutin, quercitrin, isoquercitrin, quercetin and kaempferol in both extracts and the percentage of each compound is shown in Figure 1. Furthermore, considering the chromatographic conditions used, caffeic acid was only detected in the *Syzygium jambos* extract.

### 3.2 Viability tests

After the incubation period, cell suspensions treated with *Solanum guaraniticum* ranging from 250 – 1000 µg/mL presented the number of live cells significantly lower than untreated cells, as demonstrated by trypan blue dye exclusion test. Furthermore, starting from the concentration of 500 µg/mL this extract also seems to be able to affect the membrane of cells tested, as can be observed in NRU and LDH leakage tests. However, any alteration was detected by MTT assay.

Regarding *Syzygium jambos* extract, the viability assays NRU, trypan blue dye exclusion and LDH leakage did not showed cytotoxic effects at any concentrations tested. In contrast, MTT assay indicated higher mitochondrial activity on cells treated with this extract.

All these results are presented at figure 2, which shows the dose response curve for all assays.

### 3.3 Acetylcholinesterase (AChE) activity

After the treatment period, *Syzygium jambos* extract at 1000 µg/mL, decreased AChE activity of spleen lymphocytes. However this effect was not observed with any concentration of *Solanum guaraniticum* extract (Figure 3).

### 3.4 *Artemia salina* lethality test

The results on *A. salina* assay indicate that both extracts had LC<sub>50</sub> values less than 1.000 µg/mL indicating that they are biologically active and might be toxic to humans (Table 1). The mortality rates of *A. salina* were proportional to increase of extracts concentrations, which provide linearity in the dose-effect relationship of each extract and in determination of the LC<sub>50</sub> value (data not shown). *Syzygium jambos*

presented a  $LC_{50} = 362.70 \mu\text{g/ml}$  when the *A. salina* were exposed for 24 hours to different concentrations of the extract. The toxicity of this extracts was not time-dependent since a longer exposure time (48 hours) presented a similar  $LC_{50}$  value ( $LC_{50} = 391.02$ ).

However, the results obtained with *Solanum guaraniticum* extract showed a  $LC_{50} = 557.04 \mu\text{g/ml}$  when the *A. salina* were exposed for 24 hours to different concentrations of the extract and a  $LC_{50} = 113.31 \mu\text{g/ml}$  when 48h was the time of exposure. This suggests that the toxicity of *Solanum guaraniticum* could increase considerable with the time of exposure.

#### 4 Discussion

The evaluation of the toxic action of plant extracts is indispensable in order to consider a treatment safe. In assessing the toxicity of plant extracts by *A. salina* bioassay, an  $LC_{50}$  value lower than  $1.000 \mu\text{g/ml}$  is consider bioactive (Meyer et al. 1982). Both extracts tested in this paper presented this feature; therefore, they can be considered biologically active and might be toxic to humans. Furthermore, *Syzygium jambos* seems to present its bioactive effects more quickly since  $LC_{50}$  of 24h of *A. salina* exposure was lower than *Solanum guaraniticum*. However, with the increase of time of exposure (48h) *Solanum guaraniticum* demonstrated  $LC_{50}$  values much lower suggesting that it could be more toxic against *A. salina* than *Syzygium jambos* at this time.

Furthermore, *A. salina* test is useful for the screening of plant extracts in order to predict their lethality. Previous studies (Logarto et al., 2011) already demonstrated that there is a good correlation ( $r = 0.85$ ;  $p < 0.05$ ) between the  $LC_{50}$  of the *A. salina* assay and the  $LD_{50}$  of the acute oral toxicity assay in mice. Based on this correlation result, a value of  $LC_{50} > 25 \mu\text{g/ml}$  in *A. salina* test corresponds to a  $LD_{50}$  value *in vivo* between 2.500 and 8.000 mg/kg. Therefore, we can assume that the  $LD_{50}$  of *in vivo* oral acute toxicity for *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts may be more than 2.500 mg/kg.

The  $LC_{50}$  values (48h) of *Syzygium jambos* extract used in this study are similarly at those already founded for its methanolic leaf extracts (Mohanty, Cock, 2010). Interestingly,  $LC_{50}$  of 24 h of *Solanum guaraniticum* was lower than  $LC_{50}$  of *Solanum paniculatum* already described ( $953.9 \mu\text{g/mL}$ ) suggesting that this plant

may be more toxic than *S. paniculatum* (Silva et al., 2007) and this is of particular importance since these plants are frequently used without distinction.

Moreover, *Solanum guaraniticum* extracts presented different results on viability tests, indicating cytotoxic effects. These results can be explained by the nature of the each assay indicating intracellular effects before a cell membrane damage occurred since the reduction in neutral red uptake and live cells count by trypan blue was observed at lower extract concentration than the increase on LDH leakage. Also, the extract didn't affect mitochondrial activity in the incubation time used in our experiments.

In contrast, *Syzygium jambos* seems to have presented a stimulatory effect on treated cells since increased MTT viability and it was reported that MTT assay could be used to monitor cell activation and to determine mitochondrial activity (Denis gerlier). However, none of the other viability assays used in this study suggest cell damage after the incubation with *Syzygium jambos* extract.

Another interesting result was the inhibitory effect of *Syzygium jambos* extract on AChE activity of spleen lymphocytes. The function of the AChE in lymphoid tissue is to regulate the amount of ACh at the neighborhood of lymphoid cells according to immunologic demands (Nieto-Cerón et al., 2004). In this context, AChE emerges as a potential contributor to the pathway controlling inflammatory and immune response in the blood. In fact, it has been demonstrated that inhibitors of the AChE reduce lymphocyte proliferation and the secretion of pro-inflammatory cytokines and may attenuate inflammation by increasing the acetylcholine concentration in the extracellular space (Nizri, Hamra-Amitay, 2006). In line with this, the results present on this paper open doors to immunomodulatory and possible antiinflammatory properties of *Syzygium jambos* extract.

With another point of view, McLaughlin, Rogers, Anderson (1998) have demonstrated that toxicity in the *A. salina* bioassay may indicate anticancer potential. Therefore, potentially toxic extracts such as *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* could also be tested as anticancer drugs. Particularly, the cytotoxic effects of *Solanum guaraniticum* extract demonstrated in this study merits further investigation against human cancer cell lines.

## 5 Conclusions

The present study shows the bioactivity of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts in the *A. salina* lethality test and calls attention to possible toxic effects regarding its medicinal preparations. Furthermore, *Solanum guaraniticum* presented cytotoxic effects and seems to have a profound effect on lysosomes and cell membranes without affecting mitochondria. On the other hand, *Syzygium jambos* extract seems to increase mitochondrial activity of lymphocytes in addition to inhibit AChE suggesting an immunomodulatory property of this vegetal specie. Taken together these results are important since there are scarce data available about this local species and any new studies represent a significant contribution to the knowledge of these plants.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the offer of doctoral fellowship to Gabriela Bonfanti by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil as well as Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for support in this study.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

## References

Agrios MA. *Plant Pathology*, Academic Press, New York, 2005.

Ahmed T, Gilani A. 2009. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 91:554–9.

Anglister L, Etlin A, Finkel E, Durrant A, Lev-Tov A. 2008. Cholinesterases in development and disease. *Chem Biol Interact.* 175:92-100.

Borenfreund E, Puerner J. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/ NR-90) .*J. Tissue Culture Meth.* 9: 7-9.

Charoenpornsook, K., Fitzpatrick, J.L., Smith, J.E., 1998. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mycopathologia.* 143: 105–111.

Costa, O.A., 1940. Jurubeba. *Revista brasileira de farmácia.* 21: 404-416.

Dhamija I., Kumar N, Manjula SN, Parihar V, Setty MM, Pai KSR. 2013. Preliminary evaluation of in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity of *Premna herbacea* Roxb in Ehrlich ascites carcinoma model and Dalton's lymphoma ascites model . *Exp Toxicol Pathol.* 65: 235– 242.

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

Finney DJ, 1971. *Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve.* Cambridge, at University Press, third Ed. Macmillan, New York.



Fotakis, G, Timbrell JA. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Letters*. 160: 171–177.

Fritzgerald BB, Costa LG. 1993. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol*. 20: 210–216

Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 27:1–93.

Kawashima K, Fujii T. 2003. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci*. 72:2101–9.

Lewan L, Andersson M, Morales-Gomez P. 1992. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Altern Lab Anim*. 20:297–301.

Logarto AP, Yhebra RS, Sardiñas G, Buela LI. 2011. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8: 395–400

McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J*. 32:513–24.

Meyer, BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.

Minervini, F., Fornelli, F., Flynn, K.M., 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol. In Vitro* 18: 21–28.

Mischell BB, Siingi SM. 1980. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: W.H. Freeman Company. 486 p.

Mohanty S., Cock IE. 2010. Bioactivity of *Syzygium jambos* methanolic extracts: Antibacterial activity and Toxicity. *Pharmacognosy Res.* 2: 4–9.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.

Nieto-Cerón S, Moral-Naranjo MT, Muñoz-Delgado E, Vidal CJ, Campoy FJ. 2004. Molecular properties of acetylcholinesterase in mouse spleen. *Neurochem Int.* 45: 129–139.

Penna, M., 1964. *Dicionario Brasileiro de Plantas Mediciniais.* Kosmos, Rio de Janeiro, Brazil.

Pour BM, Latha LY Sasidharan S. 2011. Cytotoxicity and Oral Acute Toxicity Studies of *Lantana camara* Leaf Extract . *Molecules.* 16: 3663-3674.

Sai Ram, M., Sharma, S.K., Ilavazhagan, G., Kumar, D., Selvamurthy, W., 1997. Immunomodulatory effects of NIM– 76, a volatile fraction fromneemoil. *J Ethnopharmacol.* 55: 133–139.

Schmatz R, Mazzanti C, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Correa M, et al. 2009. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 610:42–8.

Slowing, K., Carretero, E., Villar, A., 1994. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. *Journal of ethnopharmacology.* 43, 9-11.

Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, Agra MF, Camara CA. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Braz J Pharmacog.* 17: 35-38.

Teixeira, C.C., Rava, C.A., Mallman da Silva, P., Melchior, R., Argenta, R., Anselmi, F., Almeida, C.R., Fuchs, F.D., 2000. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *J Ethnopharmacol.* 71: 343-347.

**Tables:**Table 1. *Artemia salina* lethality test of plant extracts under study

	24 h		48 h	
	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	95% Confidence interval	LC <sub>50</sub> (µg /mL)	95% Confidence interval
<i>Syzygium jambos</i>	362.70	346.01 – 380.20	391.02	376.28 – 406.34
<i>Solanum guaraniticum</i>	557.04	458.23 – 677.16	113.31	53.37 – 240.55

Values are expressed as an average of triplicates.

## Figure captions

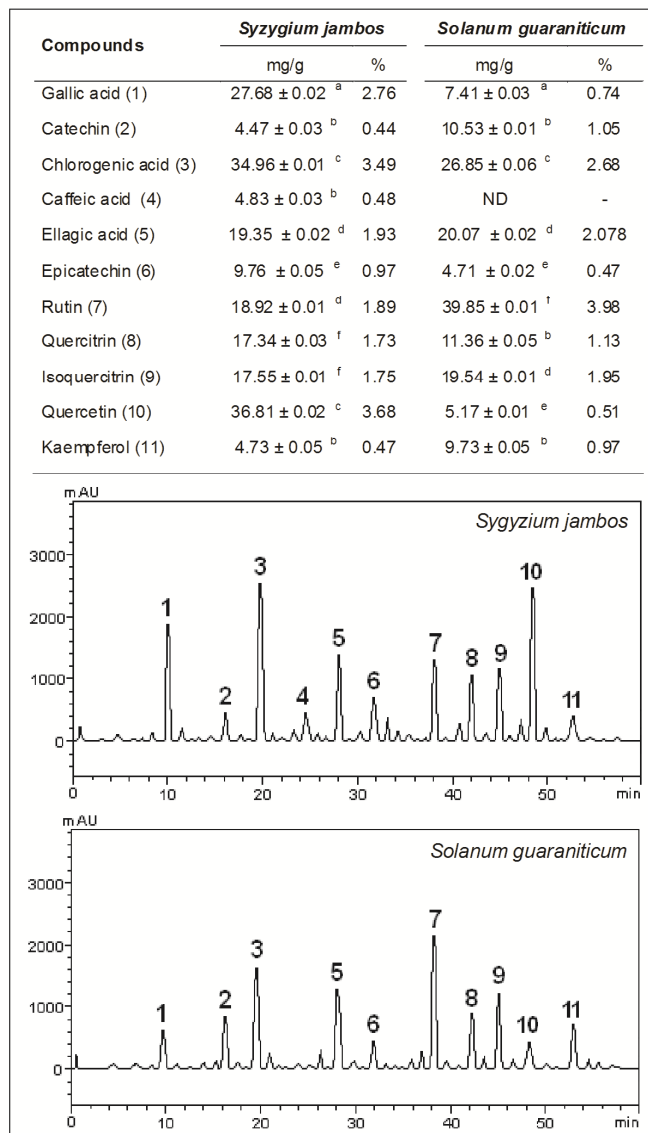


Figure 1. HPLC/DAD profile of extracts tested and quantification of phenolic compounds found. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), quercitrin (peak 8), isoquercitrin (peak 9), quercetin (peak 10) and kaempferol (peak 11). Quantification results are expressed as mean ± SEM ( $n = 3$ ) assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison *post hoc* test. Means marked with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). ND = not detected.

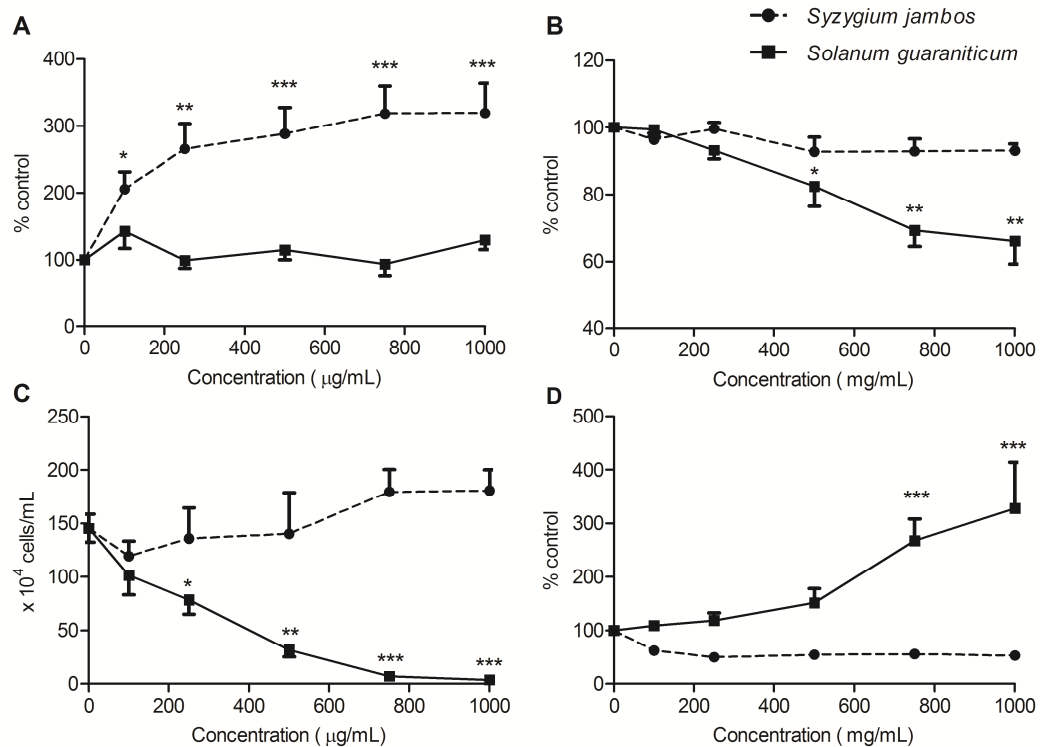


Figure 2. Viability tests of spleen lymphocytes treated with *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* extracts: MTT assay (A), neutral red uptake test (B), trypan blue dye exclusion test (C), LDH leakage (D). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison post hoc test. (\*), (\*\*) and (\*\*\*) denotes  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively, as compared to the respective control samples (without extracts).

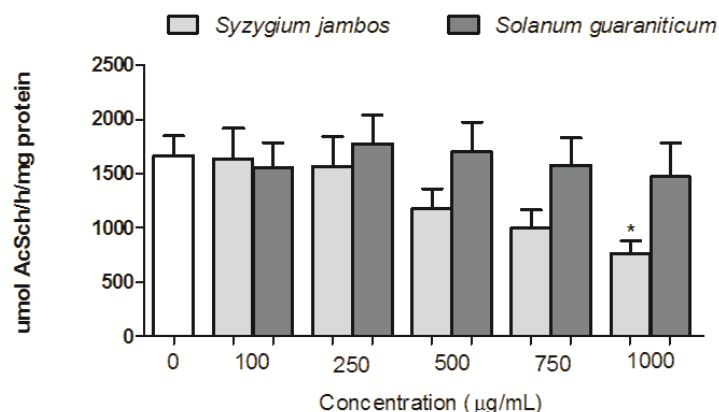


Figure 3. Effect of extracts tested on acetylcholinesterase activity of spleen lymphocytes. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) assessed by one way ANOVA followed by Duncan Multiple Comparison post hoc test. (\*) denotes  $p < 0.05$  as compared the control (without extracts).

#### **4.3 Safety assessment and behavioral effects of leaf extract of *Solanum guaraniticum* in rats**

Manuscrito submetido ao periódico: **International Journal of toxicology**

**Safety assessment and behavioral effects of leaf extract of *Solanum guaraniticum* in rats**

***Solanum guaraniticum*: behavioral effects in rats**

Gabriela Bonfanti<sup>a</sup>, Paula E. R. Bitencourt<sup>b</sup>, Karine S. De Bona<sup>a</sup>, Luis Ricardo Peroza<sup>c</sup>, Lariane O. Cargnelutti<sup>b</sup>, Raphaela M. Borges<sup>b</sup>, Aline S. Pigatto<sup>d</sup>, Roselei Fachinetto<sup>ac</sup>, Thissiane L. Gonçalves<sup>a</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>ab,\*</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Pharmacology, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre, UFSM

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Toxicological Biochemistry, Exact and Natural Sciences Center, UFSM

<sup>d</sup>Franciscan University Center (UNIFRA), 97010-032, Santa Maria, RS, Brazil.

**Email addresses:**

Gabriela Bonfanti: gabriela\_bonfanti@yahoo.com.br;

Paula Eliete Rodrigues Bitencourt: bitencourt.paula@yahoo.com.br;

Karine S. De Bona: ksbona@yahoo.com.br;

Luis Ricardo Peroza: luisricardoperoza@gmail.com;

Lariane Cargnelutti: larianecargnelutti@yahoo.com.br;

Raphaela Maleski Borges: raphaela.borgess@hotmail.com;

Aline S. Pigatto: alinepi@unifra.br;

Roselei Fachinetto: roseleifachinetto@yahoo.com.br;

Thissiane L. Gonçalves: thissianegoncalves@yahoo.com.br

**\*Corresponding author:**

Prédio 26 – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Av. Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

CEP: 97105-900

Fone/fax: +55 55 3220 8018.

Maria Beatriz Moretto

beatriz@smail.ufsm.br

### Abstract

*Solanum guaraniticum* is a medicinal plant traditionally used to treat gastric and liver diseases. However, there is no documented evidence corroborating its safety. The present study evaluated the potential toxicity of the leaf extract of *S. guaraniticum* after acute administration in rats. Single doses of the extract (1,250, 2,500 and 5,000 mg/kg) were administered by gavage and the rats were then monitored for 48 h or 14 days. Mortality, acute signs of toxicity and general activity in the open field test were assessed as well as hematological and biochemical parameters, enzymatic activities ( $\delta$ -aminolevulinate dehydratase, acetylcholinesterase and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) and oxidative stress parameters (lipid peroxidation level, non-protein thiol content, catalase activity of tissues and serum ferrous reducing power). The results showed that the administration of the extract produced no deaths ( $LD_{50} > 5,000$  mg/kg) or significant adverse effects on food consumption, body weight gain, gross pathology and in other parameters. However, open field tests showed a decrease in spontaneous general activity (crossing and rearing) mainly at 48 h after treatment. Therefore, our results suggest that *S. guaraniticum* extract is not acutely toxic but the changes observed in the general behavior of rats require further investigation.

**Keywords:** acute toxicity, leaf extract, medicinal plant safety, open field test, *Solanum guaraniticum*.



## INTRODUCTION

The consumption of medicinal plants has increased in recent years and this matter has received much attention since then. According to the World Health Organization between 70% and 90% of the world's population — primarily those of developing countries — rely on plant-derived medicines for their healthcare<sup>1</sup>. However, traditional plants used for the treatment of diseases need further scientific investigation on their toxic side effects<sup>2</sup>. Moreover, systematic studies on the toxicity and, especially, on the pharmacological action of these plants must be conducted in order to make this practice safe and appropriate<sup>3</sup>.

In this sense, the *Solanum* genus, which has approximately 1,400 species and is widely distributed throughout the world, has special importance in economy, agriculture and pharmaceutical sciences<sup>4</sup>. Of particular importance, *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil (syn. *S. fastigiatum*) is a shrub with flowering and fruiting throughout the year that presents broad and simple leaves, white flowers and globose fruits that are yellow when ripe<sup>5</sup>. This species occurs in Paraguay, Argentina and Brazil<sup>6</sup>, and it is popularly known as false-jurubeba. The tea from its leaves is used in the treatment of anemias, fevers, spleen and liver diseases and as a tonic and digestive stimulant<sup>7, 8</sup>. However, the Brazilian Pharmacopoeia describes only *S. paniculatum* L. as the true jurubeba<sup>9</sup> and the interchangeable use of these two species by folk medicine is common.

Some members of Solanaceae, which include tomatoes, potatoes and eggplants, are known to contain several types of steroidal glycoalkaloids<sup>10</sup> that are toxic to humans and animals<sup>11</sup>. In line with this, there is paucity of data on the pharmacological and toxicological properties of *S. guaraniticum*. Previous studies have demonstrated evidences of liver toxicity at high doses of its extract<sup>12</sup> and, under the name *S. fastigiatum*, this specie has been related to bovine intoxications affecting the central nervous system of the animals<sup>5, 13, 14</sup>.

The toxicity of medicinal plants occurs at several levels of biochemical systems and some metabolic enzymes could help on the identification of these impairments. In this context, the enzyme N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG; EC: 3.2.1.30), which is present at high concentrations in renal proximal tubular cells<sup>15</sup>, could be released into the cytosol as a result of lysosomal membrane damage, indicating kidney injury<sup>16</sup>. Furthermore, acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7)

plays a major role in the regulation of several physiological events<sup>17</sup>. The activity of the cholinergic system is vital to normal behavior and muscular function<sup>18</sup>. Therefore, the crucial role of this enzyme in neural transmission makes it a primary target of a large number of cholinesterase-inhibiting drugs and toxins<sup>19</sup>, making it a valuable diagnostic tool for verifying exposure to chemical agents<sup>20</sup>. Also, the heme pathway enzyme delta-aminolevulinatase dehydratase ( $\delta$ -ALA-D, EC 4.2.1.24) presents high sensitivity to pro-oxidant situations and impairment of metabolic processes and has been used to evaluate toxicity<sup>21, 22</sup>. Previous studies of our group already demonstrated an inhibitory effect of *S. guaraniticum* extract on brain  $\delta$ -ALA-D *in vitro*, suggesting a possible impairment of central nervous system caused by the extract<sup>23</sup>.

Despite the popular use of *S. guaraniticum* for the treatment of various disorders, there is limited or no scientific data available regarding the safety aspects of this extract, nor are there any documented toxicological studies which can be used to ascertain the safety dose of this herbal preparation. Therefore, the present study aimed to carry out an extensive acute toxicity study of the leaf extract of *S. guaraniticum* in rats, by evaluating biochemical, hematological and oxidative parameters, the enzymatic activities of  $\delta$ -ALA-D, NAG and AChE and the effects on general activity of animals by an open-field test.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemicals

5'-aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA), thiobarbituric acid, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide and p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### Plant Material

Leaves of *S. guaraniticum* were collected in the city of Santa Maria, RS, Brazil. A voucher specimen was identified and deposited at the herbarium of the Federal University of Santa Maria (number 12980). The leaves were dried in a greenhouse, smashed in the knife mill and submitted to extraction with ethanol 80% in a Soxhlet

apparatus until exhaustion. After extraction, the solvent was completely evaporated in a rotavapor<sup>24</sup> and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). A reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C18 column (4.6 mm × 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phases were the mobile phase was: (A) acetonitrile: water (95:5, v/v) and (B) water: phosphoric acid (98:2, v/v), and the composition gradient was: 5% of A until 10 min and changed to obtain 20%, 40%, 60%, 70% and 100% A at 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume 40 µl and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for chlorogenic, ellagic and caffeic acids, and 365 nm for rutin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and quercetin. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention times with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm).

## **Animals**

Male adult albino Wistar rats (200-250 g) were maintained at 22 ± 2 °C and on a 12-h light/dark cycle. The animals were allowed to adapt to laboratory conditions for one week prior to the start of the experiment. Tap water and a standard pellet diet were provided *ad libitum* throughout the experiment, except for the short fasting period where the drinking water was still in free access but no food supply was provided 12 h prior to the treatment. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil (process number 23081.009003/2012-01) and all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

## **Study design**

The acute oral toxicity of the leaf extract of *S. guaraniticum* was evaluated based on the procedures outlined by the Organisation for Economic Co-operation and Development with minor modifications<sup>25, 26, 27</sup>. Following the 12 h fast, the extracts were suspended in water and administered by oral gavage at single doses of 1,250, 2,500 and 5,000 mg/kg to the respective groups (n=6). Six animals received

distilled water and were regarded as the control group. Food was provided to the rats approximately one hour after treatment. Visual observations for mortality, behavioral pattern changes such as aggressiveness, food or water refusal, diarrhea, salivation, discharge from eyes and ears, noisy breathing, changes in locomotor activity, piloerection, tremors, convulsion, coma, injury, pain or any signs of illness in each treated group were monitored continuously for the first 4 h after dosing and periodically until 48 h. At the end of the observation time, all the surviving rats were euthanized.

In a second experiment, animals were treated with the same doses of extract as described before and observed for 14 days for abnormal clinical signs and death. Rats were weighed on days 1, 7 and 14 after treatment<sup>26</sup> and food and water consumption were measured daily. Rats were also submitted to an open field test to analyze changes in spontaneous locomotor activity at 3 h, 48 h and 14 days after the single dose treatments. All the surviving rats were euthanized on day 15.

### **Open field test**

To analyze changes in spontaneous locomotor activity caused by the treatment with *S. guaraniticum*, the animals were placed individually in an open field arena (100 x 100 x 50 cm) with black plywood walls and a white floor divided into 20 equal squares, as previously described<sup>28</sup>. The number of line crossings and rears were measured over 5 min as well as the defecation rate.

### **Collection of blood and organ samples**

At the end of both experiments (48 h and 14 days after the extract administration), the animals were anesthetized and blood samples were collected by cardiac puncture into tubes with or without EDTA for hematological and biochemical analyses, respectively. Samples of the brain, liver and kidney tissues were rapidly dissected, weighed and placed on ice. The tissues were immediately homogenized in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10 w/v). The homogenates were centrifuged at 4,000 x g at 4 °C for 10 min to yield a low-speed supernatant (S1) that was used for the determination of  $\delta$ -ALA-D, NAG, AChE and CAT activities, thiobarbituric acid reactive

substances (TBARS) levels and thiol content (NPSH). The protein content of S1 was measured by Peterson<sup>29</sup>.

### **Organ macroscopic examination and organ-to-body weight ratio**

The liver, stomach, kidneys, lung, heart, spleen and small intestine of all animals were observed macroscopically *in situ*, based on the position, color, shape, size and consistency of the organs. Thereafter, vital organs such as the right kidney, the liver and the spleen were necropsied and examined macroscopically for any lesions or abnormalities and the appearance of the individual organs was compared between treated and control groups. Body weight and weight of the organs were measured and recorded. The relative organ weight of each animal was then calculated as follows: (absolute organ weight × 100%)/ body weight of rat on the day of sacrifice<sup>30</sup>.

### **Biochemical and hematological analysis**

EDTA-blood samples were analyzed for white blood cells count (WBC), red blood cells count (RBC), hemoglobin (Hb) concentration, hematocrit (Ht), red blood cell distribution width (RDW), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelet and differential leukocyte counts. Hematological analyses were performed using a fully automated hematological analyzer (KX-21N, Sysmex, Japan).

Blood samples for biochemical analyses were allowed to clot and centrifuged at 3,400 rpm for 10 min (CELM LS-3 Plus, Brazil). The serum was collected and analyzed for the following biochemistry parameters: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphates (ALP), albumin, glucose, total cholesterol, triglycerides, urea and creatinine. Measurements of biochemical parameters were performed using commercial kits and a semi-automated analyzer (BIO-2000, Bioplus, Brazil).

### **Enzymatic assays**

The  $\delta$ -ALA-D activity in liver, kidney and cerebral cortex was assayed by the method of Sassa<sup>31</sup>. After a pre-incubation period, the enzymatic reaction was initiated by adding the substrate  $\delta$ -aminolevulinic acid and the incubation was carried out at 37 °C for 1 h for liver and kidney and for 3 h for cortical homogenate. The incubation was stopped by adding trichloroacetic acid solution 10% with 10 mM HgCl<sub>2</sub>. Porphobilinogen (PBG), which is formed during the incubation period, was mixed with modified Ehrlich's reagent, and the color developed was measured spectrophotometrically at 555 nm against a blank. The results were expressed as nmol PBG/mg protein/h.

The AChE enzymatic assay in cerebral cortex was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al<sup>32</sup> as previously described<sup>33</sup>. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh) to the reaction mixture (2 mL final volume) containing 100 mM TFK, pH 7.5 and 1 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25 °C. The enzyme activity was expressed in  $\mu$ mol AcSCh/h/mg protein.

Samples for the measurement of kidney NAG activity were added to an enzyme reaction mixture that consisted of a substrate (p-nitrophenyl- N-acetyl-b-D-glucosaminide) dissolved in sodium citrate buffer (pH 4.4). Following incubation at 37 °C for 15 min, the reaction was stopped by adding 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) buffer (pH 10.25), and the reaction product was measured spectrophotometrically at 405 nm. NAG activity in the kidney homogenate was proportional to the absorbance of the p-nitrophenylate ion liberated during enzymatic hydrolysis of the substrate, after correction of the absorbance of the blank sample. The results were expressed as U/L/g tissue<sup>34</sup>.

### **Oxidative stress parameters**

Lipid peroxidation levels in liver, kidney and cerebral cortex tissues were estimated colorimetrically by measuring TBARS levels at 532 nm, according to the method of Buege and Aust<sup>35</sup>, and presented as nmol of MDA/mg protein. NPSH content in tissues was determined according to Ellman<sup>36</sup> based on the development of a yellow color with DTNB, which is measured at 412 nm and presented as mmol

GSH/mg protein. CAT activity was assayed by the decomposition of hydrogen peroxide according to the method of Aebi<sup>37</sup> and expressed as mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed/min/mg protein. In addition, the total antioxidant power of serum was determined using the ferric reducing power (FRAP) assay, a colorimetric method based on the reduction of a ferric tripyridyltriazine complex to its ferrous form<sup>38</sup>. The results are presented as mM Fe<sup>2+</sup>.

### **Statistical analysis**

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

## **RESULTS**

### **Pytochemical screening of *S. guaraniticum* extract**

HPLC fingerprinting revealed the presence of gallic, chlorogenic and ellagic acids, catechin, epicatechin, rutin, quercitrin, isoquercitrin, quercetin and kaempferol and the percentage of each compound is shown in Table 1.

### **General clinical observations**

No death was recorded in any of the groups during the studied periods (48 h or 14 days). All treated animals showed piloerection immediately after dosing, which lasted approximately 15 min. Thereafter, all animals behaved normally and no significant changes in general appearance or behavioral pattern were noted till the end of observation times. Furthermore, the consumption of food and water was similar between treated and control groups throughout the experiment (data not shown).

## Open field test

In the open field test, the rats treated with 5,000 mg/kg of *S. guaraniticum* extract exhibited reduced total locomotor activity compared to the control group at 48 h after dosing. When this parameter was evaluated at 3 h and 14 days after treatment, no differences between treated and control animals were found (Figure 1).

The group treated with 5,000 mg/kg of extract also showed reduced rearing frequencies in the vertical exploration test at 3 h after dosing. However, a dose-dependent reduction in the number of rears was observed in all treated rats at 48 h after administration of *S. guaraniticum*. Interestingly, this effect was not observed at 14 days after treatment, when there was no difference between treated and control groups (Figure 1).

In relation to the frequency of defecation, which indicates the level of anxiety, none of the treated animals presented differences to the control group in the number of fecal pellets (data not shown).

## Effect of the extract on organ weight and body weight gain

Normal body weight gains were observed in all groups after 14 days of treatment (control, 46.4 g  $\pm$  3.2; 1,250 mg/kg, 45.2 g  $\pm$  6.5; 2,500 mg/kg, 40.6 g  $\pm$  4.1; 5,000 mg/kg, 41 g  $\pm$  10.4). No significant difference was observed in relative organ weights of the treated rats when compared to control, following 48 h or 14 days after dosing (Table 2). In the same way, organ examination did not reveal any abnormalities or gross lesions.

## Effect of extract on hematological and biochemical parameters

The hematological and biochemical profiles of the treated and control groups are presented in Tables 3 and 4, respectively. *S. guaraniticum* did not significantly alter hematological or serum biochemical parameters in comparison to control animals.

## Enzymatic activities and oxidative stress parameters



The acute treatment with *S. guaraniticum* extract did neither promote any effect on liver, kidney and cerebral cortex  $\delta$ -ALA-D activity nor on cerebral cortex AChE and kidney NAG activities (Table 5).

In the kidney, there was a decrease in TBARS levels only at day 14 after treatment. Notwithstanding, the extract did not alter NPSH levels and CAT activity in the organs of the treated animals. Moreover, no significant difference was observed in FRAP levels between treated and control groups (Table 6).

## DISCUSSION

Even though medicinal plants remain the first line of treatment for many ailments in developing countries where access to modern health facilities is limited, generally very little is known about their toxicity. This paradigm also applies to *S. guaraniticum*. To the best of our knowledge, there are no published studies on *S. guaraniticum* toxicological profile. Despite the fact that efficacy is one of the overriding criteria in the selection of medicinal plants for use in health care systems, safety should never be overlooked and formal toxicological evaluation of medicinal plants should be done as part of the validation process<sup>39</sup>. In this sense, the present acute oral toxicity study demonstrated the safety profile of the leaf extract of *S. guaraniticum*. On the basis of the presented results and under the conditions of this study, the lethal dose (LD<sub>50</sub>) of *S. guaraniticum* extract after a single oral administration in male Wistar rats was expected to be more than 5,000 mg/kg, which corroborates previous studies in mice<sup>12</sup>. Therefore, the extract could be characterized as nontoxic according to the classification proposed by Loomis and Hayes<sup>40</sup>.

The reduction in the number of rearings and crossings may suggest that *S. guaraniticum* caused alterations in the activity of the central nervous system<sup>41, 42, 43</sup>. Furthermore, it is interesting to note that the behavioral effects were more pronounced at 48 h after the treatment, at a dose-dependent manner, and the behavior of rats was similar to the controls at day 14 after the treatment. In line with this, it is possible that the presently reported effect of *S. guaraniticum* extract may be delayed and short-lasting, once the animals had normal behavior at the end of the second experiment.

General activity is an index for evaluating induced behavioral changes in animals, not only by physiological and genetic manipulation, but also by toxicological interference<sup>44</sup>. Among the techniques used to assess general activity, open field enables to measure various behavioral parameters, among which are those related to emotional, exploratory and motor behavior<sup>45</sup>. In fact, the decrease in locomotor and rearing frequencies caused by the extract administration might suggest some depressant properties of *S. guaraniticum*.

The similarity of water and food consumptions and weight gain between treated and control groups during the study period reaffirms that *S. guaraniticum* treatment did not have major adverse effects. Despite a previous study has shown an increase in AST and ALT activities in mice<sup>12</sup>, it must be recognized that various extraction procedures of the same herb, or plant part, produce final products of varying chemical composition<sup>46</sup>. Moreover, environmental factors such as climate, soil and water changes may also modify the chemical composition of the plant, as well as differences in the animal species studied, which result in diverse biological effects.

The antioxidant properties of *S. guaraniticum* have been reported *in vitro* and *in vivo*<sup>12, 23, 47</sup>. However, the treatment with a single dose of different concentrations of extract in this study did not modify significantly the antioxidant status in animal tissues and serum, as assessed by TBARS, NPSH and FRAP levels and CAT activity, except in the kidneys where TBARS levels were decreased. These results suggest that the extract could influence the renal function and have a renal protective action.

Similarly, previous results of our laboratory have demonstrated the inhibitory effect of the extract on brain  $\delta$ -ALA-D activity *in vitro*, suggesting a neurotoxic effect. However, this effect was not observed after the *in vivo* acute treatment. This could be explained by the complex pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of plant extracts<sup>48, 49</sup>. Plant extracts are composed of various components, mostly with unknown pharmacological and dose–response data<sup>50</sup>. The numerous bioactivities found in *in vitro* studies are not always meaningful to human health because the bioavailability of this natural product appears to be limited and only low plasma concentrations are detected *in vivo*<sup>51</sup>. In this context, *in vivo* studies are helpful to clarify the actual biological properties of plant constituents by considering their metabolism and pharmacokinetic.

Toxicity studies in appropriate animal models are therefore commonly used to assess the potential health risk to humans. This is a key stage in ensuring the safety of drugs and an acute toxicity study is just one of the batteries of toxicity tests that are used for such purposes<sup>52</sup>. Indeed, the fact that no severe toxic effects were observed in the acute toxicity study of *S. guaraniticum* indicates that this plant preparation is safe for short-term treatments and this low toxicity may have been responsible for its widespread use in different ethno-therapeutic interventions. However, this safety assertion may not be applicable to herbal preparation taken for a long period and to add further information on the safety, a chronic toxicity study is recommended.

## **CONCLUSION**

In conclusion, this study provides valuable data on the acute oral toxicity profile of *S. guaraniticum*. Based on the toxicological parameters evaluated, it can be concluded that this medicinal plant is not acutely toxic but appears to possess some action on general behavior of rats, a biological property that deserves greater attention. Therefore, the present results may be helpful for therapeutic decisions with respect to the toxicology of *S. guaraniticum* extract and should be very useful for any future *in vivo* and clinical study of this plant medicine.

## **Acknowledgments**

The authors acknowledge the offer of doctoral fellowship to Gabriela Bonfanti by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) as well as the Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for financial support.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

1. WHO (World Health Organization). *The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation issues and challenges*. Geneva: WHO, 2011.
2. WHO (World Health Organization). *WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems*. Geneva: WHO, 2008.
3. Andrade F, Albuquerque CAC, Maraschin M, Silva EL. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50: 328–334.
4. Bohs L. Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In: Keating RC, Hollowell VC, Croat TB, editors. *A festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Missouri Botanical Garden Press, 2005.
5. Rech RR, Rissi DR, Rodrigues A et al. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. *Pesq Vet Bras*. 2006; 26: 183-189.
6. Stehmann JR, Mentz, LA, Agra MF, Vignoli-Silva M, Giacomini L. *Solanaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Available in: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=881E70462293A552A0EC8BF5902633B7>. Accessed October 08, 2013.
7. Costa OA. Jurubeba. *Rev Bras Farm*. 1940; 21: 404–416.
8. Simões CMO, Falkenberg M, Mentz LA, Schenkel EP, Amoros M, Girre L. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*. 1999; 6: 205–214.

9. Corrêa M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, III*. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Brasil, 1984.
10. Baker DC, Keeler RF, Gaffield W. Toxicosis from steroidal alkaloids of *Solanum* species. Toxicology of plant and fungal compounds, In: Keeler RF, Tu AT, editors. *Handbook of Natural Toxins*. Marcel Dekker, 1991.
11. Jadhav SJ, Sharma RP, Salunkhe DK. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. *Crit Rev Toxicol*. 1981; 9: 21-104.
12. Sabir SM, Rocha JBT. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120: 226–232.
13. Riet-Correa F, Méndez MC, Schild AL, Summers BA, Oliveira JA. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration of cattle. *Cornell Vet*. 1983; 73: 240-256.
14. Paulovich FB, Portiansky EL, Gimeno EJ, Schild AL, Mendez MC, Riet-Correa F. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2002; 49: 473-477.
15. Bosomworth MP, Aparicio SR, Hay AW. Urine N-acetylbeta- d-glucosaminidase—a marker of tubular damage? *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 620–626.
16. Rosenblit PD, Metzger RP, Wick AN. Effect of streptozotocin diabetes on acid phosphatase and selected glycosidase activities of serum and various rat organs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1974; 145: 244-48.
17. Schetinger MRC, Porto NM, Moretto MB et al. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochem Res*. 2000; 25: 949–955.

18. Payne JF, Mathiew A, Melving W, Fancey LL. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull.* 1996; 32: 225–231.
19. Pohanka M. Cholinesterases, A target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011; 155: 219–223.
20. Shenouda J, Green P, Sultatos L. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 241: 135–142.
21. Nogueira CW, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT. Organochalogen effects on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology.* 2003; 191: 169–178.
22. Souza ACG, Luchese C, Santos Neto JS, Nogueira CW. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2009; 84: 351–357.
23. Bonfanti G, Bitencourt PR, de Bona KS et al. Syzygium jambos and Solanum guaraniticum Show Similar Antioxidant Properties but Induce Different Enzymatic Activities in the Brain of Rats. *Molecules.* 2013; 18: 9179-94.
24. Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 2006; 13: 624-629.
25. OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). *Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents.* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France; 2008.
26. Rosidah, Yam MF, Sadikun A, Ahmad M, Akowuah GA, Asmawi MZ. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123: 244–249.

27. Hor SY, Ahmad M, Farsi E, Lim CP, Asmawi MZ, Yam MF. Acute and subchronic oral toxicity of *Coriolus versicolor* standardized water extract in Sprague–Dawley rats. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137: 1067–1076.
28. Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk HJ, editor. *Experiments in personality.* Routledge & Kegan Paul; 1960.
29. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 1977; 83: 346-356.
30. Malathi R, Gomaz P. Evaluation of preliminary toxicity studies on the methanolic leave extract of *Tylophora asthmatica* in experimental rats. *J Pharmacol Toxicol.* 2008; 3: 34–40.
31. Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 1982; 28: 133–145.
32. Ellman GL, Courtney KD, Andres V JR, Feather-stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7: 88-95.
33. Rocha JB, Emanuelli T, Pereira ME. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Exp.* 1993; 53: 431-437.
34. Horak E, Hopfer SM, Sunderman FW Jr. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Clin Chem.* 1981; 27: 1180–1185.
35. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302–310.
36. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82: 70-77.

37. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121–125.
38. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239: 70-76.
39. Chan K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere.* 2003; 52: 1361–1371.
40. Loomis TA, Hayes AW. *Loomis's Essentials of Toxicology.* Academic Press, Elsevier. 1996.
41. Morais LCSL, Barbosa-Filho JM, Almeida RN. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *J Ethnopharmacol.* 1998; 62: 57–61.
42. Mora S, Díaz-Véliz G, Millán R et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 82: 373–378.
43. Yasar SN, Can OD, Ozturk N et al. Central nervous system activities of *Hypericum organifolium* extract via gabaergic and opioidergic mechanisms. *Phytother Res.* 2012; 27: 877-84.
44. Karl T, Pabst R, von Hörsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol.* 2003; 55: 69–83.
45. Ribeiro de Assis JC, Suffredini IB, Moreno PR et al. Analysis of the toxic potential of *Palicourea corymbifera* (Mull Arg.) Standl. in laboratory animals. *Res Vet Sci.* 2006; 80: 209–217.
46. Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. *Pharmacological methods in phytotherapy research. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material.* John Wiley & Sons Ltd. 1996.



47. Zadra M, Piana M, Brum TF et al.. Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of the Leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules*. 2012; 17: 12560-12574.
48. Rabbani M, Sajjadi S, Mohammadi A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta Persica* Boiss in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008; 5: 181–186.
49. Akindele A, Adeyemi O. Anxiolytic and sedative effects of *Byrsocarpus Coccineus* Schum. And Thonn. (Connaraceae) extract. *Int J App Res Nat Prod*. 2010; 3: 28–36.
50. Ahmed M, Azmat A, Azeem MA. Dose-response curve of Somina (Herbal Preparation): a study on frog heart. *Pak J Pharmacol*. 2004; 21: 19–22.
51. Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52: 1040–1061.
52. Asare GA, Addo P, Bugyei K et al. Acute toxicity studies of aqueous leaf extract of *Phyllanthus niruri*. *Interdiscip Toxicol*. 2011; 4: 206-10.

Table 1. Quantification of phenolic compounds found in HPLC analyses

<b>Compounds</b>	<b><i>S. guaraniticum extract</i></b>	
	mg/g	%
Gallic acid	7.41 ± 0.03	0.74
Catechin	10.53 ± 0.01	1.05
Chlorogenic acid	26.85 ± 0.06	2.68
Ellagic acid	20.07 ± 0.02	2.078
Epicatechin	4.71 ± 0.02	0.47
Rutin	39.85 ± 0.01	3.98
Quercitrin	11.36 ± 0.05	1.13
Isoquercitrin	19.54 ± 0.01	1.95
Quercetin	5.17 ± 0.01	0.51
Kaempferol	9.73 ± 0.05	0.97

Results are expressed as mean ± SEM ( $n = 3$ )

**Table 2.** Body weight and organ body index of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.

	Control	1250 mg/kg	2500 mg/kg	5000 mg/kg
48 h				
Body weight (g)	216.8 ± 6.6	216.3 ± 11.6	214.5 ± 8.6	205.2 ± 7.1
Liver (%)	4.1 ± 0.3	4.23 ± 0.2	4.06 ± 0.3	3.87 ± 0.2
Kidney (%)	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.01
Spleen (%)	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01
14 days				
Body weight (g)	277.2 ± 7.3	278.8 ± 9.9	281.8 ± 11.6	249.3 ± 3
Liver (%)	3.66 ± 0.1	3.49 ± 0.1	3.54 ± 0.1	3.67 ± 0.2
Kidney (%)	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.03
Spleen (%)	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.03

Data are expressed as mean ± SEM of six rats per group. Asterisk denotes  $p < 0.05$  compared to control group by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

**Table 3.** Hematological profile of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.

	Control	1250 mg/kg	2500 mg/kg	5000 mg/kg
48 h				
WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	8.63 $\pm$ 1.28	9.05 $\pm$ 0.35	7.90 $\pm$ 1.42	7.21 $\pm$ 0.76
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7.21 $\pm$ 0.14	7.08 $\pm$ 0.08	7.13 $\pm$ 0.19	7.35 $\pm$ 0.16
Hb (g/dL)	13.18 $\pm$ 0.18	13.33 $\pm$ 0.11	13.36 $\pm$ 0.19	13.42 $\pm$ 0.25
HCT (%)	42.03 $\pm$ 0.67	40.93 $\pm$ 0.45	41.76 $\pm$ 1.08	42.02 $\pm$ 0.65
MCV (fL)	58.35 $\pm$ 0.62	57.82 $\pm$ 0.47	58.58 $\pm$ 0.74	57.15 $\pm$ 0.58
MCH (pg)	18.28 $\pm$ 0.29	18.83 $\pm$ 0.18	18.68 $\pm$ 0.52	18.27 $\pm$ 0.38
MCHC (g/dL)	31.37 $\pm$ 0.2	32.58 $\pm$ 0.14	32.04 $\pm$ 0.56	31.93 $\pm$ 0.41
Platelets ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1232 $\pm$ 66.2	1133 $\pm$ 66.5	1140 $\pm$ 83	1173 $\pm$ 58.76
RDW (%)	13.02 $\pm$ 0.24	13.33 $\pm$ 0.34	13 $\pm$ 0.41	13.88 $\pm$ 0.64
Eosinophils (%)	0.66 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.71
Monocytes (%)	2.66 $\pm$ 0.33	2.33 $\pm$ 0.33	2.6 $\pm$ 0.4	2.83 $\pm$ 0.47
Lymphocytes (%)	81.67 $\pm$ 2.34	72.17 $\pm$ 6.97	79.2 $\pm$ 2.78	76.83 $\pm$ 2.6
Neutrophils (%)	16.33 $\pm$ 2.49	23 $\pm$ 7.12	14.5 $\pm$ 3.5	19.17 $\pm$ 2.28
14 days				
WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	10.05 $\pm$ 1.05	9.93 $\pm$ 0.73	8.53 $\pm$ 1.05	8.91 $\pm$ 0.82
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7.2 $\pm$ 0.06	7.4 $\pm$ 0.27	7.53 $\pm$ 0.11	7.85 $\pm$ 0.14
Hb (g/dL)	13.58 $\pm$ 0.2	13.43 $\pm$ 0.33	13.82 $\pm$ 0.19	14.17 $\pm$ 0.26
HCT (%)	41.65 $\pm$ 0.56	41.42 $\pm$ 1.04	42.85 $\pm$ 0.38	44.38 $\pm$ 0.58*
MCV (fL)	57.82 $\pm$ 0.47	56.07 $\pm$ 0.76	56.92 $\pm$ 0.74	56.57 $\pm$ 0.72
MCH (pg)	18.83 $\pm$ 0.21	18.2 $\pm$ 0.34	18.37 $\pm$ 0.44	18.03 $\pm$ 0.25
MCHC (g/dL)	32.62 $\pm$ 0.22	32.45 $\pm$ 0.18	32.27 $\pm$ 0.42	31.92 $\pm$ 0.35
Platelets ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1045 $\pm$ 28	1210 $\pm$ 64.2	955.7 $\pm$ 104.6	937.3 $\pm$ 177
RDW (%)	11.87 $\pm$ 0.3	13.03 $\pm$ 0.4	12.05 $\pm$ 0.44	12.05 $\pm$ 0.21
Eosinophils (%)	0.83 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 0.51	0.33 $\pm$ 0.21	0.5 $\pm$ 0.34
Monocytes (%)	1.5 $\pm$ 0.42	2 $\pm$ 0.51	2.16 $\pm$ 0.47	0.83 $\pm$ 0.3
Lymphocytes (%)	78.5 $\pm$ 2.11	79.67 $\pm$ 2.6	76 $\pm$ 1.34	82.17 $\pm$ 1.32
Neutrophils (%)	16.33 $\pm$ 1.28	17.50 $\pm$ 2.48	20.33 $\pm$ 0.98	15.33 $\pm$ 0.95

White blood cell counts (WBC), red blood cells counts (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and red blood cell distribution width (RDW). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Asterisk denotes  $p < 0.05$  compared to control group by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

**Table 4.** Serum biochemical parameters of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment

	Control	1250 mg/kg	2500 mg/kg	5000 mg/kg
48 h				
AST (U/L)	95.83 ± 4.7	122.7 ± 21.15	115.7 ± 14.4	87.83 ± 3.45
ALT (U/L)	45.67 ± 3.73	52.67 ± 4.63	51.17 ± 7.78	42.33 ± 3.2
ALP (U/L)	721.7 ± 34.5	878.70 ± 97.5	612.80 ± 68.2	677.3 ± 75.9
Urea (mg/dL)	44.33 ± 4.24	48.00 ± 3.27	43.83 ± 3.88	47.33 ± 4.31
Creatinine (mg/dL)	0.43 ± 0.08	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.49 ± 0.06
Albumin (g/dL)	2.92 ± 0.17	2.87 ± 0.13	2.87 ± 0.1	3.07 ± 0.29
Glucose (mg/dL)	156.6 ± 9.6	158.1 ± 15.62	150.6 ± 9.18	148.2 ± 13.53
Cholesterol (mg/dL)	56 ± 6.27	57.12 ± 6.66	55.6 ± 5.24	56.62 ± 4.38
Triglyceride (mg/dL)	202.8 ± 12.76	185.9 ± 27.25	181.2 ± 22.66	157.2 ± 12.4
14 days				
AST (U/L)	94.67 ± 8.26	107.8 ± 7.87	103.4 ± 9.35	97.8 ± 9.2
ALT (U/L)	36.17 ± 3	42.17 ± 3.69	44.83 ± 2.97	43.4 ± 5.11
ALP (U/L)	565 ± 31.2	513.8 ± 49.9	439 ± 13.8	624.8 ± 39.6
Urea (mg/dL)	40 ± 2.03	35.83 ± 1.86	36.17 ± 2.12	36.2 ± 2.17
Creatinine (mg/dL)	0.88 ± 0.25	0.56 ± 0.04	0.66 ± 0.09	0.58 ± 0.17
Albumin (g/dL)	2.88 ± 0.09	2.63 ± 0.12	2.93 ± 0.12	3.04 ± 0.17
Glucose (mg/dL)	194.6 ± 8.04	185.05 ± 15.71	180.6 ± 15.13	179 ± 14.87
Cholesterol (mg/dL)	64.81 ± 4	65.47 ± 4.34	62.53 ± 6.94	69.72 ± 5.2
Triglyceride (mg/dL)	187.5 ± 26.81	203.4 ± 18.34	217.8 ± 10.13	189.1 ± 28.38

Aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP). Data are expressed as mean ± SEM. Asterisk denotes p<0.05 compared to control group by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

**Table 5.** Tissue enzyme activity of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.

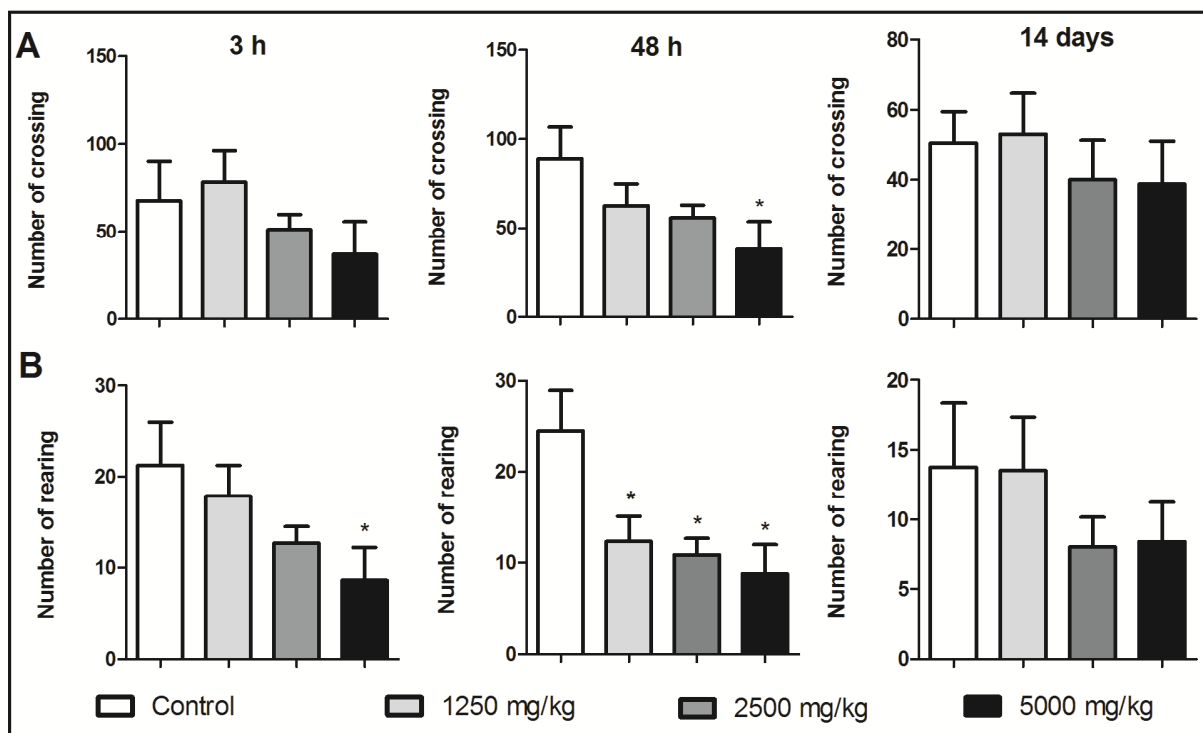
	Control	1250 mg/kg	2500 mg/kg	5000 mg/kg
48 h				
Liver $\delta$ -ALA-D	8.61 $\pm$ 0.57	9.82 $\pm$ 0.48	9.67 $\pm$ 0.91	8.55 $\pm$ 0.41
Kidney $\delta$ -ALA-D	3.66 $\pm$ 0.12	3.9 $\pm$ 0.33	3.96 $\pm$ 0.32	3.74 $\pm$ 0.23
Cortex $\delta$ -ALA-D	1.1 $\pm$ 0.08	1.17 $\pm$ 0.13	1.32 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.05
Cortex AChE	0.68 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.1	0.82 $\pm$ 0.05
Kidney NAG	401.2 $\pm$ 47.8	450.9 $\pm$ 43.7	415.5 $\pm$ 91.7	370.4 $\pm$ 79.2
14 days				
Liver $\delta$ -ALA-D	11.01 $\pm$ 0.32	11.64 $\pm$ 0.32	11.04 $\pm$ 0.28	10.32 $\pm$ 0.42
Kidney $\delta$ -ALA-D	4.58 $\pm$ 0.34	5.28 $\pm$ 0.27	4.24 $\pm$ 0.31	4.25 $\pm$ 0.29
Cortex $\delta$ -ALA-D	1.85 $\pm$ 0.44	1.82 $\pm$ 0.33	1.65 $\pm$ 0.33	1.78 $\pm$ 0.33
Cortex AChE	0.62 $\pm$ 0.14	1.05 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.12	0.88 $\pm$ 0.2
Kidney NAG	212 $\pm$ 24.1	221.4 $\pm$ 15.6	215.3 $\pm$ 19.4	276.2 $\pm$ 22.6

$\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity ( $\delta$ -ALA-D; nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h). Acetylcholinesterase activity (AChE;  $\mu$ mol AcSCh/h/mg of protein). N-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG; U/L/g tissue). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Asterisk denotes  $p < 0.05$  compared to control group by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

**Table 6:** Oxidative status of rats after 48 h and 14 days of *S. guaraniticum* treatment.

	Control	1250 mg/kg	2500 mg/kg	5000 mg/kg
48 h				
Liver TBARS	0.54 ± 0.11	0.65 ± 0.19	0.46 ± 0.07	0.63 ± 0.13
Kidney TBARS	0.83 ± 0.14	0.76 ± 0.11	0.67 ± 0.12	0.54 ± 0.07
Cortex TBARS	2.66 ± 0.36	2.6 ± 0.31	2.62 ± 0.13	2.49 ± 0.12
Liver NPSH	2.79 ± 1.18	1.66 ± 0.09	1.57 ± 0.27	2.19 ± 0.22
Kidney NPSH	2.51 ± 0.46	3.38 ± 0.33	3.23 ± 0.68	3.22 ± 0.4
Cortex NPSH	9.11 ± 2.91	8.09 ± 2.19	7.6 ± 1.11	8.9 ± 2.94
Liver CAT	10.55 ± 0.52	10.98 ± 0.74	8.78 ± 0.25	9.87 ± 0.29
Kidney CAT	5.97 ± 0.2	5.92 ± 0.2	5.70 ± 0.51	5.59 ± 0.41
Cortex CAT	0.93 ± 0.21	0.89 ± 0.25	0.61 ± 0.09	0.55 ± 0.08
Serum FRAP	0.46 ± 0.03	0.53 ± 0.07	0.55 ± 0.08	0.51 ± 0.09
14 days				
Liver TBARS	0.45 ± 0.12	0.69 ± 0.2	0.47 ± 0.08	0.59 ± 0.23
Kidney TBARS	1.50 ± 0.29	0.83 ± 0.08*	0.69 ± 0.1**	0.89 ± 0.08*
Cortex TBARS	4.04 ± 0.89	3.03 ± 0.89	2.39 ± 0.5	2.75 ± 0.32
Liver NPSH	3.24 ± 0.94	2.38 ± 0.7	2.60 ± 0.4	2.96 ± 0.75
Kidney NPSH	3.41 ± 0.47	2.73 ± 0.35	2.69 ± 0.32	3.73 ± 0.41
Cortex NPSH	5.18 ± 0.33	6.53 ± 0.72	7.35 ± 1.03	7.44 ± 0.94
Liver CAT	8.52 ± 0.3	8.46 ± 0.23	8.20 ± 0.14	8.28 ± 0.41
Kidney CAT	4.87 ± 0.12	4.58 ± 0.2	4.72 ± 0.15	4.79 ± 0.18
Cortex CAT	1.57 ± 0.6	1.59 ± 0.49	1.17 ± 0.39	1.03 ± 0.3
Serum FRAP	0.47 ± 0.04	0.56 ± 0.04	0.56 ± 0.02	0.48 ± 0.02

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; nmol MDA (malondialdehyde)/mg protein). Non-protein thiol groups (NPSH; mmol GSH/mg protein). Catalase (CAT; mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed/min/mg protein). Ferric reducing power (FRAP; mM Fe<sup>2+</sup>). Data are expressed as mean ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control group by one-way ANOVA followed by Duncan's test.



**Figure 1.** Open field exploration. The effect of different single doses of *S. guaraniticum* extract in rats was evaluated after 3 h, 48 h and 14 days of treatment. (A) Number of crossing in 5 min. (B) Number of rearing in 5 min. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Asterisk denotes  $p < 0.05$  compared to control group by one-way ANOVA followed by Duncan's test.



## 5 DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais em todo o mundo, e especialmente na América do Sul, contribui significativamente para os cuidados primários de saúde (WHO, 2001). Essa prática popular é acompanhada da crença de que as plantas apresentam baixa toxicidade devido a sua origem natural, mesmo sabendo-se que o tratamento com plantas medicinais, assim como o uso de medicamentos convencionais, pode causar efeitos adversos e interações medicamentosas (JORDAN, CUNNINGHAM, MARLES, 2010, SEEF, 2007). Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito dos extratos das espécies vegetais *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum*, popularmente utilizadas como medicinais no Rio Grande do Sul, em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

As folhas das plantas foram utilizadas para a preparação dos respectivos extratos vegetais por serem as partes mais utilizadas na preparação de remédios caseiros na medicina popular. A caracterização cromatográfica desses extratos revelou a presença de compostos fenólicos importantes como ácido gálico, elágico e clorogênico, catequina e epicatequina, rutina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina e canferol em ambos os extratos e ainda a presença de ácido cafeico somente no extrato de *Syzygium jambos*. Também, uma análise quantitativa demonstrou que ambos os extratos apresentam um conteúdo considerável de compostos fenólicos e flavonóides totais e de vitamina C. Tais resultados são importantes no esclarecimento do teor e identificação dos compostos bioativos presentes nessas plantas, já que poucos dados são encontrados na literatura sobre essas espécies locais.

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002). Nesse sentido, o presente estudo procurou avaliar por diferentes métodos a atividade antioxidante dos extratos de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum*. Primeiramente, eritrócitos humanos foram utilizados experimentalmente, *in vitro*, já que essas células são consideradas um modelo interessante para investigar o potencial antioxidante de componentes e extratos vegetais (MIKSTACKA; RIMANDO; IGNATOWICZ, 2010). Nossos resultados demonstraram que ambos os extratos

foram capazes de proteger as células contra um dano oxidativo causado por  $H_2O_2$ , ao diminuir o nível de lipoperoxidação, sendo que o extrato de *Syzygium jambos* foi mais potente já que apresentou esse efeito em concentrações menores. Outra evidência da capacidade antioxidante dos extratos foi a diminuição do efeito hemolítico provocado por radicais livres após a incubação dos eritrócitos com 2,2'-azobis(-amidinopropano) dihidrocloridrato (AAPH). De forma similar ao resultado anterior, o extrato de *Syzygium jambos* foi mais eficaz em conter esse efeito hemolítico e manter a estabilidade osmótica dos eritrócitos.

Outro modelo experimental utilizado foi a indução de estresse oxidativo em amostras de tecidos animais, *in vitro*, utilizando nitroprussiato de sódio (NPS), no qual ambos os extratos foram capazes de proteger os tecidos cerebral, hepático e renal contra o processo de lipoperoxidação e, novamente, o extrato de *Syzygium jambos* apresentou maior potência. O nível de compostos tiólicos não protéicos (NPSH) em tecido cerebral, também foi mantido pelos extratos nessas condições experimentais, demonstrando um efeito interessante na homeostase redox desse tipo de tecido.

Sabendo que os compostos fenólicos podem exercer a sua atividade antioxidante através de diversos mecanismos e considerando que esses compostos, identificados e quantificados nos extratos, possam ser os principais responsáveis pelas suas ações protetoras, algumas avaliações foram feitas a fim de determinar seus possíveis mecanismos de ação. Ambos os extratos apresentaram capacidade removedora de  $H_2O_2$  e NO, atividade quelante de íons  $Fe^{2+}$  e capacidade redutora, sendo que o extrato de *Syzygium jambos* se mostrou mais potente e ainda apresentou atividade mimética às enzimas tiol-peroxidases. Portanto, esses resultados estão de acordo com as atividades antioxidantes protetoras de ambos os extratos nos diferentes modelos de indução de estresse oxidativo utilizados nesse estudo e essa avaliação por diferentes métodos é fundamental para um melhor entendimento do potencial das atividades biológicas dos extratos de plantas.

Outro aspecto avaliado nesse estudo foi o efeito dos extratos de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum* na atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D de eritrócitos e tecidos de ratos, *in vitro*. A enzima  $\delta$ -ALA-D tem sido utilizada em diversos estudos como marcador de compostos pro-oxidantes ou tóxicos (NOGUEIRA et al., 2003; SOUZA et al., 2009; ROCHA et al., 2012). Nesse sentido, observou-se uma inibição da atividade da enzima eritrocitária por ambos os extratos, sendo que o extrato de

*Solanum guaraniticum* foi mais potente, provocando inibição mesmo nas menores doses testadas. Ainda, a manutenção do efeito dos extratos na atividade da  $\delta$ -ALA-D em presença de um agente protetor tiólico, o DTT, indicou que os grupamentos tiólicos do sítio ativo da enzima não parecem estar envolvidos no mecanismo de inibição enzimática. Por outro lado, já que a adição de íons zinco ao meio de incubação foi capaz de reverter parte da inibição enzimática pode-se sugerir um envolvimento desses íons metálicos presentes no sítio ativo da enzima no mecanismo de inibição. Além de participar diretamente da atividade catalítica da  $\delta$ -ALA-D, o íon Zn também está envolvido na estabilização dos grupos tiólicos e a sua remoção pode acelerar a oxidação da enzima (EMANUELLI et al., 1998; BEBER et al., 1998). Essa inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-D pode provocar um acúmulo de seu substrato  $\delta$ -ALA, que pode ter propriedades pro-oxidantes e provocar um desequilíbrio no estado redox das células (BECHARA, 1996; BECHARA et al., 2007). Entretanto, nas condições experimentais utilizadas, não foi observado nenhuma alteração pro-oxidante provocada pelos extratos.

Quando o efeito dos extratos foi avaliado na atividade da  $\delta$ -ALA-D em tecidos cerebral, hepático e renal de ratos, apenas o extrato de *Solanum guaraniticum* foi capaz de causar inibição, na maior dose testada e unicamente em tecido cerebral. Esse efeito pode estar relacionado aos relatos de efeitos neurotóxicos apresentados por bovinos que ingerem grande quantidade dessa planta (PAULOVICH et al., 2002; RECH et al., 2006) e merece ser destacado já que alerta para um possível efeito tóxico.

Como método de avaliação preliminar de toxicidade, os extratos estudados foram submetidos ao teste de letalidade da *Artemia salina*, que tem sido frequentemente empregado para a avaliação toxicológica de extratos vegetais (ASHAFA, 2013; NGUTA; MBARIA, 2013; RAHMAN et al., 2013). Ambos os extratos apresentaram uma concentração letal média ( $CL_{50}$ ) inferior a 1000  $\mu$ g/mL e podem ser considerados como bioativos (MEYER et al., 1982). Além disso, apesar de o extrato de *Syzygium jambos* apresentar efeitos tóxicos mais rapidamente, devido a menor  $CL_{50}$  após 24h de exposição, essa toxicidade não é dependente do tempo e, ao final das 48h de exposição o extrato de *Solanum guaraniticum* demonstrou maior potencial tóxico. Apesar dos poucos dados na literatura sobre essas espécies vegetais, o valor de  $CL_{50}$  do extrato de *Syzygium jambos* após 48h de exposição foi semelhante ao valor já descrito na literatura para o seu extrato

metanólico (MOHANTY; COCK, 2010). Outro fato interessante é que a  $CL_{50}$  em 48h do extrato de *Solanum guaraniticum* encontrado nesse trabalho é menor do que o valor reportado na literatura para o extrato das folhas de *Solanum paniculatum* reafirmando a idéia de que a substituição dessas plantas no uso popular pode provocar danos à saúde (SILVA et al., 2007).

Além disso, os efeitos dos extratos na viabilidade celular de linfócitos de baço de ratos demonstraram que o extrato de *Solanum guaraniticum* apresenta efeitos citotóxicos ao reduzir o número de células viáveis, como demonstrado no teste do azul tripan. Mais especificamente, esse extrato parece provocar lesões nas membranas citoplasmáticas e sobre os lisossomas das células, já que apresentou aumento da liberação da enzima LDH e redução da incorporação do corante vermelho neutro. Entretanto, parece não afetar a atividade mitocondrial das células, já que o teste do MTT não mostrou diferenças entre as células tratadas ou não com esse extrato. Por outro lado, o extrato de *Syzygium jambo* não demonstrou efeito pelos ensaios empregados (azul tripan, vermelho neutro e LDH), porém, no teste do MTT indicou um aumento da atividade mitocondrial, podendo sugerir que esse extrato possa ter algum efeito estimulatório nessas células, já que o teste do MTT também é utilizado para monitorar ativação celular (GERLIER; THOMASSET, 1986).

Outro efeito interessante foi o aumento da atividade da enzima AChE provocado pelo extrato de *Syzygium jambos*. Considerando que essa enzima tem papel de regular a quantidade de acetilcolina nas células linfoides de acordo com demandas imunológicas esse resultado pode sugerir um papel imunomodulatório do extrato, alertando para uma possível atividade antiinflamatória (NIETO-CERÓN et al., 2004).

Em relação à avaliação da toxicidade oral aguda do extrato de *Solanum guaraniticum* em ratos foi possível determinar que a  $DL_{50}$  é superior a 5000 mg/kg e, portanto, esse extrato pode ser considerado não tóxico para o consumo humano (OECD, 2001). De acordo com estudos anteriores, há uma boa correlação entre a  $CL_{50}$  do teste de letalidade da *A. salina* e a  $DL_{50}$  obtida no teste oral de toxicidade aguda *in vivo*. Assim, extratos com  $CL_{50} > 25 \mu\text{g/ml}$ , como o *Solanum guaraniticum*, apresentariam um valor de  $DL_{50}$  *in vivo* entre 2.500 e 8.000 mg/kg, corroborando o resultado desse estudo (LOGARTO et al., 2001).

No teste *in vivo*, os animais tratados com o extrato, não apresentaram efeitos colaterais significantes e mantiveram seu consumo de água e comida, ganho de

peso e peso relativo dos órgãos vitais semelhantes aos dos animais controle. Também não apresentaram alterações nos perfis lipídicos e hematológicos assim como nos marcadores do perfil oxidativo avaliados e nas atividades das enzimas AChE, NAG e  $\delta$ -ALA-D. O fato de o extrato *in vivo* não reproduzir os efeitos de inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-D observada nos experimentos *in vitro* pode ser devido aos processos de metabolização do extrato e das suas características farmacocinéticas. Ainda, considerando que a biodisponibilidade do extrato ou de seus metabólitos não é conhecida, a concentração após a administração *in vivo* pode ser diferente daquela empregada nos estudos *in vitro*, justificando a importância desse tipo de estudo para a elucidação das propriedades biologicamente relevantes.

Além disso, foi interessante observar que o extrato de *Solanum guaraniticum* foi capaz de alterar o padrão de comportamento geral dos animais, avaliado no teste de campo aberto, quando comparados ao grupo controle. A administração única do extrato provocou uma redução no número de cruzamentos e levantamentos, principalmente após 48 horas do tratamento. É possível sugerir que o extrato provoque depressão no SNC (MORA et al., 2005, YASAR et al., 2012), e que esse efeito se apresenta de forma tardia podendo estar relacionado ao processo de metabolização do extrato, onde novos compostos fitoquímicos podem ser formados com ações farmacológicas ainda desconhecidas. Além disso, o fato desse efeito não estar presente após 14 dias da administração do extrato sugere que o efeito não é permanente, mas merece atenção nos próximos estudos em relação às propriedades medicinais dessa planta.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos diferentes modelos experimentais desenvolvidos no presente estudo podemos concluir:

1) os extratos das folhas de *Syzygium jambos* e *Solanum guaraniticum* possuem constituintes fitoquímicos de atividade antioxidante já reconhecida na literatura;

2) ambos os extratos apresentaram atividade protetora em diferentes modelos de indução de estresse oxidativo, mostrando-se efetivos em conter danos celulares como a lipoperoxidação, hemólise e diminuição de defesas antioxidantes, como os grupamentos tiólicos;

3) tais atividades antioxidantes podem ocorrer através de diferentes mecanismos: remoção de espécies reativas, quelação de metais ou processos de redução;

4) ambos os extratos são capazes de inibir a atividade da  $\delta$ -ALA-D em eritrócitos e o íon zinco da estrutura da enzima parece estar envolvido;

5) a inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-D em tecido cerebral só ocorre, *in vitro*, em altas concentrações do extrato de *Solanum guaraniticum*;

6) o extrato de *Syzygium jambos* promoveu aumento da atividade mitocondrial juntamente com inibição da enzima AChE em linfócitos esplênicos, sugerindo efeitos imunomodulatórios;

7) ambos os extratos demonstraram atividade no teste de letalidade da *A. salina* entretanto somente o extrato de *Solanum guaraniticum* provocou efeitos citotóxicos em linfócitos esplênicos;

8) o extrato de *Solanum guaraniticum* não é tóxico quando administrado em única dose e por via oral a ratos, entretanto pode ter efeito depressor do sistema nervoso central.

Assim, podemos inferir que as espécies vegetais estudadas podem ser reconhecidas como fonte de antioxidantes naturais e tem uso prospectivo na medicina preventiva contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Entretanto, os efeitos sobre a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, teste de letalidade da *A. salina*, parâmetros de viabilidade celular além dos efeitos comportamentais observados, alertam sobre propriedades nocivas, demonstrando que seu uso popular deve ser feito com cautela até que uma maior investigação em relação ao perfil toxicológico dos extratos seja realizada. Além disso, estudos que determinem as doses e tempos de tratamento seguros são indispensáveis antes da sua indicação como fitoterápicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta.**, v. 306, n. 1-2, p. 1-17, 2001.
- ADAME, A.; JACCOUD, C.V.; COBRA, E. A. Biodiversidade, biopirataria e aspectos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2005. Disponível em: <[www.conpedi.org/manaus/arquivos/anais/manaus/propried\\_intelectual\\_alcione\\_adame\\_e\\_outros.pdf](http://www.conpedi.org/manaus/arquivos/anais/manaus/propried_intelectual_alcione_adame_e_outros.pdf)>. Acesso em: jun. 2010.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-95, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**, v.27, p.336-45, 2002.
- AMOROZO, M. C. M. Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Ed.) **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. p.47-68.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 189–203, 2002.
- AMOROZO, M.C.M. Pluralistic medical settings and medicinal plant use in rural communities, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnobiology**, v.24, n.1, p.139-61, 2004.
- AMORIM, M. F. D. et al. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 448-454, 2007.
- ANDERSON J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 107-111, 1991.
- ANDERSON, P. M., DESNICK, R. J. Purification and properties of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 6924-6930, 1979.
- ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officinalis* in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, v. 83, p. 569-574, 2003.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução nº 90, de 16 de março de 2004**. Determina a publicação do "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION&id=10242](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=10242). Acesso em: 10/2/2009.

ARAÚJO, M. G. F. et al. Pharmacognostical evaluation of fruits of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solanaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 9, p. 247-52, 2010.

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

ARORA, A., MURALEEDHARAN, G. N., STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

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

ASHAFA A. O. T. Medicinal potential of *Morella serata* (Lam.) Killick (Myricaceae) root extracts: biological and pharmacological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p. 163, 2013.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de textos, 2006.

AZEVEDO, V. M.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botanica Brasilica.**, v. 21, n. 2, p. 263-275, 2007.

BARAHONA, M.V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. **Bulletin environmental contamination and toxicology**, v. 56, p. 271-8, 1996.

BEBER F. A. et al. delta-Aminolevulinatase inhibition by ascorbic acid is mediated by an oxidation system existing in the hepatic supernatant. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research.**, v. 68, p. 181–188, 1998.

BECHARA E. J., Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research.**, v. 29, p. 841–851, 1996.

BECHARA E. J. et al. The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v. 146, p. 88–110, 2007.



BEGUN, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n.2, p. 398-403, 2002.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. New York: Springer Verlag, 2004. 774 p.

BENNET, B.C.; PRANCE, G.T. Introduced plants the indigenous pharmacopoeia of Northern South América. **Economic Botany**, v. 54, p. 90–102, 2000.

BHARGAVA, U. C.; WESTFALL, A. B.; SIEHR, D. J. Preliminary pharmacology of ellagic acid from *Juglans nigra* (black walnut). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 1728–1732, 1968.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIERER, L. M. et al. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 749 – 60, 1995.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**. v.31, n. 3, p. 277-281, 2003.

BOHS, L. Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In: \_\_\_\_\_ KEATING, R.C.; HOLLOWELL, V.C.; CROAT, T.B. (eds.). **A festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist**. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2005. v. 104, p. 27-49.

BONFANTI G. et al.  $\delta$ -Aminolevulinatase dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress. **Clinical Biochemistry**, v.44, p. 1105–1109, 2011.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BOSOMWORTH, M. P., APARICIO, S. R., HAY, A. W. M. Urine *N*-acetyl-beta-dglucosaminidase: A marker of tubular damage? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 14, p. 620–6, 1999.

BRAGANÇA, L. A. R. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de plantas e fitoterápicos hipoglicemiantes. In: \_\_\_\_\_ SIXEL, P.J. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Rio Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 1996. Cap.5, p.105-122.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas Integrativas e Complementares em saúde: uma realidade no SUS. **Revista Brasileira Saúde da Família**, Brasília, v. 9, n. especial, p. 70-76, maio, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde**. Normas e Manuais Técnicos: Cadernos de Atenção Básica n.31. Brasília, 2012, 156 p.

BRITO, F. A. et al. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 40, p. 105-115, 2007.

CALDIN, M. et al. A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, p.224-231, 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p. 58-65, 2000.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, p. 223-226, 2005.

CHAROENPORNSOOK, K.; FITZPATRICK, J. L.; SMITH, J. E. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Mycophatologia**, v. 143, p. 105–111, 1998.

CHAUDHURI, et al. Antiinflammatory and related actions of *Syzygium cumini* seed extract. **Phytotherapy Research**, v.4, p.5–10, 1990.

CHEN, A.; NEILANDS, J. L. The delta-aminolevulinic acid dehydratase: molecular and environmental properties. **Structure and Bonding**, v.29, p.123-169, 1976.

CIAPETTI, G. et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

CLEMEDSON, C.; EKWALL, B. Overview of the final MEIC results. I. The in vitro–in vitro evaluation. **Toxicology in vitro**, v. 13, p. 657–663, 1999.

COELHO, H.L. Farmacovigilância: um instrumento necessário. **Caderno de Saúde Pública**, v.14, p.871-875, 1998.

COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 28, p. 54-61, 2003.

COMISSÃO GEOGRÁFICA E GEOLOGIA. **Flora Paulista**. Boletim no 13., 1972, São Paulo, p. 74.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 272-278, 2005.

CORREA, A. D.; BATISTA, S. R.; OVINHES, L. E. M. **Plantas Medicinais do Cultivo a Terapêutica**. Petrópolis: Vozes, 2003. 153 p.

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira S.A., 1979.

D´AVILA-PENA, A. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.380–385, 2007.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-23, 2006.

DALTON, R. N; HAYCOCK, G. B. Laboratory investigations. In: BARRAT, T. M., AVNER, E. D., HARMON, W. E. (Eds). **Pediatric Nephrology**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, pp 343-364.

DE BARROS, S. S., et al. *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* and *Solanum* sp. Poisoning in cattle: ultrastructural changes in the cerebellum. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, p.1-5, 1987.

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

DE LIMA, T. C. M. et al. Behavioral effects of crude and semi-purified extracts of *Syzygium cuminii* linn. skeels. **Phytotherapy Research**, v.12, p.488–493, 1998.

DÉCIGA-CAMPOS, M., et al. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 334-342, 2007.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

- DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 15, p. 61–69, 1988.
- DELFINO, R. T., RIBEIRO, T. S., FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 407-428, 2009.
- DENT A. J., D. et al. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinate dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, v. 29, p. 7822–7828, 1990.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais, arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.
- DJADJO DJIPA, C.; DELM'EE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307–313, 2000.
- DONATINI, R. S. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*); **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 89-94, 2009.
- DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DRESEL, E. I. B.; FALK, J. E. Conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. **Nature**, v. 172, n. 4391, p.1185, 1953.
- EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacology and Toxicology*, v.79, p.136-143, 1996.
- EMANUELLI T. et al. delta-Aminolevulinate dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. **Pharmacology and Toxicology**, v. 83, p. 95–103, 1998.
- ENDRINGER, D. C. et al. Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 928-33, 2010.

ERSKINE P. T. et al. MAD analyses of yeast 5-aminolaevulinate dehydratase: their use in structure determination and in defining the metal-binding sites. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 56, p. 421–430, 2000.

FARINA, M. et al. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of aminolevulinic acid dehydratase from rat liver and cucumber leaves. **Brazilian Journal of medical and biological research**, v. 35, p. 623–631, 2002.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA**, São Paulo: Nacional, p. 1149, 1929.

FERNANDEZ-CUARTERO B., et al. Delta aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **The international Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 31, p. 479–488, 1999.

FERREIRA, I. C. F. S.; VARGAS, V. M. F. Metagenicity of medical plant extracts in Salmonella/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v.13, n.15, p.397-400, 1999.

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

FOGLIO, M. A. et al., Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, 2006.

FOLMER, V., SOARES, J. C. M., ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **The international Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, p. 1279–1286, 2002.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171–177, 2006.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO. Pesquisadores estudam efeitos do extrato de jambolão na perda de peso. 2011. Disponível em: <[http://www.fapema.br/site2012/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1547:efeitos-do-extrato-do-jambolao-na-perda-de-peso-sao-estudados-por-pesquisadores&catid=43:noticias-de-sao-luis&Itemid=238](http://www.fapema.br/site2012/index.php?option=com_content&view=article&id=1547:efeitos-do-extrato-do-jambolao-na-perda-de-peso-sao-estudados-por-pesquisadores&catid=43:noticias-de-sao-luis&Itemid=238)>. Acesso em: 29 dez. 2013.

GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do horto da Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES. **Natureza on line**, v.3, p.19–24, 2005.

GARLET, T. M. B.; IRGANG, B. E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 9-18, 2001.

GASPAR, J. et al. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, v.8, n.1, p.51-55, 1993.

GAZIANO, J. M. Antioxidants in cardiovascular disease: Randomized trials. **Nutrition**, v. 12, p. 583-588, 1996.

GAZIANO, J. M. et al. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. **Annals of Epidemiology**, v. 5, p. 255-260, 1995.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, p. 57-63, 1986.

GIBSON, K. D., NEUREBERGER, A., SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochemical Journal**, v. 61, p. 618-629, 1955.

GIULIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v. 19, n. 3, p. 257-67, 1996.

GONÇALVES T. L. et al. Oxidative stress and delta-ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 602-610, 2009.

GONÇALVES, T. L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1071-5, 2005.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GRAVINA F. S. et al. Experimental hypothyroidism inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in neonatal rat blood and liver. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 1021-1026, 2007.

GROTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 4, p. 806-11, 2010.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p.15

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALL, C. A.; CUPPETT, S.L. Structure-activities of natural antioxidants. In: \_\_\_\_\_ ARUOMA, O.I., CUPPETT, S.L., (eds). **Antioxidant Methodology: In Vivo and In Vitro Concepts**. AOCS Press; 1997, p. 2-29.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

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

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16, n.6, p.845-850, 1994.

HANAZAKI, N.; LEITÃO FILHO, H. F.; BEGOSSI, A. Uso de recursos na Mata Atlântica: o caso da Ponta do Almada. **Interciencia**, v.21, n.6, p.268-76, 1996.

HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. London: Plenum Press, 1991.

HARTMAN, P. E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HARTMAN, R. E. et al. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 24, p.506-515, 2006.

HEINEMANN, I. U., JAHN, M., JAHN, D. The biochemistry of heme biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, p. 238–251, 2008.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, v.18, n. 1, p. 12-14, 1999.

HINDMARSH, J. T. The porphyrias: recent advances. **Clinical Chemistry**., v. 32, p. 1255-63, 1986.

HOFFBRAND. A. V.; PETTIT J. E.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. Artmed, 2004.

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

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

HUNZIKER, A.T. **Genera Solanacearum**. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system, 2001, 500p.

HUTCHINSON, J. **The Families of Flowering Plants**, 2nd ed. Clarendon, Oxford, 1960 p. 302.

HWANG, E. S.; KIMB, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1–10, 2007.

ISLAM, M. R., PARVIN, M. S., ISLAM, M.E. Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of *Syzygium jambos* (L.) leaves. **Drug Discoveries and Therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 205-11, 2012.

JAFFE E. K. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 56, p. 115–128, 2000.

JAFFE, E. K. et al. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 244-51, 1995.

JAYASINGHE, U.L. Dihydrochalcones with radical scavenging properties from the leaves of *Syzygium jambos*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 6, p. 551-4, 2007.

JOHN, J. H., et al. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 359, p. 1969-1974, 2002.

JOLY, A.B. **Botânica**: Introdução a taxonomia vegetal. 8ed. São Paulo: Nacional, 1987.

JORDAN, S. A., CUNNINGHAM, D. G., MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, p. 198-216, 2010.

JUNG, K. et al. Urinary enzymes and low molecular mass proteins as indicators of diabetic nephropathy. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 544–7, 1988.

KADAN, S. et al. *In vitro* evaluations of cytotoxicity of eight antidiabetic medicinal plants and their effect on GLUT4 translocation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.57, p.9-13, 1998.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Science**, v. 72, p. 2101–9, 2003.

KEDAR, P.; CHAKRABARTI, C.H. Effects of jambolan seed treatment on blood sugar, lipids and urea in streptozotocin induced diabetes in rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 27, p. 135-140, 1983.



KELKAR, S.M.; KAKLIJ, G.S. A simple two-step purification of antidiabetic compounds from *Eugenia jambolana* fruit-pulp: proteolytic resistance and other properties. **Phytomedicine**, v.3, p.353–359, 1996.

KIM, H.M. et al. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n.2, p. 125–131, 1998.

KITCHEN B. J., MASTERS C. J. Purification and properties of bovine mammary gland N-acetyl+n-ghi-cosaminidase. **Biochemica et biophysica Acta**, v. 831, p. 125-132, 1985.

KONUK, M. et al. ALA-D ( $\delta$ -aminolevulinic Acid Dehydratase) as biosensor for Pb contamination. In: SOMERSET, V. S. (Ed) **Intelligent and Biosensors**, Croatia: intech, 2010, 386p.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D.S. Herbal treatment in gastrointestinal and liver disease-benefits and dangers. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.15, p.1239-1252, 2001.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: \_\_\_\_\_ SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, p. 247-262. 2004.

LEWAN L., ANDERSSON M., MORALES-GOMEZ P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297–301, 1992.

LIEDGENS, W., LUTZ, C., SCHNEIDER, H. A. W. Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*. **European Journal of Biochemistry**, v. 135, p. 75-79, 1983.

LOGARTO, P. A. et al. Comparative study of the assay of *artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

LOZOYA, X. Investigación y Ciencia, 254, Apud: R. A. YUNES, V. CECHINEL Filho, Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: \_\_\_\_\_ R. A. YUNES, J. B. CALIXTO, **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC, Argus, 2001, 523 p.

MAGALHÃES, A.S.M. **Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller, na danificação oxidativa em eritrócitos humanos**. 2009. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2009.

MARCHEWKA, Z. et al. N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase isoenzymes in the diagnosis of poisoning and kidney diseases. **International Urology and Nephrology**, v. 26, p. 229-236, 1994.

MARKHAM G. D., et al. Spatial proximity and sequence localization of the reactive sulfhydryls of porphobilinogen synthase. **Protein Science**, v. 2, p. 71–79, 1993.

MARODIN, S. M.; BAPTISTA, L. R. M. O uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.4, n.1, p.57-68, 2001.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MAZAHERI, M., SAMAIE, A., SEMNANI, V. Renal tubular dysfunction measured by N-acetyl-beta glucosaminidase/creatinine activity index in children receiving antiepileptic drugs: a randomized controlled trial. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 37, n. 21, 2011.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-55, 1969.

McLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato disk & brine shrimp lethality : two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: Dey, P. M.; Harborne, J. B. **Method in Plant Biochemistry**. Academic Press, 1991.

MELO, A.E.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MENTZ L. A. et al. Solanaceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil – Listagem II: *Solanum* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1059-1061, 2007.

MENTZ, L. A., OLIVEIRA, P. L. **O Gênero Solanum na Região Sul do Brasil**. Pesquisas, Séries Botânica, v. 54, p. 1-327, 2004.

MENZIES, J. S.; BRIDGES, C. H., BAILEY, E. M. A neurological disease of cattle associated with *Solanum dimidiatum*. **South Western Veterinarian**, v.32, pp. 45–49, 1979.

MEREDITH, P. A., MOORE, M. R., GOLDBERG, A. Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 56, p. 61–69, 1979.

MESIA-VELA, S. et al. *Solanum paniculatum* L (jurubeba): potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 508-514, 2002.

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

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 7 jul. 2010. Disponível em: <  
<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-pais-deixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml> >. Acesso em: 21 out. 2013.

MIKSTACKA, R., RIMANDO, A. M., IGNATOWICZ, E. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. **Plant Foods For Human Nutrition**, v. 65, p. 57-63, 2010.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 21–28, 2004.

MIZ, R. B., Estudo filogenético das espécies da seção torva do gênero *Solanum* L. (*Solanaea*) na região sul. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Rio Grande do Sul. 2006

MOHANTY, S.; COCK, I. E. Bioactivity of *Syzygium jambos* methanolic extracts: Antibacterial activity and toxicity. **Pharmacognosy Research**, v. 2, p.4-9, 2010.

MOHD-FUAT, A. R.; KOFI, E. A.; ALLAN, G. G. Mutagenic and cytotoxic properties of three herbal plants from Southeast Asia. **Tropical Biomedicine**, v. 24, n. 2, p. 49-59, 2007.

MONTINE K. S. et al. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 128, p. 117–124, 2004.

MORA, S. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, p. 373–378, 2005.

MOREIRA, F. **As Plantas Curam**. Hermus Liv. Ed. Ltda: São Paulo, 1978.

MOREIRA, H.J.C.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de Identificação de plantas infestantes - Cultivos de verão**. Campinas – SP, 2010, P. 558-9.

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

MURUGANANDAN, S. et. al. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v.72, p.369–375, 2001.

- NANDI, D. L., SHEMIN, D. Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides* II. Association to polymers and dissociation to subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 1231–1235, 1968.
- NANDI, D. L., SHEMIN, D. ALA-D of *Rhodopseudomonas capsulatus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 158, p. 305-311, 1973.
- NAZIR, S. et. al. Brine shrimp lethality assay 'an effective prescreen': microwave-assisted synthesis, BSL toxicity and 3DQSAR studies-based designing, docking and antitumor evaluation of potent chalcones. **Pharmaceutical biology**, v. 51, p. 1091-103, 2013.
- NEAL, R., et al. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicology Letters**, v. 91, n.3, p. 169-78, 1997.
- NEE, M. Synopsis of *Solanum* in the New World. In: NEE, M.; SYMON, D.E.; LESTER, R.N., JESSOP, J. P. (eds.) **Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1999, p. 285-333.
- NEGRELLE, R. R. B. et al. Estudo etnobotânico junto à Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.6-22, 2007.
- NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M. Brine shrimp toxicity and antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Msambweni district of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 988-92, 2013.
- NIETO-CERÓN, S. et al. Molecular properties of acetylcholinesterase in mouse spleen. **Neurochemistry International**, v. 45, p. 129–139, 2004.
- NIZRI, E.; HAMRA-AMITAY, Y. Antiinflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, p. 540–7, 2006.
- NOGUEIRA, C. W. et al. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso- 2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmiuminduced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology**, v. 184, p. 85–95, 2003a.
- NOGUEIRA, C. W. et al. Organochalcogens effects on aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v. 191, p. 169-178, 2003b.
- NOOROZI, M., ANGERSON, W.J., LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, n.6, p.1210-1218, 1998.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OECD. **Guideline 423**. Acute oral toxicity – acute toxic class method. adopted by the council on 17th december. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France 2001.

OLALEYE, M. T., ROCHA, J. B. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.59, p. 319–327, 2008.

OLBRICHT, C. J. Distribution of cathepsins B and L in the kidney and their role in tubular protein absorption. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 675-81, 1992.

OLIVEIRA, R. C. M. et al. Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sendtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p.146-151, 2006.

OMS (2003) Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Genebra:OMS.

OSKARSSON, A.. Effects of perinatal treatment with lead and dissulfiram on ALA-D activity in blood, liver and kidney and urinary ALA excretion in rats. **Pharmacology and Toxicology**, v. 64, p. 344–348, 1989.

PANDE, M. et al. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 9, p. 173–184, 2001.

PANDE, M., FLORA, S. J. S. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of  $\alpha$ -lipoic acid and succimers in rats. **Toxicology**, v. 177, p. 187– 196, 2002.

PAPPAS, J. B. et al. Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 133, p. 121–129, 1995.

PARENTE, C. E. T., ROSA, M. M. T. Plantas comercializadas como medicinal no município de Barra do Piraí, RJ. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 47-59, 2001.

PAULOVICH, F. B. et al. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var *fastigiatum* intoxicated cattle. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v.49, n.9, p.473, 2002.

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

PICONI, L.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A. Oxidative stress in diabetes. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v. 41, n. 9, p. 1144-9, 2003.

PILLA, M.A.C.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.4, p.789-802, 2006.

PINN G. Adverse effects associated with herbal medicine. **Australian Family Physician**, v.30, p. 1070-1075, 2001.

PIRES, J. B., MIEKELEY, N., DONANGELO, C. M. Calcium supplementation during lactation blunts erythrocyte lead levels and deltaaminolevulinic acid dehydratase zinc reactivation in women nonexposed to lead and with marginal calcium intakes. **Toxicology**, v. 175, p. 247–255, 2002.

PLANTS OF HAWAII. *Syzygium jambos*. 2005. Disponível em: <<http://www.starrenvironmental.com/images/species/?q=syzygium+jambos&o=plants>>. Acesso em 29 dez. 2013.

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

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

PRANCE, G. T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.64, p. 559-684, 1977.

PRIETO, P et al. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PRINCE, R. G. The role of NAG (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. **Clinical Nephrology**, v. 38, p. 14-9, 1992.

PRINCE, P. S. M.; MENON, V. P.; PARI, L. Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p.1–7, 1998.

RAHMAN, N. et al. Phytochemical, antimicrobial, insecticidal and brine shrimp lethality bioassay of the crude methanolic extract of *Ajuga parviflora* Benth. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 26, p. 751-6, 2013.

RAJEH, M. A. B. et al. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. **Pharmacognosy Research**, v. 4, p. 170–177, 2012.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.75-82, 1995.

RANG, H. P. et al. Dependência e abuso de fármacos. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, Sao Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATSIMAMANGA, A.R. et al. Nouvelle contribution à l'étude de l'action d'un principe hypoglycémiant mis en évidence dans d'écorce jeune de *Eugenia jambolana* (Myrtacées) sur l'hyperglycémie l'hyperglycémie provoquée du lapin normal ET poursuite de sa purification. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Serie D, Sciences Naturelles**, v.277, p. 2219-2222, 1973.

RAVI K. et al. Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 2717–2731, 2004.

REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.1-2, p.22-53. 2007.

RIBEIRO, S. R. et al. Avaliação da atividade antioxidante de *solanum paniculatum* (solanaceae). **Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIET-CORREA, F. et al. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. **Cornell Veterinary**, v.73, n. 3, p.240-56, 1983.

ROCHA et al. Aminolevulinatase (δ-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicology Research**, v. 1, p. 85 – 102, 2012.

RODDICK, J.G. The importance of the Solanaceae in Medicine and drug Therapy. In: \_\_\_\_\_ Hawkes JG., Lester RN, Nee M and Estrada N (eds) **Solanaceae III- Taxonomy, chemistry, Evolution**. Kew. Royal Botanic Gardens and Linnean Society of London, pp. 73, 1991.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; DE SIMONI, C. Fitoterapia na Saúde da Família. In: Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade (Org.). **Programa de Atualização em Medicina de Família e Comunidade** (PROMEF). Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2011. p. 31-65.

ROMERO, M. J. Acción cardiovascular de extractos acuosos de hojas de *Syzygium jambos* (L.) Alston. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**, v.16, p.17-25, 1995.

SABIR, S. M.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false "Jurubeba") against paracetamol-induced liver damage in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.226-232, 2008.

- SADOWSKA-WODA, I. et al. Protective effect of desloratadine against oxidative stress in human erythrocytes in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.30, n.2, p.141-146, 2010.
- SALEM, M. A. et al. Urinary excretion of *N*-acetyl-beta-d-glucosaminidase and retinol binding protein as alternative indicators of nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatric Diabetes**, v. 3, p. 37–41, 2002.
- SANTOS, F. W. et al. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 255–263, 2004.
- SARAIVA R. A. et al. Molecular docking studies of disubstituted diaryl diselenides as mammalian  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase enzyme inhibitors. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 75, p. 1012–1022, 2012.
- SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature Reviews**, v. 6, p. 48-56, 2005.
- SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In:\_\_\_\_\_. KOTYK, A. et al. (Eds.), **Highlights of Modern Biochemistry**, Utrecht: VSP, v. 1, 1989, p.329-38.
- SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, p. 8940-8949, 1995.
- SCHEERS, M. E.; EK WALL, B. A.; DIERICKX, J. P. In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on HepG2 cells and comparison with acute human toxicity data. **Toxicology in Vitro**, v.15, p. 153–161, 2001.
- SCHENKEL, E. P. et al. O controle de qualidade de insumos vegetais e fitoterápicos na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do sul. **Caderno de Farmácia**, v.2, n.2, p. 139-151, 1986.
- SCHULTES, R. E. Ethnopharmacological conservation: a key to progress in medicine. **Acta Botanica**, v. 18, n. 1/2, p. 393-406, 1988.
- SEEF, L. B. Herbal hepatotoxicity. **Clinical in liver disease**, v. 11, p. 577–596, 2007.
- SEPAHA, G. C.; BOSE, S. N. Clinical observations on the antidiabetic properties of *Pterocarpus marsupium* and *Eugenia jambolana*. **Journal of the Indian Medical Association**, v.27, p.388-91, 1956.
- SHARMA S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 367–373, 2006.
- SHEMIN, D. Aminolevulinic acid dehydratase. **Enzymes**, v. 7, p. 323-337, 1972



SHIVA SHANKAR REDDY, C. S. et al. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. **Toxicology In Vitro**, v.21, p.1355-1364, 2007.

SHOOLINGIN-JORDAN P. M. Structure and mechanism of enzymes involved in the assembly of the tetrapyrrole macrocycle. **Biochemical Society Transactions**, v. 26, p. 326–336, 1998.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293–302, 2005.

SILVA, T. M. S. et al. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, p. 517-22, 2003.

SILVA T. M. S., AGRA, M. F., BHATTACHARYYA, J. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 292-293, 2005.

SILVA, T. M. S. et al. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 17, p.35-38, 2007.

SILVA–ALMEIDA, M.F.; AMOROZO, M. C. M. Medicina popular no Distrito de Ferraz, Município de Rio Claro, Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Ecology**, v.2, p. 36–46, 1998.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 4.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1995.174p.

SIMOES C. M., SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária integração da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 35-40, 2002.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento**. Brasil, 2010. Disponível em URL: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em 29 setembro de 2013.

SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**, v. 222, p.1-15, 1984.

SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p.9-11, 1994.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBRAL, M. et al. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37162>>. Acesso em 20 de outubro de 2013.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de produtos fitoterápicos. In: SIMÕES et al (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 289-326. Cap. 12, 2007.

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

SOUZA, A. C. G. et al. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. **Life Science**, v. 84, p. 351–357, 2009.

SPENCER, C. M. et al. Polyphenol complexation-some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2397-2409, 1988.

STAMMATI, A et al. Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology. **Toxicology In Vitro**. v. 19, n.7, p. 843-844, 2005.

STEHMANN, J.R. et al. *Solanaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37162>>. Acesso em 20 de outubro de 2013.

TANDON, S. K. et al. Reversal of lead induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. **Environmental Research**, v. 90, p. 61–66, 2002.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza on line**, v.4, n.1, p.30-39, 2006.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. **Acetylcholine**. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. In: SIEGEL, G. J. et al. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 214-242, 1999.

TEDESCO I. et al. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 11, 114–119, 2000.

TEIXEIRA, C.C.; et al. Effect of tea prepared from leaves of *Syzygium jambos* on glucose tolerance in nondiabetes subjects. **Diabetes Care**, v. 13, p. 907–908, 1990.

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

TEIXEIRA, C. C.; et al. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 343–347, 2000.

THOMPSON J., D., JONES, D., BEASLEY, W. H. The effect of metal ions on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 34, p. 32–36, 1977.

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

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANOS, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 570, p. 167-78, 1979.

TUROLLA, M. S. R.; Nascimento, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289 – 306, 2006.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1685-96, 2000.

UNITED NATIONS. **Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)**. 4 edição. New York and Geneva, 2011.

VALADARES, Y. M. ET al. Antiviral activity of *Solanum paniculatum* extract and constituents. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 64, n. 11-12, p. 813-8, 2009.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL<sub>50</sub>”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALE, N. B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-80, 2002.

VALÉCIO, M. Fitoterápicos crescer e aparecer. **Fito 2013** - Conteúdo dirigido aos profissionais da saúde. Disponível em: <<http://www.guiadafarmacia.com.br/fito-2013/fitoterapicos-crescer-e-aparecer>>. Acesso em: 29 setembro de 2013,

VALENTINI J. et al. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 62, p. 378–382, 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VAN ACQUIRE, S. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERDES, J.M. et al. Cerebellar degeneration in cattle grazing *Solanum bonarienses* ("Naranjillo") in Western Uruguay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.299-303, 2006.

VERNANI, K.; GARG, S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 49-66, 2002.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. Atheneu, 1996.

WARREN M. J. et al. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, p. 217–221, 1998.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 369–376, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Regional office for the Western Pacific. Manila: WHO, 1993. 86p.

WHO. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. Geneva, 2001.

WHO. **WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. Geneva, 2004.

WHO. **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: 2011, 12p.

YASAR, S. N. et al. Central nervous system activities of *Hypericum organifolium* extract via gabaergic and opioidergic mechanisms. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 877-84, 2012.

ZIBADI, S. et al. Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. **Nutrition Research**, v .27, p.146-151, 2007.