

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho

**MECANISMOS DE TOXICIDADE DE *Duguetia furfuraceae* A.
St.-Hill NO MODELO DE *Drosophila melanogaster* E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO.**

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

PPGBT/UFSM, RS PINHO, Francisca Valéria Soares de Araújo DOUTOR

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho

**MECANISMOS DE TOXICIDADE DE *Duguetia furfuraceae* A. St.-Hill NO MODELO
DE *Drosophila melanogaster* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO.**

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

Orientadora: Profa. Dr^a. Thaís Posser
Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Santa Maria, RS, Brasil
2015

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

Pinho, Francisca Valéria Soares de Araújo
Mecanismos de Toxicidade de *Duguetia furfuracea* A.St.-
Hill no modelo de *Drosophila melanogaster* / Francisca
Valéria Soares de Araújo Pinho.-2015.
77 p.; 30cm

Orientadora: Thaís Posser
Coorientadora: Irwin Rose de Alencar Menezes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2015

1. *Duguetia furfuracea* 2. *Drosophila melanogaster* 3.
Cinase regulada por sinal extracelular- ERK 4. Estresse
oxidativo 5. *Candida albicans* I. Posser, Thaís II.
Menezes, Irwin Rose de Alencar III. Título.

2015

Todos os direitos autorais reservados a Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: valeriapinho12@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

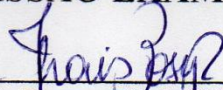
A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**MECANISMOS DE TOXICIDADE DE *Duguetia furfuraceae* A. St.-Hill
NO MODELO DE *Drosophila melanogaster* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIFÚNGICO.**

elaborada por
Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

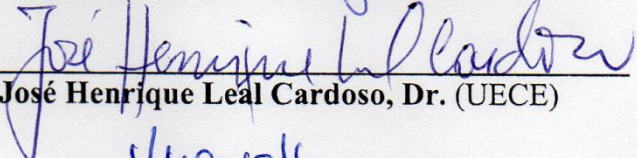
COMISSÃO EXAMINADORA



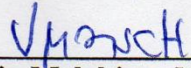
Thais Posser, Dr^a (UNIPAMPA)
(Presidente/Orientadora)



Caroline Wagner, Dr^a (UNIPAMPA)



José Henrique Leal Cardoso, Dr. (UECE)



Vera Maria Melchior Morsch, Dr^a (UFSM)



Maribel Antonello Rubin, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 04 de Dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus amores Ivanildo, Lucas, Tiago e Letícia por ter vocês em minha vida.
- A meu pai Wilton (*in memoriam*) que me estimulou na busca pelo conhecimento e a minha mãe Nazaré que me ajudou na realização desse sonho.
- Aos demais membros de minha família que se mostraram solícitos diante das dificuldades enfrentadas.
- Aos amigos especiais Valter Menezes Barbosa Filho e toda família, Francisco Elizauo de Brito Junior e Dayanne Rakelly de Oliveira, pela alegria da convivência com vocês durante o trabalho e amparo nas horas difíceis.
- A Gustavo Felipe da Silva por sua especial dedicação e trabalho realizado nesta pesquisa, a Emily Pansera Waczuk e Litiele Cezar da Cruz pelo auxílio prestado e por compartilharem suas experiências laboratoriais.
- A minha orientadora Dra. Thaís Posser e ao Dr. Jeferson Luis Franco pelos ensinamentos e apoio fundamental para a realização desta pesquisa.
- A Jean Paul Kamdem pela colaboração na revisão final do artigo produzido.
- Ao Dr. João Batista Teixeira da Rocha pela importante contribuição para o aprimoramento da pesquisa na URCA.
- A Dra. Margareth Linde Athayde (*in memoriam*) do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria por seu apoio durante os testes de caracterização fitoquímica das amostras.
- A todos os professores UFSM e UNIPAMPA que contribuíram com suas aulas para o aprimoramento desse doutorado.
- A Elba Celestina Sobral Souza e Nadghia F. Leite e Saulo Relison Tintino pelo apoio durante os testes realizados no laboratório de Microbiologia da URCA.
- Aos alunos da URCA Rafaela Matos Carneiro, Jordânia Oliveira de Sousa, Cássio Anderson da Silva, Valter Sales e Antônia Priscila Pereira pela valiosa participação de vocês nos testes iniciais desta pesquisa.
- As professores Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes e Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pelas orientações prestadas.
- A Dra. Marta Regina Kerntopf por sua contribuição para a realização do DINTER e pela indicação da planta (*Duguetia furfuracea*) para essa pesquisa.
- Ao Dr. José Galberto Martins Costa e Prof^a. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues pelo apoio e receptividade para a realização dos testes iniciais desse trabalho.

- A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica por tornar o DINTER possível.
- A Universidade Federal do Pampa, campus São Gabriel por disponibilizar sua estrutura laboratorial para a realização da etapa experimental desta pesquisa.
- A Universidade Regional do Cariri – URCA e colegas do Departamento de Enfermagem pelo apoio e credibilidade em meu aprimoramento profissional.
- A CAPES pelo suporte financeiro destinado a este programa de Doutorado.
- A Faculdade de Juazeiro do Norte – FJN pela receptividade e apoio da direção e dos funcionários que possibilitaram a realização dos testes iniciais desta pesquisa.

RESUMO

MECANISMOS DE TOXICIDADE DE *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill NO MODELO DE *Drosophila melanogaster* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO.

AUTORA: Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho

ORIENTADOR(A): Thaís Posser

CO-ORIENTADOR: Irwin Rose Alencar de Menezes

Duguetia furfuracea é um arbusto comum em áreas do cerrado brasileiro, conhecida como “ata brava”, costuma ser usada como planta medicinal especialmente no combate a cólica renal e reumatismo. Entretanto, estudos farmacológicos com extratos obtidos de diferentes partes dessa planta têm evidenciado atividades citotóxica, bactericida e antitumoral. Assim, esse trabalho teve como objetivos identificar e quantificar os compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EHDF) e frações metanólica (Mt-OH) e acetato de etila (Ac-OEt) por meio de HPLC, e realizar triagem fitoquímica para diferentes classes de compostos. Ainda avaliar a atividade antioxidante por meio dos ensaios DPPH e FRAP, a toxicidade do extrato bruto no modelo de *Drosophila melanogaster*, a atividade antifúngica e modulatória do extrato e frações. A triagem fitoquímica revelou presença de alcalóides, taninos, xantonas, chalconas, flavonoides, auronas e ácidos fenólicos. A análise por HPLC no EHDF revelou como principais componentes ácido caféico ($33,17 \pm 0,03$ mg/g) e rutina ($20,56 \pm 0,01$ mg/g), para a fração Mt-OH, o ácido caféico ($32,47 \pm 0,03$ mg/g) e quercitrina ($31,96 \pm 0,03$ mg/g), e para Ac-OEt, quercitrina ($32,97 \pm 0,03$ mg/g) e isoquercitrina ($31,56 \pm 0,01$ mg/g). Os mais altos níveis de fenóis e flavonoides totais foram encontrados na fração Ac-OEt, entretanto, o extrato bruto apresentou maior poder antioxidante (*in vitro*) do que as frações. A toxicidade do extrato foi confirmada no modelo *in vivo* *Drosophila melanogaster*. O extrato promoveu aumento significativo da mortalidade no terceiro dia de exposição das moscas nas concentrações mais altas (100 e 200mg/ml). A concentração de 50mg/ml promoveu redução na motilidade das moscas. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi aumentada nas moscas expostas as concentrações de 1 e 10 mg/ml e inibida na concentração de 50 mg/ml do EHDF. A viabilidade celular das moscas foi significativamente comprometida em todas as concentrações do EHDF (1; 10 e 50mg/ml) embora tenha sido observado um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio apenas nas moscas expostas a concentração de 50mg/ml. Nesse contexto foram avaliadas as defesas antioxidantes de *D. melanogaster*. A exposição das moscas as concentrações de 1 e 10 mg/ml do HEDF resultou em aumento significativo na atividade das enzimas Glutathione s-transferase (GST), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), entretanto, na concentração de 50 mg/ml do extrato, houve diminuição na atividade da GST sem alterações na atividade da SOD e CAT. A clivagem da PARP, investigada como índice geral de morte celular por apoptose, foi confirmada nas moscas expostas a todas as concentrações do EHDF. Ainda a exposição das moscas a 10 mg/mL do EHDF aumentou significativamente a fosforilação de ERK. O extrato e frações testados contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* não apresentaram atividade fungicida considerando que a concentração inibitória mínima (CIM) foi $\geq 1,024$ µg/ml para todas as estirpes de fungos testadas. Entretanto, o extrato e as frações Ac-OEt e Mt-OH apresentaram efeito sinérgico quando associadas ao fluconazol, indicando ação moduladora contra fungos mediante associação a medicamento clinicamente relevantes. O EHDF e a fração Mt-OH

potencializaram o efeito do fluconazol quando testados contra a *C. krusei*, e a fração Mt-OH também apresentou sinergismo com fluconazol contra *C. tropicalis*. A fração Ac-OEt potencializou o efeito do fluconazol contra *C. albicans*. O conjunto dos resultados sugere que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo importante subjacente a toxicidade induzida por *Duguetia furfuracea* em *Drosophila melanogaster*, e atividade modulatória do extrato e frações junto ao fluconazole amplia as aplicações biomédicas de *Duguetia furfuracea*.

Palavras-chave: *Duguetia furfuracea*, estresse oxidativo; *Drosophila melanogaster*; cinase regulada por sinal extracelular (ERK), *Candida albicans*, atividade antioxidante.

ABSTRACT

MECHANISMS OF TOXICITY OF *Duguetia furfuracea* A. St.-Hil. IN *Drosophila melanogaster* AND EVALUATION OF ITS ANTIFUNGAL POTENTIAL

AUTHOR: Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho

ADVISOR: Thaís Posser

CO-ADVISOR: Irwin Rose Alencar de Menezes

Duguetia furfuracea is a common shrub from Brazilian cerrado areas, known as "ata brava", often used as a medicinal plant especially in treatment of renal colic and rheumatism. However, pharmacological studies with extracts obtained from different parts of this plant have shown cytotoxic activity, bactericidal and anti-tumor. Thus, this study aimed to identify and quantify the phenolic compounds of the hydroalcoholic extract of leaves *D. furfuracea* (HEDF), methanol (Mt-OH) and ethyl acetate (Ac-OEt) fractions by HPLC, and carry out phytochemical screening for different classes of compounds. In addition the antioxidant activity by the DPPH and FRAP assays, toxicity of the crude extract in the *Drosophila melanogaster* model, and the antifungal/modulatory activity were evaluated. The phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, tannins, xanthenes, chalcones, flavonoids, aurones and phenolic acids. HPLC analysis revealed that major components of HEDF were caffeic acid (33.17 ± 0.03 mg/g) and rutin (20.56 ± 0.01 mg/g), for the Mt-OH fraction were, caffeic acid (32.47 ± 0.03 mg/g) and quercitrin (31.96 ± 0.03 mg/g), and for Ac-OEt fraction were, quercitrin (32.97 ± 0.03 mg/g) and isoquercitrin (31.56 ± 0.01 mg/g). Although highest levels of phenols and total flavonoids were found in Ac-OEt fraction, the crude extract showed the highest antioxidant (*in vitro*) potential. The toxicity of the extract was confirmed (*in vivo*) associating the extract with standard diet of *D. melanogaster* at different concentrations. The extract caused a significant increase in mortality on the third day of exposure of flies at higher concentrations (100 and 200 mg/ml). The 50mg/ml concentration promoted decrease in motility of flies. Interestingly, the activity of acetylcholinesterase (AChE) was increased in flies exposed to concentrations of 1 and 10mg/ml and inhibited by the concentration of 50 mg/ml of HEDF. The cell viability was significantly compromised flies at all HEDF concentrations (1, 10 and 50 mg/ml) although it has been observed a significant increase in production of reactive oxygen species flies exposed only in the concentration of 50mg/ml. In this context it was evaluated the influence of extract (*ex vivo*) in the activity of antioxidant defenses of *D. melanogaster* exposed to concentrations of 1 and 10 mg/ml of HEDF resulted in a significant increase in the activity of enzymes Glutathione s-transferase (GST), Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), however, for the concentration of 50 mg/ml of extract, there was a dramatic decrease in the activity of GST with no change in SOD activity and CAT. The cleavage of PARP investigated as a general index of cell death by apoptosis was confirmed in flies exposed to all HEDF concentrations. Yet exposure of the flies to HEDF 10 mg/mL significantly increased the phosphorylation of kinase ERK. The extract and fractions tested against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* showed no fungicidal activity since the minimum inhibitory concentration (MIC) was ≥ 1.024 μ g/ml for all fungal strains tested. However, the HEDF and the fractions Ac-OEt and Mt-OH had a synergistic effect when combined with fluconazole, indicating modulatory action against fungi when associated with clinically relevant medicine. The HEDF and the fraction Mt-OH potentiated the effect of fluconazole

when tested against *C. kruzei*, and the fraction Mt-OH also showed synergy with fluconazol against *C. tropicalis*. The fraction Ac-OEt potentiated the effect of fluconazol against *C. albicans*. The set of results suggests that oxidative stress may be an important mechanism underlying the toxicity induced by extract of *D. furfuracea* in *Drosophila melanogaster*. Additionally modulatory activity of the extract and fractions towards fluconazol improve the biomedical applications *D. furfuracea*.

Keywords: *Duguetia furfuracea*, oxidative stress; *Drosophila melanogaster*; extra-celular signal-regulated protein kinase (ERK), *Candida albicans*, antioxidant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - A planta, *Duguetia furfuracea*..... 23

ARTIGO

Tabela 1 - Quantification of phenolic compounds from the HEDE..... 32

Figura 1 - High performance liquid chromatography profile of HEDF..... 32

Figura 2 - Mortality curve of HEDF (0-200 mg/ml) exposed flies..... 33

Figura 3 - Locomotive performance in groups of 10 flies exposed to HEDF for seven days at doses of 1, 10 and 50 mg/ml by negative geotaxis test..... 33

Figura 4 - Effect of HEDF exposed flies on the activity of AchE..... 33

Figura 5 - MTT reduction of flies exposed to different concentration of HEDF for 7 days..... 34

Figura 6 - ROS production in response to exposure to HEDF (1-50 mg/ml) flies for seven days..... 34

Figura 7 - Levels of protein (PSH) and non-protein thiol (NPSH) in homogenates of files exposed to different concentrations of HEDF (1, 10 and 50 mg/ml) for 7 days..... 34

Figura 8 - Analysis of antioxidant enzymes activities after 7 days exposure of flies to various concentrations of HEDF. (a) GST, (b) SOD and (c) CAT..... 35

Figura 9 - Western blot analysis of the phosphorylated form of ERK (a) and p38^{mapk} (b) and PARP cleavage in homogenate of flies exposed to HEDF (1-50 mg/ml) for seven days..... 36

MANUSCRITO

Tabela 1 - Quantification of phenolic compounds of Me-OH and Ac-OEt..... 55

Tabela 2 - Total phenols and flavonoids present in extract and fractions of *D. furfuracea*..... 55

Tabela 3 - Antioxidant activity of HEDF and fractions of *D. furfuracea*..... 55

Figura 1 - Elution profiles of high performance liquid chromatography analysis a) methanolic (Mt-OH) and b) ethyl acetate (Ac OEt) fractions..... 56

Figura 2 - Modulatory activity of a) HEDF b) Mt-OH and c) Ac-OET against the fungi *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	- Acquired Immunodeficiency Syndrome
AchE	- Acetilcolinesterase
CAT	- Catalase
DCFH-DA	- Dicloro-dihidro-fluoresceina diacetato
DTT	- Dithiothreitol
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
DMSO	- Dimetilsulfoxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazina
EHDF	- Extrato Hidroalcoólico de <i>Duguetia furfuracea</i>
ERNs	- Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
ERK	- Extracellular signal-regulated kinase
FRAP	- Ferric Reducing Antioxidant Power
GSH-Px	- Glutaciona peroxidase
GSH-Rd	- Glutaciona redutase
GSH	- Glutaciona reduzida
GST	- Glutaciona S-transferase
HClO [·]	- Ácido Hipocloroso
HIV	- Human Immunodeficiency Virus
HPLC	- High performance liquid chromatography
JNK	- c-Jun-NH ₂ -terminal kinases
MAPK	- Mitogen activated protein kinase
MTT	- 2,5-difenil brometo de tetrazolina
NPSH	- Tióis não proteicos
NO [·]	- Óxido Nítrico
OH [·]	- Hidroxila
PARP	- Poly ADP-ribose polymerase
PSH	- Tióis proteicos
ROO [·]	- Peroxila
RO [·]	- Alcoxila
SOD	- Superóxido Desmutase
TPTZ	- 2,4,6-tripiridil-s-triazina

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1	INTRODUÇÃO 15
1.1	PLANTAS MEDICINAIS..... 15
1.2	POTENCIAL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS VEGETAIS..... 16
1.2.1	Atividade antioxidante 17
1.2.2	Extresse Oxidativo 18
1.2.2.1	<i>Drosophila melanogaster</i> 20
1.2.3	Atividade antimicrobiana 21
1.3	FAMÍLIA ANNONACEA: <i>Duguetia furfuracea</i> 22
1.3.1	Estudos etnobotânicos relacionados a <i>Duguetia furfuracea</i> 23
1.3.2	Estudos fitoquímicos e biológicos com <i>Duguetia furfuracea</i> 24
2	OBJETIVOS 27
2.1	OBJETIVO GERAL..... 27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 27
3	ARTIGO - Phytochemical constituents and toxicity of <i>Duguetia furfuracea</i> hydroalcoholic extract in <i>Drosophila melanogaster</i> 28
4	MANUSCRITO - Phytochemical composition, antifungal and antioxidant activity of <i>Duguetia furfuracea</i> A. St.-Hill 40
5	DISCUSSÃO 58
6	CONCLUSÃO 64
7	PERSPECTIVAS DO ESTUDO 65
	REFERÊNCIAS..... 66

APRESENTAÇÃO

Esta tese aborda assuntos relativos à linha de pesquisa de estresse oxidativo e patologias humanas associadas. Encontra-se estruturada da seguinte forma:

INTRODUÇÃO: Revisão da literatura com caracterização de temas abordados na tese.

MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO: apresentados na forma de dois artigos seguindo às normas dos respectivos periódicos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES: com interpretações e comentários sobre os resultados integrados do artigo e manuscrito à luz dos autores.

PERSPECTIVAS DO ESTUDO: aponta a possibilidade de novos estudos a partir dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS: no final da tese as referências utilizadas para a introdução e discussão.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em sua essência, princípios ativos que poderiam ser empregados no combate a diversas doenças (LIPP, 1996; BADKE et al., 2011). Milhares de espécies de plantas estão distribuídas em nosso planeta, mas apenas 17% foram pesquisadas de alguma forma, ficando um grande percentual sem estudos químicos, analíticos e farmacológicos (GRAGG; NEWMAN, 1999; SIMÕES; SCHENTEL, 2002).

Planta medicinal é considerada todo vegetal que tem sido utilizado e que lhes foram atribuídas ao longo do tempo e, em diversas culturas, propriedades terapêuticas. Com o advento da revolução industrial a geração de produtos sintéticos ganhou destaque como alternativa adicional ao tratamento das enfermidades. Entretanto, a utilização das plantas continua muitas vezes, como única estratégia de tratamento, frente às dificuldades socioeconômicas em alguns países (CALIXTO, 2000; XIONG et al., 2013; FOKOU et al., 2015).

As plantas sintetizam além dos metabólitos primários que são importantes para a realização de suas funções vitais, os metabólitos secundários, que são substâncias geralmente de estrutura complexa (esteroides, terpenos, alcaloides e compostos fenólicos). Estes são compostos envolvidos nos mecanismos de adaptação da planta ao meio ambiente e exibem grande potencial farmacológico (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O potencial farmacológico de plantas tradicionais da cultura brasileira vem sendo explorando como exemplo, em Asolini, Tedesco e Carpes (2006) e Baskar et al (2007) avalia atividade antioxidante de plantas utilizadas como chás no Brasil, foi identificada atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato de folhas de *Mucuna pruriens* (MOTTA et al, 2013) e Veras et al (2014) descreve atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Lippia siloides* contra *Enterococcus faecalis*.

As pesquisas com plantas continuam gerando no mundo novos produtos farmacologicamente ativos, especialmente no combate as patologias como câncer, doenças infecciosas, neurológicas e HIV /AIDS (CALIXTO, 2000; BALUNAS; KINGHORN, 2005; NANCE; SIWAK; SHEARER, 2009). Para tanto se faz necessário o apoio através do financiamento de projetos tanto por órgãos públicos quanto privados (FONTE; CAVALLET; BIASI, 2004). Ressalta-se também a necessidade de uma atuação multidisciplinar para

alavancar essa linha de pesquisa onde o potencial terapêutico das plantas nativas possa ser explorado de forma planejada e eficiente (WANG et al., 2011).

1. 2 POTENCIAL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Atualmente pesquisas na área da bioquímica e farmacologia tem se voltado para avaliação dos efeitos de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. Os extratos são preparações concentradas obtidos de diferentes partes das plantas (raiz, caule, folhas, cascas do caule, flores, frutos), através de processo que envolve o uso de solventes. Solventes pouco polares (hexano, benzeno, clorofórmio) podem extrair da planta mistura de compostos de baixa polaridade, enquanto compostos mais polares e hidrofílicos são extraídos com mais facilidade pelo uso de etanol ou metanol (MATOS, 2009). A triagem do potencial biológico de compostos vegetais geralmente tem início com uso de extratos brutos, segue com frações ativas e, finalmente evolui para o uso de compostos isolados (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002; CALIXTO et al., 2000).

A atividade biológica de um extrato depende de muitos fatores como constituição geral, estrutura química dos componentes, aspectos relativos à farmacocinética e farmacodinâmica, bem como as condições próprias do organismo alvo. Dentre as propriedades farmacológicas comuns a extratos naturais estão atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antiulcerogênicas e antimutagênicas (ERICKSON, 2003; RAO et al., 2004; KUMAR; PANDEY, 2013).

Constituintes fitoquímicos isolados de extratos vegetais, que pertencem as diferentes classes de metabólitos secundários, tem sido avaliados quanto a seus efeitos biológicos. Os terpenos constituem um vasto grupo e tem exibido atividades sedativa, ansiolítica, antinociceptiva, anticonvulsivante e antidepressiva (PASSOS, et al., 2009). Alguns esteroides vegetais são reconhecidos por suas propriedades antitumorais e hipocolesterolêmicas o que consequentemente, reduz os riscos para as doenças cardiovasculares (MICALLEF; GRAG, 2009). Os Alcaloides são conhecidos por promoverem acentuados efeitos sobre o sistema nervoso, tendo sido utilizados inicialmente como venenos ou alucinógenos. Em estudos mais recentes, têm sido descobertas outras finalidades terapêuticas como é o caso da vincristina e vimblastina (*Vinca rósea*) utilizadas no combate ao câncer (BOUFFET et al., 2012). Compostos fenólicos tais como antocianinas, catequinas e taninos têm sido identificados em pesquisas com atuação na prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (BRAVO, 1998; LIANG et al., 2015). Outras importantes atividades

atribuídas a esse grupo de compostos são ação anti-inflamatória, redução na permeabilidade capilar e na agregação plaquetária (COMALADA et al., 2005; FORMAGIO et al., 2014). Dentre os flavonoides, as antocianinas são glicosídeos com efeito antioxidante, algumas isoflavonas tem apresentado atividade anticancerígena (BAE et al., 2015; HEJASI et al., 2015) e, catequinas, tem sido utilizadas no combater a certos tipos de câncer e como estimulante do sistema imunológico (NANCE et al., 2009). Por ultimo os taninos em função de sua capacidade de conjugação a íons metálicos e macromoléculas, têm sido identificados com potencial inseticida (MONTEIRO, ALGUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; NIEMETZ; GROSS, 2005).

1.2.1 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias com capacidade de reagir com radicais livres e assim restringir seus efeitos danosos ao organismo. Os mecanismos de ação dos antioxidantes podem envolver: regulação nos níveis de EROs, eliminação de precursores dessas espécies reativas, quelação de metais e elevação dos antioxidantes endógenos (BEHLING, et al., 2004).

O potencial antioxidante dos extratos vegetais está fortemente relacionado ao seu conteúdo de compostos fenólicos, sendo bastante reativos quimicamente, são eficazes na prevenção da oxidação inibindo ou eliminando radicais livres, desempenhado assim, papel de proteção celular (SOTIBRÁN; ORDAZ-TELLEZ; RODRIGUES-ARNAIZ, 2011; KONG et al., 2012). Quimicamente, os compostos fenólicos possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. A atividade antioxidante desses compostos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Estudos com flavonoides isolados revelam a capacidade de regular a atividade de enzimas antioxidantes endógenas e de atuarem como detoxificantes (SOTIBRÁN; ORDAZ-TELLEZ; RODRIGUES-ARNAIZ, 2011; GOPALAKRISHNAN et al., 2013).

Para análise da capacidade antioxidante de uma amostra ou de um agente supostamente protetor deve-se levar em consideração que não existe um sistema único e completo (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006). Aspectos como o tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e a transferência de átomos de hidrogênio,

que são aspectos chaves na medida da capacidade antioxidante (BEHLING, et al., 2004). Para a análise de extratos vegetais é relevante também considerar a presença de compostos não antioxidantes, e que os efeitos de cooperação entre os diferentes constituintes (sinergismo) também possam interferir nos resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). Existe uma grande diversidade de métodos para medir atividade antioxidante de amostras biológicas, seja *in vitro* ou *in vivo* com suas vantagens e limitações (ANTOLOVICH et al., 2002; CRUZ et al., 2015).

Os métodos *in vitro* representam uma alternativa rápida e eficaz de triagem desse potencial para diferentes compostos. Método de sequestro de radical livre desenvolvido por Brand-Willams, Covelier e Berset (1995), está baseado na descoloração de uma solução composta de radicais estáveis DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio ou na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Já o FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) é um teste não baseado na capacidade de captura de radicais livres, mas na habilidade de redução do Ferro. Em meio ácido o complexo férrico tripiridiltriazina é reduzido a sua forma ferrosa de intensa cor azul na presença de antioxidantes, causando um aumento na absorbância a 595 nm. (ALVES, et al., 2010).

1.2.2 Estresse Oxidativo

Os benefícios descritos pela população que faz uso de plantas com fins medicinais, por vezes são acompanhados de efeitos indesejados que precisam ser ainda mais explorados. Assim como para certos fármacos, os efeitos biológicos pretendidos podem ser acompanhados ou até superados por efeitos adversos (KATSUNG et al., 2014a). A identificação e caracterização de compostos vegetais, bem como ampla avaliação de seu potencial farmacológico pode esclarecer os riscos associados ao uso indiscriminado destes extratos pela população.

Os mecanismos celulares envolvidos nos danos promovidos por agentes considerados tóxicos, incluindo compostos de origem vegetal, podem ser múltiplos, como alterações em proteínas específicas, células excitáveis, cálcio intracelular, fluidez das membranas, expressão gênica, prejuízo da síntese de ATP e geração de estresse oxidativo (LU et al., 2008; RANG et al., 2012; KATZUNG et al., 2014a).

Estresse oxidativo ocorre como resultado do desequilíbrio entre a formação excessiva de radicais livres e/ou alterações nos sistemas de defesa antioxidante. Esse processo é reconhecido como um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de doenças crônicas como câncer, enfisema, asma, inflamação, diabetes, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e neurológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; WIDLANSKY et al., 2005; WRIGHT; SCISM-BACON; GLASS, 2006). Assim, tem sido amplamente investigada a relação entre os benefícios do uso de produtos naturais ao seu elevado teor de agentes antioxidantes (KIM et al., 2005; NOSCHANG, et al., 2009).

Os radicais livres são bastante reativos em virtude de possuírem elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo agindo, portanto, como agentes oxidantes. Os radicais que estão mais envolvidas em processos patológicos são as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radiculares: superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxila (OH^{\cdot}) peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}); e as não-radicalares: oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HClO^{\cdot}$). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO^{\cdot}), óxido nitroso (N_2O) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Estes são formados *in vivo* durante o metabolismo celular normal, bem como mediante a exposição do organismo a uma série de estímulos tóxicos, como radiação ionizante e xenobióticos diversos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Condições onde a formação desses radicais é favorecida, por exemplo, como via final do processo de toxicidade de certos compostos, promovem lesões por meio de peroxidação lipídica das membranas, modificações oxidativas das proteínas e danos ao DNA (VALKO et al., 2007).

Os organismos contam com um sistema de defesa antioxidante que tem o importante papel de combater a ação deletéria dos radicais livres, sendo constituído pelos sistemas enzimáticos catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSH-Px), glutaciona redutase (GSH-Rd) e, não enzimáticos (Vit. A, E, C, e glutaciona-reduzida (GSH) (NOSCHANG et al., 2009). A primeira linha de defesa pode ocorrer através da ação detoxificadora do agente, antes que este possa promover lesão, e aumento nas defesas como glutaciona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutaciona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A segunda linha de defesa ocorre por mecanismos de reparo da lesão sofrida, constituída pelo ácido ascórbico, glutaciona redutase (GSH-Rd) e glutaciona peroxidase (GSH-Px), dentre outros. Com exceção da vitamina E (α - tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes se encontram no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O SNC é um dos tecidos mais susceptíveis ao estresse oxidativo, conta com níveis reduzidos de defesas antioxidantes, e com neurotransmissores como moléculas auto-oxidáveis, o que favorece ainda mais para formação de espécies reativas (SHINOHARA; YAMADA, 2015). (SLOTKIN, 2004).

As consequências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo de célula alvo e com seus diferentes níveis de intensidade. Os principais efeitos desse processo são aumento na taxa de divisão celular (proliferação celular); aumento nas defesas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e glutatona e alterações em biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. Essas alterações podem levar a comprometimento do sistema de divisão celular (senescência); e em casos de danos graves ao DNA, mitocôndria ou a outros alvos celulares, desencadear o processo de morte celular por apoptose ou necrose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2006)

1.2.2.1 Drosophila melanogaster

Conhecida como mosca da fruta, nos últimos anos vem sendo utilizada como modelo de triagem do potencial biológico de extratos vegetais e/ou componentes isolados, bem como, na avaliação da toxicidade de substâncias (drogas, poluentes ambientais) (MISRA et al., 2011). As vantagens desse modelo são ciclo de vida curto, facilidade de manutenção e de reprodução das moscas (KIM et al., 2011). Tem sido também empregado em pesquisas voltadas a descobertas de compostos com atividade no SNC e impacto nas desordens neurodegenerativas (TIWARI et al., 2011; SUDATI et al., 2013).

Alguns estudos revelam a toxicidade de compostos vegetais através da alteração de enzimas antioxidantes e/ou marcadores de neurotoxicidade em *D. melanogaster* (MIYAZAWA et al., 2004; ZEMOLIN et al., 2014), outros têm demonstrado efeitos protetores de extratos vegetais onde a presença de certos compostos bioativos podem ser responsáveis pela supressão direta de radicais livres ou podem, concomitantemente, induzir aumento nas defesas antioxidantes (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2009;). Como exemplo, Creatina atenua efeitos de estresse oxidativos gerados por substâncias tóxicas (rotenona e paraquat) em *D. melanogaster* (HOSAMANI; RAMESH; MURALIDHARA, 2010)

1.2.3 Atividade Antimicrobiana

As doenças infecciosas parasitárias são um dos grupos de enfermidades que afligem o ser humano, negligenciadas em muitos países, tendo por vezes, restritos investimentos nos métodos de prevenção, e na descoberta de novas opções de tratamento e cura. Os fármacos disponíveis atualmente apresentam muitas limitações especialmente ao se considerar os benefícios em detrimento aos níveis de toxicidade que promovem. São ainda responsáveis por diversos efeitos colaterais indesejáveis que em alguns casos, podem resultar em complicações clínicas graves (KATSUNG et al., 2014b).

A ocorrência de infecções fúngicas aumenta a taxas alarmantes, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS, transplantados, e recém-nascidos (ZHANG et al., 2009). Entre os agentes patogênicos, espécies de *Candida* estão geralmente associados a essas infecções, cuja incidência está atribuída a uma variedade de fatores (LEITE et al., 2014). O espectro dessas infecções é extenso, variando de manifestações leves até quadros sistêmicos (COUTINHO, 2009). Os tratamentos convencionais não têm sido muito eficazes, uma vez que as drogas disponíveis levam a efeitos secundários ou ao desenvolvimento de resistência (CHANDRASEKAR et al., 2011). Por conseguinte, a procura de novas drogas e terapias alternativas (incluindo os produtos naturais) para o tratamento de infecções por *Candida* tornou-se relevante (LOEFFLER; STEVENS, 2003; KATSUNG et al., 2014b).

Os extratos vegetais podem apresentar relevante potencial antimicrobiano e antitumoral. Um dos problemas que surgiu em paralelo ao desenvolvimento e ao sucesso de alguns antimicrobianos foi a capacidade dos microrganismos desenvolver mecanismos de contra-ataque. Os extratos representam alternativa importante, considerando a menor possibilidade de causarem resistência microbiana por serem misturas complexas, o que torna a adaptabilidade microbiana mais difícil (DAFERERA et al., 2003; ORHAN et al., 2010).

Nesse contexto, o caráter citotóxico identificado em muitas espécies de plantas incluindo algumas da família Annonaceae, tem se destacado com potencial para atividades antimicrobiana, antitumoral e inseticida (COSTA et al., 2013; FORMAGIO et al., 2014).

1.3 FAMÍLIA ANNONACEAE: *Duguetia furfuracea*

A família Annonaceae conta com cerca de 135 gêneros e mais de 2500 espécies onde os gêneros em maior destaque são *Anaxagorea*, *Annona*, *Ambavia*, *Artabotrys*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Cyathocalyx*, ***Duguetia***, *Guatteria*, *Goniothalamus*, *Mezzettia* e *Tetrameranthus* (CHATROU; KOEK-NOORMAN; MAAS, 2000; RICHARDSON et al., 2004). Possui distribuição tropical e subtropical, a maioria sendo ainda pouco exploradas econômica e cientificamente (NUNES et al., 2012). Na América do Sul predominam os gêneros *Annona* Linne, *Guatteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil., *Xylopia* Linne e *Duguetia* St. Hil. (FECHINE et al., 2002). No Brasil essa família apresenta-se com 33 gêneros e 250 espécies como árvores, arbustos e lianas, com casca fibrosa. Suas folhas são simples, inflorescência reduzida a uma única flor terminal (SOUSA; LORENZI, 2005). Alguns gêneros são cultivados em função de possuírem frutos comestíveis (*Annona* e *Rollinia*), outras como fonte de madeira (*Cananga* e *Polyalthia*), e como fonte de óleo para produção de perfumes (*Xylopia*). Algumas espécies ganham destaque em pesquisas farmacológicas em função de terem apresentado atividade antifúngica e bacteriostática (CHATROU; KOEK-NOORMAN; MAAS, 2000).

O gênero *Annona*, é o de maior importância como fonte de frutos comestíveis dentre eles *Annona muricata* L., a gravioleira é uma árvore cujo fruto é muito consumido no Brasil e popularmente conhecido e como “graviola”, outro exemplo é *Annona squamosa* conhecida por “ata” ou “fruta do conde”. São utilizadas também suas folhas, frutos, sementes e raízes, por suas propriedades medicinais, contra nevralgias, reumatismo, anti-helmíntico e como fonte de antioxidantes. Este também é o gênero mais explorado sob o ponto de vista químico, com enfoque nos flavonoides. (ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; NUNES et al., 2012).

A espécie *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill é um arbusto que atinge cerca de 2 m de altura, folhas com cerca de 10 cm de comprimento e 3 cm de largura, possui flores solitárias, seu fruto é verde-claro globoso e estrobiliforme com até 8 cm de diâmetro (não comestível), sendo conhecido pela população brasileira como “araticum do cerrado” ou “ata brava” (Figura 1). Esta espécie é frequentemente encontrada em áreas campestres de cerrado, nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste do Brasil (LORENZI; SOUZA, 2008). *Duguetia furfuracea* apresenta a seguinte classificação taxonômica (REINO: vegetal; DIVISÃO: Magnoliophyta; CLASSE: Magnoliopsida; SUBCLASSE: Magnollidae; ORDEM, Magnoliales; FAMÍLIA: Annonaceae; SUB-FAMÍLIA: Annonoideae; GÊNERO: *Duguetia* (VAN ZUILEN; KOEK-NOORMAN; MAAS, 1995).

Figura 1. A planta, *Duguetia furfuracea*.



Fonte: Foto realizada na Floresta Nacional do Araripe (Crato-CE).

D. furfuracea é uma espécie nativa especialmente em regiões de cerrado brasileiro, cujas folhas, cascas do caule e sementes são utilizadas pela população com fins medicinais nas formas de infusão, decocção e banhos, considerando informações que são repassadas por gerações.

1.3.1 Estudos Etnobotânicos relacionados a *Duguetia furfuracea*

Um levantamento feito em comunidades rurais no sul do estado de Minas Gerais identificou um total de 167 espécies nativas com uso medicinal, e dentre as espécies indicadas, as folhas de *D. furfuracea* são usadas pela população na forma de infusão contra reumatismo e cólicas renais (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Em estudo sobre a sinopses das plantas do Nordeste do Brasil conhecidas como medicinais e venenosas, as cascas do caule e as sementes de *D. furfuracea* são utilizadas no combate a pediculose (AGRA et al, 2007). Outro estudo feito em um município do estado do Mato-Grosso, onde foram entrevistados 180 pessoas, com idade acima de 50 anos através de questionário, onde

foram abordadas informações sobre as espécies de plantas utilizadas pela população como anti-hiperlipidemiante e anorexígena. Dentre as espécies citadas, as folhas de *D. furfuracea* nesse estudo, são utilizadas na forma de infusão, com esse propósito (SILVA et al., 2010).

1.3.2 Estudos fitoquímicos e biológicos com *Duguetia furfuracea*

Em uma avaliação bibliográfica (*Web of Science; Sciverse Scopus e Google Acadêmico*) foram identificados poucos estudos científicos relativos a esta espécie. Breve resumo desses estudos está descrito abaixo, tendo sido agrupados em função das atividades farmacológicas identificadas. Ressalta-se que alguns estudos estão voltados para caracterização química de constituintes que foram isolados do extrato obtido dessa planta, em especial, alcaloides.

O potencial antimicrobiano de extratos e frações obtidos de diferentes partes de *D. furfuracea* é descrito nos seguintes estudos: extratos brutos de 31 espécies de plantas nativas do cerrado brasileiro foram avaliados quanto a sua atividade contra as forma promastigotas de *Leishmania donovani*, e formas amastigotas do *Tripanossoma cruzi*, dentre outros, o extrato hexânico da casca da raiz de *D. furfuracea* foi ativo contra a forma amastigota do *Tripanossoma cruzi* com IC_{50} de 6,6 $\mu\text{g/ml}$ (MESQUITA et al., 2005). Em pesquisa que avaliou a atividade larvicida de 190 extratos de 27 plantas de regiões do cerrado do Brasil contra o *Aedes aegypti*, o extrato de folhas e raízes de *D. furfuracea* teve destaque apresentando melhor atividade larvicida com LC_{50} de 56,6 $\mu\text{g/ml}$, perdendo apenas para *Annona crassiflora* com LC_{50} de 26,06 $\mu\text{g/ml}$ e *Cybistax antispyhillitica* com LC_{50} de 27,61 $\mu\text{g/ml}$ (RODRIGUES et al., 2006). Doze alcaloides e um flavonóide foram isolados do extrato de folhas e ramos, e avaliados quanto a sua atividade contra cepas tripomastigotas do *Tripanossoma cruzi*, mas apenas o alcaloide aporfínico com (R) de configuração (-)-asimilobine foi eficaz com IC_{50} de 57,2 mM (CAROLLO et al., 2006a). Carollo et al., (2006b) isolou outros dois alcaloides o N-Nitrosoanonaine e N-Nitrosoxylopine, do extrato alcaloídico das folhas secas de *D. furfuracea*. Outros alcaloides isodados dessa planta revelaram também atividades tripanocida e leishmanicida, o alcaloide Dicentrinone apresentou maior atividade leishmanicida (IC_{50} 0.01 μM) enquanto (-)-duguetine-N-óxido e (-)-duguetine apresentaram atividade contra todas as linhagens, e o (-)-duguetine foi o mais ativo contra as formas tripomastigotas (IC_{50} 9,32 μM) (SILVA, et al., 2009). Em Fernandes et al (2014) o extrato hexânico bruto das folhas e frações hexânica, metanólica e acetato de etila aparecem com

efeito modulatório junto a aminoglicosídeos (kanamycin, amikacin, neomycin e gentamicina) sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Alguns estudos avaliam o potencial citotóxico e antitumoral dessa planta. O extrato aquoso das folhas *D. furfuracea* foi administrado por gavagem a ratas que se encontravam no período do 5º ao 9º dia de prenhes (pré-implantação do blastocisto até a organogênese). As ratas apresentaram forte diarreia, epistaxe, perda de peso e hepatomegalia, caracterizando efeito tóxico. Os autores esclarecem que embora não tenha ocorrido um número significativo de abortos, os fetos em todos os grupos experimentais apresentaram malformações ou anomalias externas (TOLEDO et al., 2006). Em outro estudo foram isolados do extrato alcaloídico do caule subterrâneo os alcaloides inéditos até então para a espécie *D. furfuracea*: (-)-duguetine; dicentrinone; (-)-duguetine-N-óxido; (-)-N-metiltetraidropalmatina e (+)-N-metilglaucina. Todos se mostraram tóxicos nos testes com *Artemia salina* (SILVA, et al., 2007a). Em Silva et al., (2007b) alcalóides oxaporfínicos foram isolados de extratos alcaloídicos de *D. furfuracea*, *Duguetia glabriúscula* e *Unonopsis lindmanii*. Quatro deles foram testados contra células Hep2 (de carcinoma de laringe) que revelaram maior sensibilidade ao alcaloide (5) *O*-metilmoscatoлина (IC₅₀ 12,4µM) seguido de Liriodenina (IC₅₀ 44,3µM). O alcaloide Liriodenina vem sendo um dos mais testados e que aparece como potente inibidor de topoisomerase II, sendo esta ação relacionada a sua estrutura planar.

Além do potencial citotóxico, outros estudos tiveram por finalidade também avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de *D. furfuracea*. Uma avaliação do efeito da infusão das folhas de *D. furfuracea* através do teste ring-X-loss e teste da mancha da asa (SMART – Somatic Mutation and Recombination Test) em células somáticas e germinativas de *D. melanogaster* revelaram ausência de efeito genotóxico e mutagênico, além de evidente efeito modulatório (efeito antígenotóxico) sobre a atividade genotóxica do uretano (utilizado como controle positivo) Os autores sugerem a presença de flavonoides presente no extrato como responsáveis por essa atividade (COELHO et al., 2011). Em Silva et al (2012) o extrato liofilizado das folhas de *D. furfuracea* empregado no teste de indução (SOS-inductest), e no teste micronúcleo da medula óssea de camundongos, revelou ação citotóxica e ausência de ação genotóxica, sugerindo os autores que esta ação se deve a presença de alcaloides comuns ao gênero *Duguetia* e da família Annonaceae. Em Silva et al (2013) também buscaram avaliar a atividade antígenotóxica e anticitotóxica do extrato, tendo sido constatado esse efeito protetor, embora evidente aparece apenas para doses mais baixas dentre as utilizadas (abaixo de 5mg/ml no SOS-indutest e de 200mg/kg para o teste de micronúcleo de medula óssea), evidenciando assim o feito dose-dependente (SILVA, et al., 2013).

Em resumo, as pesquisas com *D. furfuracea* destacam seu caráter citotóxico, antimicrobiano e antitumoral, para muitos estudos esse potencial farmacológico foi relacionado especialmente, à estrutura química de alcaloides isolados de seus extratos.

Nesse contexto, as folhas dessa planta são utilizadas como infusões e por períodos prolongados por um grande número de pessoas, podem representar riscos para a saúde. Ainda, os estudos *D. furfuracea* são escassos, embora revelando seu caráter citotóxico, não há dados na literatura sobre os mecanismos envolvidos nessa toxicidade, nem sobre o potencial antioxidante e antifúngico dessa planta.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Duguetia furfuraceae* (EHDF) e sua influência sobre sistema de defesa antioxidante celular e vias de transdução de sinal em modelo de *Drosophila melanogaster*, bem como caracterizar os constituintes fitoquímicos do extrato e frações, e o potencial antioxidante e antifúngico *in vitro*.

Objetivos Específicos

Caracterizar os constituintes fitoquímicos através da:

- Identificação e quantificação de compostos fenólicos no EHDF e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes no EHDF;

Investigar o efeito do EHDF associado à dieta de *D. melanogaster* sobre:

- A taxa de mortalidade e desempenho locomotor;
- Viabilidade celular;
- Os níveis de ROs pela oxidação da DCFDA;
- Dosagem de tióis proteicos (PSH) e não protéicos (NSPH)
- Atividade das enzimas Catalase, Glutathione S-Transferase, Acetilcolinesterase e Superóxido Dismutase;
- A fosforilação e expressão de proteínas MAPKs;

Avaliar o potencial antioxidante e antifúngico *in vitro* do EHDF e frações através:

- Atividade sequestradora do radical DPPH;
- Método de redução do ferro – FRAP (ferric reducing antioxidante power);
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EHDF e frações contra as diferentes linhagens fúngicas (*Candida albicans*, *Candida kruzei* e *Candida tropicalis*);
- Determinação da atividade modulatória contra cepas fúngicas padrões quando combinados a antifúngicos.

3 ARTIGO:

**Phytochemical constituents and toxicity of *Duguetia furfuracea*
hydroalcoholic extract in *Drosophila melanogaster***

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho, Gustavo Felipe da Silva, Giulianna Echeverria
Macedo, Katiane Raquel Muller, Ana Paula Lausmann Ternes, José Galberto Martins da Costa,
Margareth Linde Athayde, Aline Augusti Boligon, Jean Paul Kamdem, Jeferson Luis Franco,
Irwin Rose Alencar de Menezes, Thaís Posser.

Periódico: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, (2014), p. 1-11.

Research Article

Phytochemical Constituents and Toxicity of *Duguetia furfuracea* Hydroalcoholic Extract in *Drosophila melanogaster*

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho,^{1,2} Gustavo Felipe da Silva,³
 Giuliana Echeverria Macedo,³ Katiane Raquel Muller,³ Illana Kemmerich Martins,³
 Ana Paula Lausmann Ternes,³ José Galberto Martins da Costa,¹
 Margareth Linde Athayde,⁴ Aline Augusti Boligon,⁴ Jean Paul Kamdem,^{2,5}
 Jeferson Luis Franco,³ Irwin Rose Alencar de Menezes,¹ and Thaís Posser³

¹ Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, 63100-000 Crato, CE, Brazil

² Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

³ Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

⁴ Departamento de Farmácia Industrial, Laboratório de Pesquisa em Fitoquímica, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Sala 1115, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

⁵ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Thaís Posser; thaisposser@hotmail.com

Received 28 May 2014; Revised 16 September 2014; Accepted 27 September 2014; Published 10 November 2014

Academic Editor: Wenchuan Lin

Copyright © 2014 Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Duguetia furfuracea is frequently used as a medicinal plant in Brazil. However, studies have evidenced its cytotoxic, bactericide, and antitumor activities. In the present study we aimed to evaluate the potential toxicity of hydroalcoholic leaves extracts of *D. furfuracea* (HEDF) in a *Drosophila melanogaster* model. Toxicity was assessed as changes in locomotor performance, mitochondrial activity, oxidative stress, MAPKs phosphorylation, and apoptosis induction after exposure to HEDF concentrations (1–50 mg/mL) for 7 days. The phytoconstituents of the plant were screened for the presence of alkaloids, tannins, xanthenes, chalcones, flavonoids, aurones, and phenolic acids. Exposure of adult flies to HEDF caused mitochondrial dysfunction, overproduction of ROS, and alterations in the activity of detoxifying enzymes GST, SOD and CAT. Induction of ERK phosphorylation and PARP cleavage was also observed, indicating occurrence of HEDF-induced cell stress and apoptotic cell death. In parallel, alterations in cholinesterase activity and impairments in negative geotaxis behavior were observed. Our study draws attention to the indiscriminate use of this plant by population and suggests oxidative stress as a major mechanism underlying its toxicity.

1. Introduction

The use of plant extracts in the treatment and/or prevention of various diseases including cancer and cardiovascular diseases is recognized since ancient time, and some of these plants have led to the development of an impressive number of new drugs [1, 2]. The growing use of plant extracts instead of synthetic compounds is primary because they are generally

regarded as safe, easily accessible, affordable, and culturally acceptable form of health care trusted by large number of people [3–6]. Despite the beneficial effects of plant extracts, there are substantial evidences suggesting they can cause cytotoxicity [7, 8]. Therefore, evaluation of the toxic effects of plant extracts used in folk medicine seems to be imperative since they are generally consumed by population without concerns on their toxicity [9].

Oxidative stress, caused by overproduction of free radicals and/or alterations in antioxidant defense systems, is implicated as a mechanism of toxicity of many synthetic and natural compounds [10]. The antioxidant cellular defense system including enzymatic (glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD)) and nonenzymatic (glutathione (GSH), ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), and β -carotene (vitamin A)) antioxidants act on reactive oxygen species (ROS) resulting from physiological or pathological processes [11]. Environmental stressors, toxic agents, and natural compounds as flavonoids [12–14] are reported to modulate the phosphorylation of mitogen activated protein kinases family (MAPKs), represented by ERK, c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), and p38^{MAPK} kinases, which participate in signaling pathways that are responsible for many cellular functions, such as growth, differentiation, and apoptosis.

Duguetia furfuracea, belonging to the Annonaceae family, is a perennial and shrubby species found in the Central West, Southeast, and Northeast regions of Brazil [15, 16]. It is popularly known as “Araticum-Miúdo,” “Araticum-seco,” and “Ata brava” and is used in Brazilian folk medicine as an antihyperlipidemic and anorectic agent [17]. Accordingly, *D. furfuracea* has also been reported in the treatment of rheumatism and renal colic [18], as an antiparasitary agent. The powder of its seeds is used in the treatment of pediculosis [19]. *D. furfuracea* has shown to exhibit larvicidal activity against *Aedes aegypti* [20], and isolated alkaloids from the stem bark of the plant have been reported to exhibit antitumoral, trypanocidal and leishmanicidal activities [21]. Although *D. furfuracea* have been used by population due its therapeutic properties, recently, attention has been paid regarding the toxicity of this plant species. The aqueous extract of the leaves of *D. furfuracea* presented toxic effect in pregnant rats [22]. Studies have demonstrated cytotoxic effects of the leaves of *D. furfuracea* in bacteria and animal models [23, 24].

Phytochemical analysis of essential oil from leaves of *D. furfuracea* revealed the presence of sesquiterpenoids [25] and the bark of the underground stem revealed the presence of the alkaloid, (-)-duguetine β -N-oxide [26]; in addition, flavonoids and several alkaloids [16] have been also described for aerial parts of *Duguetia furfuracea*. Previous studies demonstrated the at least five alkaloids isolated from this plant have cytotoxic, antitumoral, trypanocidal, and leishmanicidal activities [21], while sesquiterpenes are potential anticancer agents [27]. Flavonoids are recognized by their beneficial and prooxidative effects, depending on the concentration and frequency of exposure, presenting properties such as anti-inflammatory, diuretic, antimicrobial, antiviral, antioxidant, and proapoptotic [12].

In the present study, we investigated the potential toxicity of a hydroalcoholic extract from leaves of *D. furfuracea* (HEDF) in a fruit fly *D. melanogaster* model. The advantage of using this model is based on the fact that it raises few ethical concerns and has served as a unique and powerful model to study human genetics, diseases and for screening synthetic and natural compounds [28, 29]. Particularly, we investigated the behavioral (negative geotaxis assay and

acetylcholinesterase activity) and biochemical markers of oxidative stress and apoptotic cell death (ROS generation, cell viability, antioxidant enzymes, p38^{MAPK} and ERK phosphorylation, and PARP cleavage) following exposure of flies to HEDF up to seven days. In addition, the identification and quantification of phenolic compounds present in HEDF were carried out by HPLC.

2. Materials and Methods

2.1. Materials. Reduced glutathione (GSH), tetramethylethylenediamine (TEMED), sodiumorthovanadate (Na₃VO₄), Quercetin (Q4951), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Secondary antibodies (anti-rabbit IgG) horse radish peroxidase (HRP) conjugated, 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) DTNB (D8130), acetylthiocholine iodide (A5751), 1-Chloro, 2,4-dinitrobenzene (CDNB) (237329), and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (35845) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182), total anti-p38, anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204), and anti-total-ERK1/2 antibodies and b-actin were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Poly (ADP) ribose polymerase (PARP) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). SDS acrylamide, bis-acrylamide chloride, hybond nitrocellulose, and dithiothreitol (DTT) were obtained from GE Healthcare Life Division. Acetonitrile and formic, gallic, chlorogenic, ellagic, and caffeic acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Catechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, and kaempferol were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed using HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) prominence autosampler (SIL-20A) equipped with plunger pumps LC-20AT Shimadzu DGU connected to the integrator with 20A5 Degasser CBM 20A UV-VIS detector DAD (diode) and SPD-M20A LC 1.22 SP1 software solution. All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Plant Material. Leaves of *D. furfuracea* were collected from Barreiro Grande, Crato-Ceará (7°22'2.8"S, 39°28'42.4"W and altitude of 892 m above sea level), Brazil, in September 2011, and identified by Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva. A voucher specimen (n. 6703) was deposited in the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) of the Regional University of Cariri (URCA).

2.3. Preparation of Crude Ethanolic Extract. Fresh leaves (1,050 g) of *D. furfuracea* were washed with water, then crushed, and macerated with 99.8% of ethanol and water (1:1, v/v) for three days. The suspension was filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure and lyophilized to obtain 261.13 g of crude ethanolic extract. The dried extract was then kept frozen prior to use.

2.4. Preliminary Phytochemical Analysis. Classes of secondary metabolites were screened for the presence or absence

of alkaloids, tannins, xanthenes, chalcones, flavonoids, and aurones in HEDF, using the methods previously described by Matos [30]. This is a qualitative test based on visual observation of change in coloration or precipitate formation in addition to specific reagents.

2.5. Identification and Quantitation of Phenolic Compounds of HEDF by HPLC. 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 phase was water containing 1% formic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was 13% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20%, and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 80 min, respectively [31] with slight modifications. HEDF was analyzed at a concentration of 5 mg/mL. The presence of ten antioxidants compounds, namely, gallic, chlorogenic, ellagic, and caffeic acids, catechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, and kaempferol were investigated. The identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume 40 μL and the wavelength 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin, 325 nm for caffeic, ellagic, and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin, and kaempferol. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030–0.250 mg/mL for kaempferol, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, catechin, and rutin and 0.030–0.250 mg/mL for gallic, caffeic, ellagic, and chlorogenic acids. All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviations of the responses and the slopes using three independent analytical curves, as defined by [32]. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.6. *Drosophila melanogaster* Stock and Media. *Drosophila melanogaster* (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. The flies were maintained at 25 ± 1°C and 60–70% relative humidity. The diet was composed of 6 mL of cereal flour, corn flour, water, and antifungal agent (Nipagin) as previously described [14].

2.7. Experimental Procedure—Flies Exposed to HEDF

2.7.1. Mortality. In order to determine the doses and the duration of exposure, 45 adults flies of both genders (1- to 5-day-old) per vial were exposed for 7 days to various concentrations of HEDF (0, 1, 2, 10, 20, 50, 100, and 200 mg/mL) mixed to the diet. Each concentration contained three replicates. The number of dead and alive flies was recorded daily for 7 days. Based on these preliminary data,

the concentrations range of 0, 1, 10, and 50 mg/mL of HEDF were chosen with 7-day-exposure.

2.7.2. Negative Geotaxis Test. Locomotor activity of flies was determined based on negative geotaxis behavior assay as previously described [33] with some modifications. The flies were exposed to HEDF as described above. Following exposure, 10 flies (both genders) were sorted under a brief ice anesthesia and transferred in labeled vertical glass columns tube (15 cm length and 1.5 cm in diameter). After 30 min of recovery from ice, flies were gently tapped to the bottom of the tube, and the number of flies that climbed up to 6 cm mark of the column (i.e., the top) in 5 sec as well as those that remained below the mark was counted separately. The procedure was repeated five times per group at 1 min intervals.

2.7.3. Mitochondrial Activity-MTT Reduction Assay. Cell viability was determined by the mitochondrial dehydrogenase activity using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). After exposure, the viability of HEDF-treated and nontreated flies was evaluated in the whole body of flies according to the method described by Sudati et al. [34]. For this set of experiment, three whole flies of similar size were used per well. The absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (2,300 Enspire Multilabel Plate Reader, 2009), and the results were expressed as mean of absorbance of three determinations performed in triplicate.

2.7.4. Measurement of ROS Production. ROS generation was measured as a general index of oxidative stress using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), a nonpolar compound, which after conversion to a polar derivative by intracellular esterase activity rapidly reacts with ROS to form the highly fluorescent compound dichlorofluorescein (DCF) [35, 36]. Briefly, after exposure of flies to HEDF (0–50 mg/mL), the whole body of 20 flies was homogenated in 1 mL of 20 mM Tris buffer (pH 7.0) and then centrifuged at 1,000 rpm for 10 min at 4°C. An aliquot of 20 μL of the supernatant was incubated with 6 μL of 10 mM DCFH-DA for 60 min. The formation of the fluorescent product DCF was measured using a microplate reader (2300 Multilabel Plate reader Enspire, 2009) at 488 and 525 nm, excitation and emission wavelengths, respectively. The results were expressed in arbitrary units as the mean of DCF fluorescence.

(1) Estimation of Protein Thiol (PSH) and Nonprotein Thiol (NPSH). Protein thiols (PSH) and nonprotein (NPSH) were measured as previously described [37]. For thiols estimation, 20 flies were homogenated in 300 μL of percholic acid (PCA; 0.5 M) and centrifuged at 10,000 ×g for 5 min at 4°C. The supernatant was used to measure NPSH and the pellet was resuspended in 200 μL of Tris/HCl 0.5 M, pH 8.0, to measure PSH.

(2) Activity of Selected Enzymes (AChE, CAT, GST, and SOD). To determine acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT),

glutathione-S-transferase (GST), and superoxide dismutase (SOD) activities, flies homogenates were centrifuged at $1.000 \times g$ for 5 min at $4^\circ C$, and an aliquot of the supernatant (S1) was used for measurement of AchE [38], while the (S1) was centrifuged again at $14.000 \times g$ for 30 min at $4^\circ C$, for the measurement CAT [35], GST [36] and SOD [39].

2.7.5. Western Blotting. Western blotting methodology was performed according to the method described [14]. Forty flies from HEDF-treated and untreated were homogenized at $4^\circ C$ in $200 \mu L$ of buffer (pH 7.0) containing 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 20 mM Na_3VO_4 , 100 mM sodium fluoride, and phosphatase inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged at $1.000 \times g$ for 10 min at $4^\circ C$ and the supernatants (S1) were collected. After determination of the protein [40], 10% DTT was added to the samples. Then, the samples were frozen at $-20^\circ C$ for later determination of total and phosphorylated forms of ERK 1/2 and phosphorylated form of $p38^{MAPK}$ using specific antibodies. The immunoblots were visualized and quantified on the 400 MM Pro Bruker imaging system using ECL detection reagents. The density of the bands was measured and expressed as percent of increase over the control (nontreated flies). β -actin, total $p38^{MAPK}$ and total ERK were used as loading controls for Western blotting experiments. Protein levels were quantified using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistical Analysis. The results are shown as mean \pm SEM (standard error of mean) of three independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was measured by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's or Tukey's posttest when appropriated. Differences between groups were considered to be significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Phytochemical Screening of HEDF. The presence of alkaloids, tannins, flavones, flavonols, chantonas, chauconas, and auronas was identified in HEDF (data not shown).

3.2. Identification and Quantification of Phenolic Compounds of HEDF by HPLC. HPLC fingerprinting of HEDF revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 9.95$ min; peak 1), catechin ($t_R = 16.08$ min; peak 2); chlorogenic acid ($t_R = 20.14$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.63$ min; peak 4), ellagic acid ($t_R = 37.29$ min; peak 5), rutin ($t_R = 39.87$ min; peak 6), isoquercitrin ($t_R = 44.93$ min; peak 7), quercitrin ($t_R = 48.15$ min; peak 8), quercetin ($t_R = 51.07$ min; peak 9), and kaempferol ($t_R = 61.56$ min; peak 10). They were identified by comparisons with the retention times and UV spectra of the standards analyzed under the same analytical conditions (Figure 1). Caffeic acid (33.17 ± 0.03 mg/g), rutin (20.05 ± 0.01 mg/g), quercitrin (19.07 ± 0.02 mg/mL), and isoquercitrin (18.61 ± 0.01 mg/mL) were the major components present in HEDF, while kaempferol

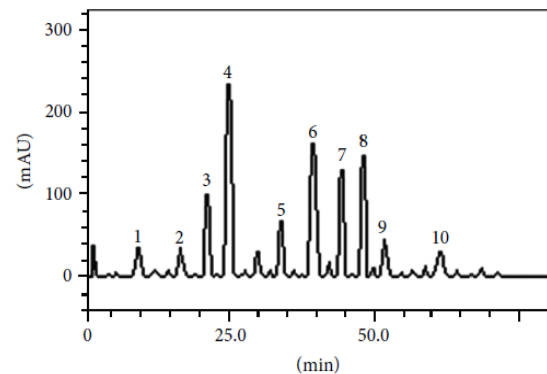


FIGURE 1: High performance liquid chromatography profile of HEDF, detection UV, was at 325 nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), rutin (peak 6), isoquercitrin (peak 7), quercitrin (peak 8), quercetin (peak 9), and kaempferol (peak 10). Calibration curve for gallic acid: $Y = 14286x + 1395.8$ ($r = 0.9996$); catechin: $Y = 15097x + 1189.3$ ($r = 0.9997$); caffeic acid: $Y = 12758x + 1259.7$ ($r = 0.9996$); chlorogenic acid: $Y = 13461x + 1275.3$ ($r = 0.9992$); ellagic acid: $Y = 13576x + 1346.4$ ($r = 0.9999$); rutin: $Y = 12845 + 1305.7$ ($r = 0.9999$); quercetin: $Y = 13560x + 1192.6$ ($r = 0.9991$), isoquercitrin: $Y = 12873x + 1325.6$ ($r = 0.9998$); quercitrin: $Y = 11870x + 1329.8$ ($r = 0.9993$); and kaempferol: $Y = 14253x + 1238.9$ ($r = 0.9997$).

TABLE 1: Quantification of phenolic compounds from the HEDF.

Compounds	HEDF		LOD $\mu g/mL$	LOQ $\mu g/mL$
	mg/g	%		
Gallic acid	5.29 ± 0.01^a	0.52	0.015	0.049
Catechin	5.31 ± 0.01^a	0.53	0.032	0.105
Chlorogenic acid	16.03 ± 0.02^b	1.60	0.009	0.029
Caffeic acid	33.17 ± 0.03^c	3.31	0.024	0.078
Ellagic acid	7.30 ± 0.01^d	0.73	0.013	0.042
Rutin	20.05 ± 0.01^e	2.00	0.027	0.090
Isoquercitrin	18.61 ± 0.01^f	1.86	0.008	0.026
Quercitrin	19.07 ± 0.02^{ef}	1.80	0.035	0.114
Quercetin	5.87 ± 0.01^a	0.58	0.019	0.063
Kaempferol	5.36 ± 0.01^a	0.53	0.026	0.085

Results are expressed as mean \pm standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey's test at $P < 0.001$.

(5.36 ± 0.01 mg/mL), catechin (5.31 ± 0.01 mg/mL) and gallic acid (5.29 ± 0.01 mg/mL) were less abundant (Table 1).

3.3. Effects of HEDF Exposure on Survival of Flies. Our preliminary results showed that exposure of flies to HEDF (0–200 mg/mL) caused 78% ($P < 0.05$) mortality at concentration of 50 mg/mL after 7 days of exposure, while 100 and 200 mg/mL of HEDF caused 100% mortality (Figure 2). Considering the high toxicity of the higher concentrations of the extract, we decided to use the concentrations of 1, 10, and 50 mg/mL of HEDF for the evaluation of biochemical analyses.

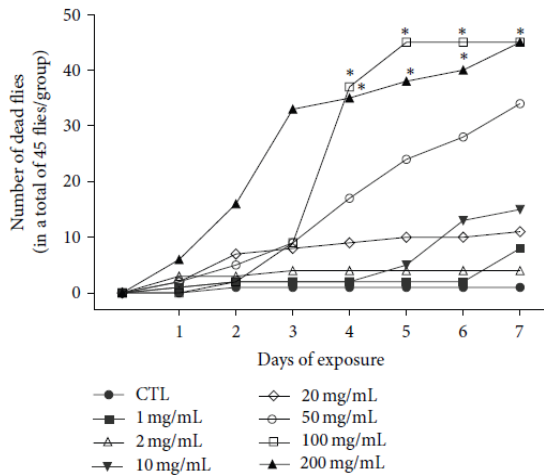


FIGURE 2: Mortality curve of HEDF (0–200 mg/mL) exposed flies. The number of live and dead flies was counted daily for seven days. The data represent the mean \pm SEM of three separate experiments and are expressed number of dead flies in relation to total number of flies. Doses of 100 and 200 mg/mL were significant when compared to control group * $P < 0.05$.

3.3.1. HEDF Exposure Induced Locomotor Deficits in *D. melanogaster*. Exposure of flies to 1 and 10 mg/mL of HEDF for 7 days did not change the locomotion activity of flies when compared to control (Figure 3, $P > 0.05$). However, flies treated with 50 mg/mL of HEDF remained mostly at the bottom of the column when compared to the control group (Figure 3) indicating locomotor deficit. In parallel to behavioral parameter, the activity of AchE was evaluated since acetylcholine is the main excitatory neurotransmitter of the insect central nervous system [41]. As shown in Figure 4, the activity of AchE was significantly elevated ($P < 0.001$) in flies exposed to 1 and 10 mg/mL of HEDF, when compared to control flies. In contrast, 50 mg/mL of HEDF caused a significant inhibition of AchE activity when compared to control flies (Figure 4, $P < 0.05$).

3.3.2. Mitochondrial Activity of HEDF Exposed Flies. The metabolic viability of cells was evaluated by assessing the MTT reducing capacity of flies' homogenates. HEDF exposure caused a significant decrease in MTT reduction at concentrations of 10 and 50 mg/mL when compared to control flies (Figure 5) ($P < 0.05$).

3.3.3. Oxidative Stress Analysis. As depicted in Figure 6, HEDF (50 mg/mL) caused significant increase of DCF fluorescence in the homogenates of flies when compared to control ($P < 0.01$). Our results also revealed that only the highest concentration of HEDF (50 mg/mL) exposed flies caused a significant decrease in the levels of nonprotein thiols (NPSH) (Figure 7, $P < 0.05$). However, no changes in the levels of protein thiols (PSH) were observed in HEDF exposed flies when compared to control (Figure 7).

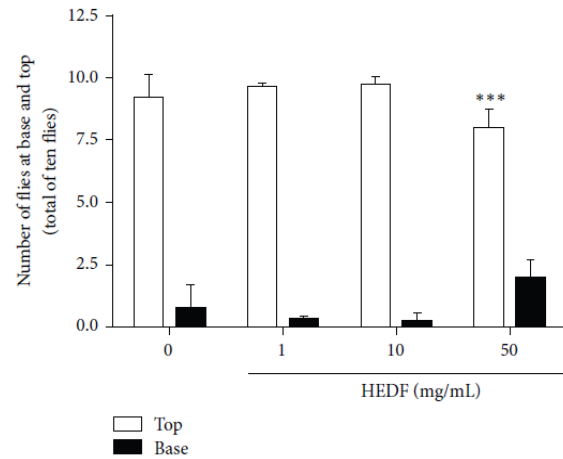


FIGURE 3: Locomotive performance in groups of 10 flies exposed to HEDF for seven days at doses of 0, 1, 10, and 50 mg/mL by negative geotaxis test. The measurements were repeated five times at intervals of 1 min. The test was performed in triplicate ($n = 10$), and data represents the mean \pm SEM of the number of flies that were in the top and bottom. Exposure of flies to 50 mg/mL of HEDF caused significant deficit in locomotive performance when compared to control group (***) $P < 0.0001$.

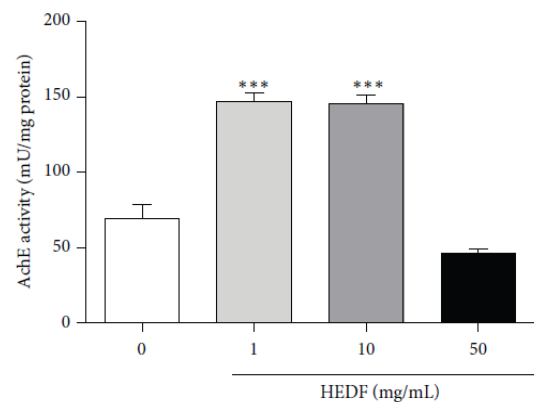


FIGURE 4: Effect of HEDF exposed flies on the activity of AchE. HEDF (1 and 10 mg/mL) induced alteration in the activity of AchE in HEDF-treated flies after 7 days of exposure. The data represent the mean \pm SEM of three replicates performed in duplicate. *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ indicate significant difference when compared to control.

Considering that oxidative stress was induced by exposure of flies to HEDF (evidenced by increased ROS generation and decreased NPSH levels), we measured the activity of GST, SOD, and CAT, which are antioxidant enzymes involved in the cell adaptive response to oxidative stress. HEDF induced a marked increase in the activities of GST (Figure 8(a)), SOD (Figure 8(b)) and CAT (Figure 8(c)) at concentrations of 1 and 10 mg/mL when compared to their respective control

6

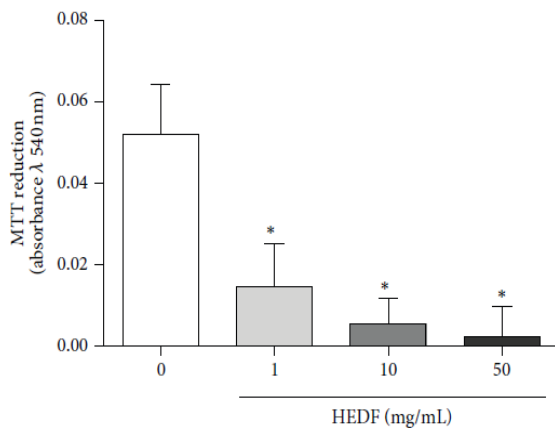


FIGURE 5: MTT reduction of flies exposed to different concentrations of HEDF for 7 days. The experiments were performed in triplicate, and the bars represent an average \pm SEM of absorbance obtained in control group (untreated flies) and HEDF exposed flies. $n = 10$, * $P < 0.05$ versus control flies (untreated).

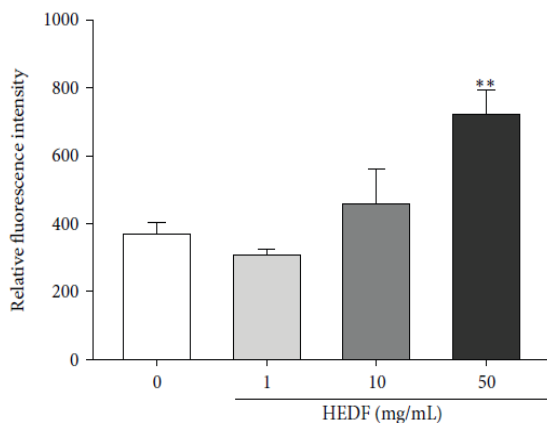


FIGURE 6: ROS production in response to exposure to HEDF (1–50 mg/mL) flies for seven days. ROS production is represented by the intensity of fluorescence emitted by the DCF and represents the mean \pm SEM of three independent experiments, performed in triplicate ($n = 3$). ** $P < 0.01$ compared to the control group (untreated flies).

($P < 0.001$). However, at the highest concentration tested (50 mg/mL), there was a substantial decrease in GST activity (Figure 8(a), $P < 0.05$), while CAT and SOD activities did not change (Figures 8(b) and 8(c)).

3.3.4. Phosphorylation of MAPKs and PARP Cleavage. The phosphorylation of MAPK family components was assayed after 7 day-exposure of *D. melanogaster* to HEDF. Phosphorylation of ERK2 was significantly increased in flies treated with 10 mg/mL of HEDF, while p38^{MAPK} was not modified at all the concentrations tested when compared to untreated flies (Figures 9(b) and 9(c)). Exposure to all concentrations

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

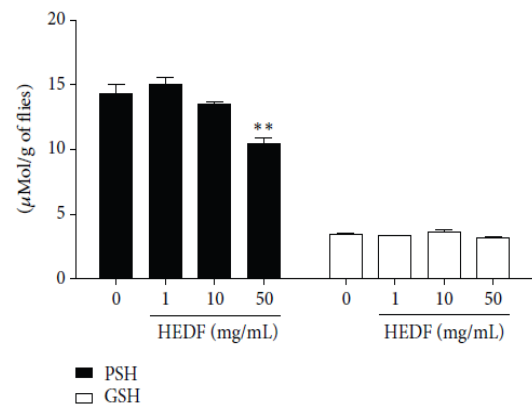


FIGURE 7: Levels of protein (PSH) and nonprotein thiol (NPSH) in homogenates of flies exposed to different concentrations of HEDF (1, 10 and 50 mg/mL) for 7 days. There was a significant decrease in PSH levels at dose of 50 mg/mL of HEDF. PSH or NPSH levels are represented in μ Mol/g of flies. ** $P < 0.01$ versus untreated flies. Data are expressed as mean \pm SEM of $n = 4$ independent experiments, performed in triplicate.

of extract caused PARP cleavage (Figure 9(a)), indicating the occurrence of apoptotic cell death.

4. Discussion

Although the use of plant extracts has been reported to exert a variety of pharmacological actions by different mechanisms, there is evidence that some of them can cause toxicity [42, 43]. Therefore, it is imperative to explore the toxicity potential of plant extracts popularly used in folk medicine. In the present study, we investigated the potential toxicity of the hydroalcoholic extract of the leaves of *D. furfuracea* (HEDF) in a *Drosophila melanogaster* model and identified some phytochemicals of the plant extract. Our results demonstrated that 7 days of exposure of *D. melanogaster* to HEDF caused toxicity in a process involving oxidative stress, alterations in the antioxidant enzymes, MAPK proteins phosphorylation, and apoptotic cell death.

The flies exposed to HEDF showed a significant decrease in the MTT reduction, indicating that viability of flies' cells was compromised. In the same line, flies that were exposed to HEDF revealed a significant increase in ROS production at concentration of 50 mg/mL, whereas lower concentrations of HEDF (1 and 10 mg/mL) seemed to stimulate ROS generation in minor extent and improve antioxidant enzymes activities. In parallel, PARP cleavage, a general index of apoptotic cell death, was observed at all concentrations analyzed. The observed increase of antioxidant enzymes could represent an adaptive cellular response, in counteracting HEDF toxicity. This apparent adaptive response was possibly induced by the mild increase of ROS at the lower concentrations of HEDF, leading to an increase of GST, SOD, and CAT activities in the flies, thus improving its antioxidant capacity. The highest level of ROS generation in the homogenates of flies exposed to

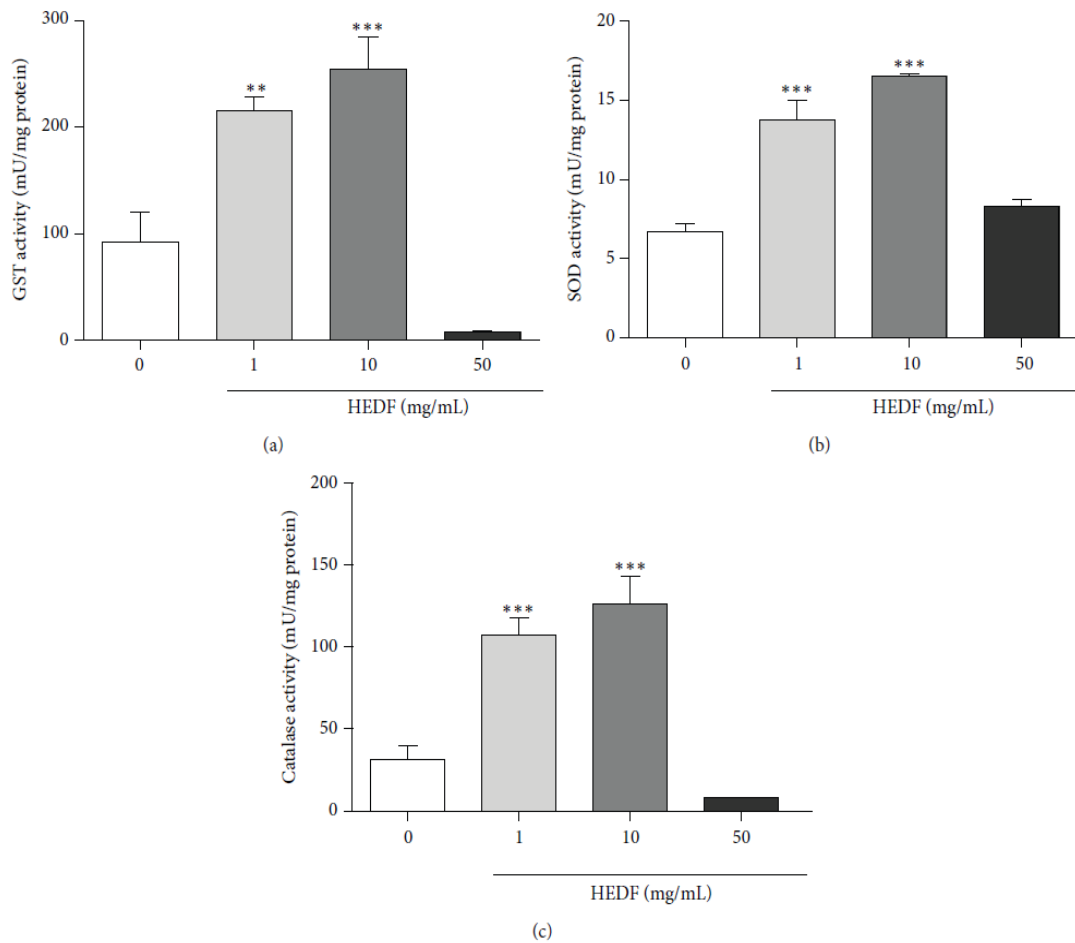


FIGURE 8: Analysis of antioxidant enzymes activities after 7 days exposure of flies to various concentrations of HEDF (1–50 mg/mL). (a) GST, (b) SOD, and (c) CAT activities are expressed as mU/mg of protein. The data represent the mean \pm SEM of three independent replicates performed in duplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control flies (untreated).

50 mg/mL may be at least, in part, responsible for the depletion of GST and CAT activities, decrease in mitochondrial activity, as well as NPSH oxidation. In fact, oxidative stress results from an unbalance between the production of reactive species and the capacity of cellular antioxidant defense to neutralize those species. When this capacity is overwhelmed, it leads to a diversity of cellular damages [44]. A significant reduction of NPSH (i.e., GSH) levels was identified in flies exposed to the 50 mg/mL of HEDF. It is well described that low levels of cellular GSH results from an increase in oxidative stress associated with toxic agents (ROS inducers) [45, 46]. It is interesting to note that GST, SOD, and CAT activities were increased in the flies that were exposed to the lower doses of HEDF (1 and 10 mg/mL). Low to moderate level of oxidative stress has been associated with increased antioxidant defense system [46]. In previous studies, flies exposed to rotenone presented a significant elevation of antioxidant enzymes, and this effect was related to the increased ROS generation and formation of toxic aldehydes [47]. Excessive ROS generation can cause lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, and

damage to proteins, lipids, and nucleic acids, thereby, altering the normal function of the cells [48].

The activity of acetylcholinesterase (AChE) was increased in the flies exposed to 1 and 10 mg/mL of HEDF and was inhibited at 50 mg/mL. In fact, acetylcholine (ACh) plays several functions in the nervous system, acting in cognitive process, motivation and reward, stimuli processing, and the sleep cycle. The inhibition of AChE compromises the hydrolysis of the neurotransmitter ACh, leading to the accumulation of this neurotransmitter in the synapses [49, 50]. Many studies with toxic agents, such as rotenone, paraquat, and organophosphorus, revealed that these agents can lead to the inhibition of AChE, generating the loss of the cholinergic homeostasis, which causes many neurochemical and neurobehavioral disturbances [51–53]. The central nervous system is very susceptible to oxidative stress due to high oxygen consumption, lower levels of antioxidant defenses, high levels of polyunsaturated fatty acids (phospholipid membrane), and high levels of iron [54]. The inhibition of AChE at 50 mg/mL of HEDF correlated well with the

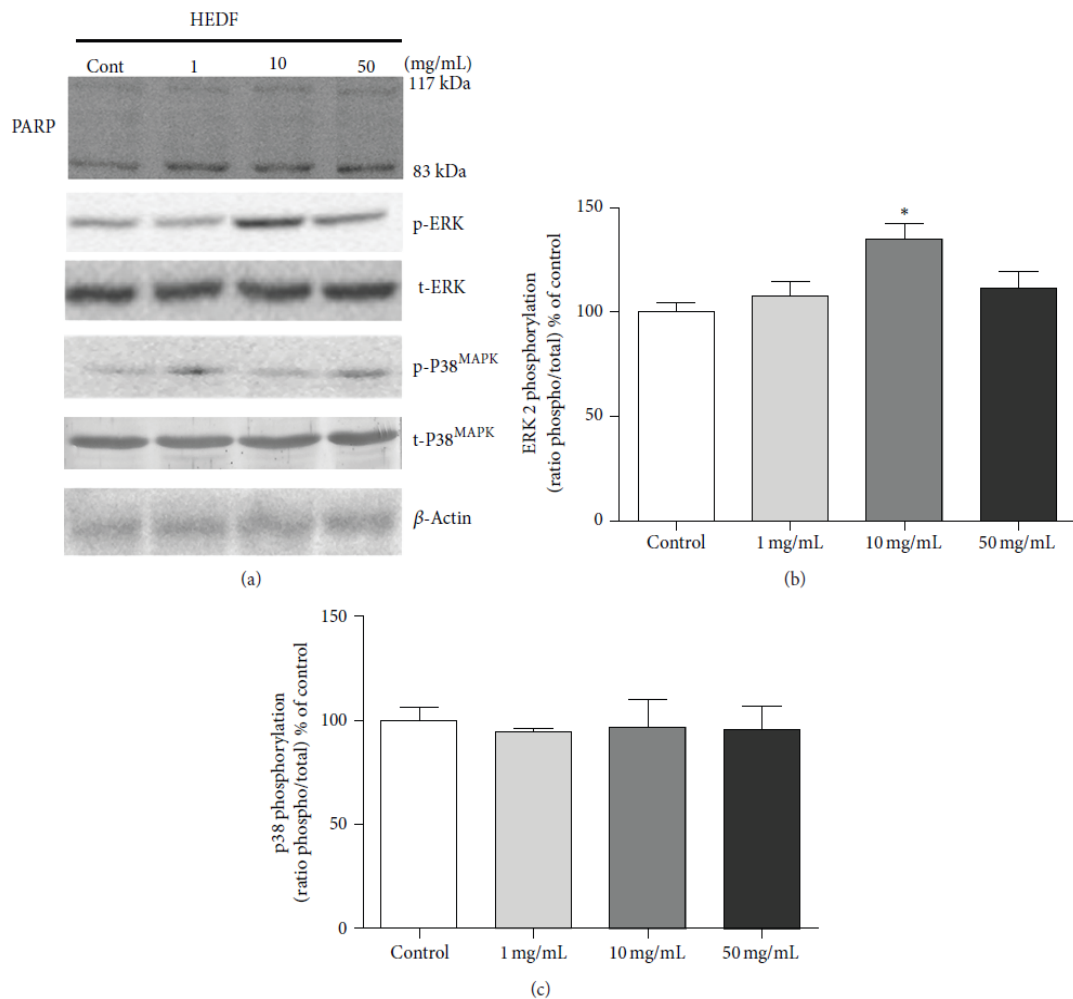


FIGURE 9: Western blot analysis of the phosphorylated and total forms of ERK (a) and p38^{MAPK} (b) and PARP cleavage in homogenates of flies exposed to HEDF (1–50 mg/mL) for seven days. The total content and phosphorylation of proteins were detected by specific antibodies and the reaction was developed by the method of detection by enhanced chemiluminescence (ECL). The graph represents the quantification of the immunoreactive bands and means \pm SEM of three independent experiments (% of control) ($n = 3$) * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the control group.

observed locomotor deficits induced by HEDF at the same concentration. These results indicate that HEDF-induced toxicity may be associated with impairment of neurological functions. There is evidence that enhanced activation of AChE can cause a reduction of cholinergic neurotransmission and affect other related functions including cell proliferation and promote apoptosis [55, 56]. In the present study, exposure of flies to 1 and 10 mg/mL of HEDF significantly increased AChE activity. Alterations in AChE activity can compromise the normal motor activity of the flies, and this was evidenced in our study by the impairment of locomotive performance in the negative geotaxis behavior assay.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of proteins that participate in transduction pathways affected

by various environmental pollutants, including heavy metals [14]. Usually, the ERK is activated by mitogenic stimuli and regulates mainly the growth and differentiation. The JNK and the p38^{MAPK} are activated by cellular stress and inflammatory cytokines and are involved in the apoptotic process. These proteins regulate the transmission of signals from membrane to the nucleus and are well conserved from unicellular to more complex organisms [57, 58]. Studies demonstrated that plant derivatives such as curcumin can modulate this pathway, mediating the antitumoral property attributed to this compound [58, 59]. In our study, exposure of flies to 10 mg/mL of HEDF significantly increased ERK phosphorylation. It is well known that ERK pathway is susceptible to oxidative stress. In addition, hydrogen peroxide,

metals, and other cell stressors are demonstrated to stimulate phosphorylation of this MAPK protein [58, 60], thus contributing to activation of several downstream targets as transcriptional factors. It was demonstrated that medicinal plants are able to induce gene activation dependent of the transcriptional factor Nrf-2 via ERK [61]. This transcription factor is known as the main regulator of the antioxidant cell response and control the expression of several antioxidant enzymes [61]. Here, the phosphorylation of ERK occurred in parallel with an increase in antioxidant enzymes activity, possibly in response to extracellular stimuli [62] induced by HEDF exposure. A possible link between the activity of these enzymes and ERK activation in our model must be further investigated.

In the present work, the phytochemical prospection and HPLC analysis of the leaves of HEDF revealed the presence of alkaloids and chalcones, in addition to polyphenolic compounds. Of particular importance, chalcone and some chalcone analogues have been reported to be toxic in zebrafish model [63]. Additionally, isolated oxoaporphine alkaloids from three species of the Annonaceae family, including *D. furfuracea*, have shown cytotoxic effect in the lineage of Hep2-cells (laryngeal carcinoma) [64]. On the other hand, Li et al., 2014 [65], showed the potentiality of total flavonoids from *Arachniodes exilis* to induce apoptotic cell death in human hepatoma HepG2 cells and cause oxidative stress. Similarly, it was shown that the flavonoid quercetin caused apoptotic cell death in different human tumoral cell types dependently of ERK phosphorylation and this effect occurred in parallel with a time dependent ROS production [12]. It was previously demonstrated that the flavonoid quercetin was protective against H₂O₂ induced toxicity only at low concentrations, while at higher concentration it induced apoptotic cell death in hepatoma cells [66] and acting as a prooxidant agent [66, 67]. In accordance, our data shows that effects of *D. furfuracea* on survival and biochemical parameters in flies are related with the concentrations and time of exposure.

5. Conclusions

The present study demonstrated for the first time the toxicity of *Duguetia furfuracea* in the *Drosophila melanogaster* model system. The adverse effects of HEDF to flies were evidenced by alterations in several markers of cell stress and neurobehavioral parameters. The toxicity induced by the extract to flies may be attributed to an individual or synergistic action of phytochemicals found in this plant over the period of exposure. Overall, our results suggest that oxidative stress may be major mechanism underlying *D. furfuracea* induced toxicity in *D. melanogaster*.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho and Gustavo Felipe da Silva contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors acknowledge CAPES, CNPq, FAPERGS, and FAPERGS-PRONEM for financial support. Jean Paul Kamdem particularly thanks TWAS the Alexander von Humboldt Foundation (AvH), TWAS-CNPq, and CAPES for the financial support. Jeferson Luis Franco, José Galberto Martins da Costa, and Margareth Linde Athayde are CNPq fellowship recipients.

References

- [1] M. J. Balunas and A. D. Kinghorn, "Drug discovery from medicinal plants," *Life Sciences*, vol. 78, no. 5, pp. 431–441, 2005.
- [2] B. B. Mishra and V. K. Tiwari, "Natural products: an evolving role in future drug discovery," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46, no. 10, pp. 4769–4807, 2011.
- [3] World Health Organization, "Report, technical briefing on traditional medicine," in *Proceedings of the 49th Regional Committee Meeting*, WHO Regional Office for the Western Pacific, Manila, Philippines, September 1998.
- [4] World Health Organization, *Consultation Meeting on Traditional Medicine and Modern Medicine, Harmonizing the Two Approaches*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999, (document reference (WP)TM/ICP/TM/001/RB/98-S/99/GE/32(CHN)).
- [5] World Health Organization, *Traditional, Complementary and Alternative Medicines and Therapies*, Working Group OPS/OMS, WHO Regional Office for the Americas/Pan American Health Organization, Washington, DC, USA, 1999.
- [6] World Health Organization, *WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.
- [7] N. Penha-Silva, C. B. Firmino, F. G. de Freitas Reis et al., "Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 128, no. 7–8, pp. 444–449, 2007.
- [8] M. V. de Freitas, R. D. C. M. Netto, J. C. da Costa Huss et al., "Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes," *Toxicology in Vitro*, vol. 22, no. 1, pp. 219–224, 2008.
- [9] A. L. Guimarães, A. P. Oliveira, and J. R. G. S. Almeida, "Challenges to implementation of Herbal Medicine in Health System," in *Completeness and Health: Epistemology, Politics and Practices of Care*, A. F. Barreto, Ed., pp. 97–107, University of Ed. UFPE, Recife, Brazil, 2011.
- [10] H. Kim, B.-S. Park, K.-G. Lee et al., "Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of β -amyloid," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 22, pp. 8537–8541, 2005.
- [11] C. G. Noschang, R. Krolow, L. F. Pettenuzzo et al., "Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system," *Neurochemical Research*, vol. 34, no. 9, pp. 1568–1574, 2009.

- [12] W.-M. Lee, M. Hsiao, J.-L. Chang et al., "Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species-mediated ERK activation in HL-60 leukemia cells and xenograft," *Archives of Toxicology*, 2014.
- [13] S. J. Harper and P. LoGrasso, "Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and P38," *Cellular Signalling*, vol. 13, no. 5, pp. 299–310, 2001.
- [14] M. T. Paula, A. P. Zemolin, A. P. Vargas et al., "Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant system in *D. melanogaster*," *Environmental Toxicology*, vol. 29, no. 6, pp. 621–630, 2014.
- [15] H. Lorenzi and F. J. A. Matos, *Medicinal Plants in Brazil: Native and Exotic*, Plantarum Institute, Sao Paulo, Brazil, 2002.
- [16] C. A. Carollo, A. R. Hellmann-Carollo, J. M. de Siqueira, and S. Albuquerque, "Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea*—annonaceae," *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. 51, no. 2, pp. 837–841, 2006.
- [17] M. A. B. Silva, L. V. L. Melo, and R. V. Ribeiro, "Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and the anorectic population of New Xanthine-MT, Brazil," *Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 4, pp. 540–562, 2010.
- [18] V. R. G. Rodrigues and D. A. Carvalho, Eds., *Medicinal Plants in the Field Clenched*, UFLA, Lavras, Brazil, 2001.
- [19] M. de Fátima Agra, P. F. de Freitas, and J. M. Barbosa-Filho, "Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 17, no. 1, pp. 114–140, 2007.
- [20] A. M. S. Rodrigues, J. E. de Paula, N. Degallier, J. F. Molez, and L. S. Espíndola, "Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*," *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 22, no. 2, pp. 314–317, 2006.
- [21] D. B. da Silva, E. C. O. Tulli, G. C. G. Militão et al., "The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*," *Phytomedicine*, vol. 16, no. 11, pp. 1059–1063, 2009.
- [22] M. R. Toledo, M. T. L. Peres, M. C. Vieira et al., "Fitotoxicidade do extrato aquoso de *Duguetia furfuraceae* (St. Hill.) B et H. em ratas (*Rattus norvegicus*)," *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, vol. 8, no. 4, pp. 218–222, 2006.
- [23] C. R. Silva, P. M. Vieira, S. C. Santos, and L. Chen-Chen, "Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 84, no. 1, pp. 149–156, 2012.
- [24] L. S. Coelho, L. P. Felício, C. T. Miranda et al., "Modulatory effects of *Duguetia furfuracea* (A. St. Hil) Benth. and Hook. F in *Drosophila melanogaster* somatic and germinative cells," *Genetics and Molecular Research*, vol. 10, no. 1, pp. 75–85, 2011.
- [25] C. A. Carollo, A. R. Hellmann, and J. M. de Siqueira, "Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae)," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, no. 6, pp. 647–649, 2005.
- [26] D. B. da Silva, E. C. O. Tulli, W. S. Garcez, E. A. Nascimento, and J. M. de Siqueira, "Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae)," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 18, no. 8, pp. 1560–1565, 2007.
- [27] B. M. Fraga, "Natural sesquiterpenoids," *Natural Product Reports*, vol. 23, pp. 947–972, 2006.
- [28] K. M. Beckingham, J. D. Armstrong, M. J. Texada, R. Munjaal, and D. A. Baker, "*Drosophila melanogaster*—the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms," *Gravitational and Space Biology Bulletin*, vol. 18, no. 2, pp. 17–29, 2005.
- [29] S.-I. Kim, J.-W. Jung, Y.-J. Ahn, L. L. Restifo, and H.-W. Kwon, "Drosophila as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds," *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 14, no. 4, pp. 509–517, 2011.
- [30] F. J. A. Matos, *Introduction to Experimental Phytochemical*, UFC, Fortaleza, Brazil, 2nd edition, 1997.
- [31] A. A. Boligon, T. F. de Brum, J. K. Frolhich, A. L. F. Froeder, and M. L. Athayde, "HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* reissek stem bark," *Research Journal of Phytochemistry*, vol. 6, no. 3, pp. 84–91, 2012.
- [32] A. A. Boligon, T. F. Kubiça, D. N. Mario et al., "Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts," *Acta Physiologica Plantarum*, vol. 35, no. 7, pp. 2229–2239, 2013.
- [33] H. Coulom and S. Birman, "Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 48, pp. 10993–10998, 2004.
- [34] J. H. Sudati, F. A. Vieira, S. S. Pavin et al., "*Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*," *NeuroToxicology*, vol. 37, pp. 118–126, 2013.
- [35] H. Aebi and P. Lester, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121–126, 1984.
- [36] W. B. Jakoby and W. H. Habig, "Glutathione S-transferases (rat and human)," *Methods in Enzymology*, vol. 77, pp. 218–231, 1981.
- [37] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [38] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, 1961.
- [39] V. A. Kostyuk and A. I. Potapovich, "Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase," *Biochemistry International*, vol. 19, no. 5, pp. 1117–1124, 1989.
- [40] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [41] Y. H. Kim and S. H. Lee, "Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta?" *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 43, no. 1, pp. 47–53, 2013.
- [42] S. R. Mariz, G. S. Cerqueira, W. C. Araújo et al., "Acute toxicological study of the ethanol extract of aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. in rats," *Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 16, no. 3, pp. 372–378, 2006.
- [43] D. Ntelios, M. Kargakis, T. Topalis, A. Drouzas, and E. Potolidis, "Acute respiratory failure due to *Nicotiana glauca* ingestion," *Hippokratia*, vol. 17, no. 2, pp. 183–184, 2013.
- [44] A. L. A. Ferreira and L. S. Matsubara, "Free radicals: concepts, diseases, and oxidative stress defense systems," *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 43, no. 1, pp. 61–68, 1997.
- [45] R. Hosamani and S. R. Ramesh, "Attenuation of rotenone-induced mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* supplemented with creatine," *Neurochemical Research*, vol. 35, no. 9, pp. 1402–1412, 2010.

- [46] D. Anderson, "Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage," *Mutation Research*, vol. 350, no. 1, pp. 103–108, 1996.
- [47] R. Hosamani and Muralidhara, "Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*," *NeuroToxicology*, vol. 30, no. 6, pp. 977–985, 2009.
- [48] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.
- [49] M. Čalić, A. L. Vrdoljak, B. Radić et al., "In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: Mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity," *Toxicology*, vol. 219, no. 1–3, pp. 85–96, 2006.
- [50] D. M. Roberts and C. K. Aaron, "Managing acute organophosphorus pesticide poisoning," *British Medical Journal*, vol. 334, no. 7594, pp. 629–634, 2007.
- [51] P. Eyer, "Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds—a review," *Human and Experimental Toxicology*, vol. 14, no. 11, pp. 857–864, 1995.
- [52] T. A. Slotkin, "Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos," *Environmental Health Perspectives*, vol. 107, no. 1, pp. 71–80, 1999.
- [53] A. P. Da Silva, F. C. Meotti, A. R. S. Santos, and M. Farina, "Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice," *NeuroToxicology*, vol. 27, no. 6, pp. 1101–1105, 2006.
- [54] T. A. Slotkin, "Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 198, no. 2, pp. 132–151, 2004.
- [55] Q. H. Jin, H. Y. He, Y. F. Shi, H. Lu, and X. J. Zhang, "Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 25, no. 8, pp. 1013–1021, 2004.
- [56] R. Schmatz, C. M. Mazzanti, R. Spanevello et al., "Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 610, no. 1–3, pp. 42–48, 2009.
- [57] B. E. Stronach and N. Perrimon, "Stress signaling in *Drosophila*," *Oncogene*, vol. 18, no. 45, pp. 6172–6182, 1999.
- [58] Y. Zhou, S. Zheng, J. Lin, Q.-J. Zhang, and A. Chen, "The interruption of the PDGF and EGF signaling pathways by curcumin stimulates gene expression of PPARgamma in rat activated hepatic stellate cell in vitro," *Laboratory Investigation*, vol. 87, no. 5, pp. 488–498, 2007.
- [59] C. T. Chu, D. J. Levinthal, S. M. Kulich, E. M. Chalovich, and D. B. DeFranco, "Oxidative neuronal injury: the dark side of ERK1/2," *European Journal of Biochemistry*, vol. 271, no. 11, pp. 2060–2066, 2004.
- [60] T. Posser, J. L. Franco, L. Bobrovskaya, R. B. Leal, P. W. Dickson, and P. R. Dunkley, "Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells," *Journal of Neurochemistry*, vol. 110, no. 3, pp. 848–856, 2009.
- [61] M. Richter, A. F. Winkel, D. Schummer et al., "Pau d'arco activates Nrf2-dependent gene expression via the MEK/ERK-pathway," *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 39, no. 2, pp. 353–361, 2014.
- [62] L. A. Tibbles and J. R. Woodgett, "The stress-activated protein kinase pathways," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 55, no. 10, pp. 1230–1254, 1999.
- [63] Y.-T. Lee, T.-H. Fong, H.-M. Chen et al., "Toxicity assessments of chalcone and some synthetic chalcone analogues in a zebrafish model," *Molecules*, vol. 19, no. 1, pp. 641–650, 2014.
- [64] D. B. da Silva, M. D. F. C. Matos, S. T. Nakashita et al., "Isolation and cytotoxicity evaluation of some oxoaporphine alkaloids from Annonaceae," *Quimica Nova*, vol. 30, no. 8, pp. 1809–1812, 2007.
- [65] H. Li, J. Chen, C. Xiong, H. Wei, C. Yin, and J. Ruan, "Apoptosis induction by the total flavonoids from *Arachniodes exilis* in HepG2 Cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction involving MAPK activation," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, Article ID 906941, 11 pages, 2014.
- [66] W. Wätjen, G. Michels, B. Steffan et al., "Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis," *Journal of Nutrition*, vol. 135, no. 3, pp. 525–531, 2005.
- [67] D. Metodiewa, A. K. Jaiswal, N. Cenas, E. Dickançaitė, and J. Segura-Aguilar, "Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 1–2, pp. 107–116, 1999.

4 MANUSCRITO:

Phytochemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Duguetia furfuracea*

A. St.-Hill

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho^{a,f}, Litiele Cezar da Cruz^f, Nathane Rosa Rodrigues^d,
Emily Pansera Waczuk^f, Celestina Elba Sobral Souza^b, Henrique Douglas Melo Coutinho^b,
José Galberto Martins da Costa^c, Margareth Linde Athayde^e, Aline Augusti Boligon^e, Jeferson
Luis Franco^d, Thaís Posser^{*d}, Irwin Rose Alencar de Menezes^{*a},

Enviado a revista: **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**

Phytochemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Duguetia furfuracea*

A. St.-Hill

Francisca Valéria Soares de Araújo Pinho^{a,f}, Lítiele Cezar da Cruz^f, Nathane Rosa Rodrigues^d, Emily Pansera Waczuk^f, Celestina Elba Sobral Souza^b, Henrique Douglas Melo Coutinho^b, José Galberto Martins da Costa^c, Margareth Linde Athayde^e, Aline Augusti Boligon^e, Jeferson Luis Franco^d, Thaís Posser^{*d}, Irwin Rose Alencar de Menezes^{*a},

^aRegional University of Cariri-URCA, Department of Biological Chemistry, Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry - LFQM, 63100-000, Pimenta – Crato-Ceará, Brazil.

^bRegional University of Cariri-URCA, Department of Biological Chemistry, Laboratory of Microbiology and Molecular Chemistry - LMBM, 63100-000, Pimenta – Crato-Ceará, Brazil.

^cRegional University of Cariri-URCA, Department of Biological Chemistry, Laboratory of Studies on Natural Products - LPPN, 63105-000, Crato - Ceará–Brazil.

^dFederal University of Pampa, São Gabriel, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research - CIPBIOTEC, 97300-000, São Gabriel, RS-Brazil.

^eFederal University of Santa Maria, Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, building 26, room 1115, Santa Maria, 97105-900, Brazil.

^fDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Post graduate Program in Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Correspondence should be addressed to: Irwin Rose Alencar de Menezes, Ph.D. and Thaís Posser, Ph.D.

Email: irwinalencar@yahoo.com.br; thaisposser@unipampa.edu.br

Abstract

Duguetia furfuracea belonging to the Annonacea family is popularly known as “ata brava” being widely used in popular medicine. The present study evaluated the antioxidant activity, antifungal and phytochemical composition of the hydroalcoholic extract (HEDF) and methanolic (Mt-OH) and ethyl acetate (Ac-OEt) fractions of *D. furfuracea*. HPLC analysis revealed that caffeic acid (32.47 ± 0.03 mg/g) and quercitrin (31.96 ± 0.03 mg/g) are among the main components of Mt-OH fraction and, quercitrin (32.97 ± 0.03 mg/g), isoquercitrin (31.56 ± 0.01 mg/g) for Ac-OEt fraction. The highest levels of phenols and total flavonoids were found for Ac-OEt fraction, and the HEDF showed higher *in vitro* antioxidant potential. The antifungal potential of HEDF, Mt-OH and Ac-OEt fractions was assayed in the standard strains *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. Although HEDF and its fractions did not present a significant antifungal potential *per se*, HEDF and fractions potentiated the effect of fluconazole antifungal activity.

Keywords: natural compounds, *Candida albicans*, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Scavenger activity of the radical DPPH, phenolic compounds.

1. Introduction

The species *Duguetia furfuracea* is a shrub which belongs to the Annonacea family, being popularly known as “araticum do cerrado”, “ata brava”. The leaves are popularly used for treatment of rheumatism and renal colic, anti-hyper lipidemiant and anorexic agent [1].

Studies with different structures of *D. furfuracea* have pointing out its cytotoxic, bactericidal and antitumoral properties. Extracts from leaves and roots of *D. furfuracea* presented larvicide activity against *Aedes aegypti* [2]. Alkaloids from peels of subterranean stem showed antitumor, tripanocide and leishmanicidal activities [3]. Extracts from subterranean parts of the plant displayed toxic effect to *Artemia Salina* [4]. Our group demonstrated recently the pro-oxidant and insecticidal activity of the hydroalcoholic extract from leaves of *D. furfuracea* in *Dosophila melanogaster* [5]. Notwithstanding, the potential antioxidant and antifungal properties of this plant have not yet been described.

The antioxidant potential of the plants has been associated mainly with the presence of phenolic compounds. The chemical structure and reductive properties of these compounds make them active molecules in the scavenging of free radicals and in chelation of transition metals [6]. Secondary

metabolites are substances with a generally complex structure playing several roles in the adaptation of plants to the environment; these substances have been attracting interest for their pharmacological and biotechnological properties such as, antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, anticarcinogenic and antimicrobial [7].

The occurrence of fungal infections is increasing at alarming rates, especially among immunocompromised subjects, such as AIDS patients, transplanted patients, and neonates [8]. Among the pathogens, species of *Candida* are generally associated with these infections, whose incidence is attributed to a variety of factors, either exogenous or endogenous. More than 100 species of *Candida* are known and the frequency of distribution for *Candida spp.* varies in accordance with geographical location [9].

Actually, conventional treatments for fungal infections are not fully effective, since the available drugs lead to secondary effects or to development of resistance [10]. Therefore, the search for new drugs and alternative therapies (including natural products) for the treatment of *Candida* infections has become critical. In this aspect, plants and their derivatives have been contributing in pharmacological research due to their potential as a source for a variety of biologically active ingredients used in drug development. The antimicrobial activity of plants has been identified in some species, however, it should be taken in consideration that besides its beneficial effects, the use of plants may interfere with conventional treatments by interaction with drugs, thus potentiating or minimizing clinical efficacy [11].

Our aim with the present study was to describe the phytochemical characterization, *in vitro* antioxidant potential and to evaluate, for the first time, the antifungal and/or modulatory activity of the hydroalcoholic extract, methanolic and ethyl acetate fractions of *D. furfuracea*.

2. Materials and Methods

2.1 Drugs, reagents and equipment.

Sabouraud Dextrose Agar (semi-solid) and Sabouraud Dextrose Broth were from Difco Laboratories (Michigan, MI, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO), Acetonitrile and formic, gallic, chlorogenic, ellagic, and caffeic acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Antifungal agents Fluconazole and nystatin, catechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, kaempferol, ethanol, methyl alcohol, hexane, ethyl acetate, Folin-Ciocalteu Reagent, gallic acid, sodium carbonate, aluminium chloride, quercetin, DPPH, ascorbic acid, sodium Acetate, TPTZ, ferric chloride, ferrous sulfate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the system of HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão), Auto Sampler prominence (SIL - 20A), equipped with High-pressure plunger pumps LC - 20AT Shimadzu connected to DGU degasser 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD

(diode) SPD- M20A and software solution LC 1,22 SP1. The absorbance measurements were obtained using EnSpire® multimode plate reader (PerkinElmer, USA). All chemical products were from the highest analytical grade.

2.2 Collection of Plant Material

Leaves of *D. furfuracea* were collected from Barreiro Grande, Crato, Ceará, (7° 22' 2.8 "S, 39° 28' 42.4" W; and altitude of 892m above sea level), Brazil, in September 2011, and identified by Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva. A voucher specimen (n. 6703) was deposited in the Herbarium Cariense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) of the Regional University of Cariri (URCA).

2.3 Preparation of the hydroalcoholic extract, methanolic and acetate and fractions.

Methodology was performed according to the method described [12]. Leaves (1.050 g) of *D. furfuraceae* were washed in running water, crushed and put into glass flasks containing hydroalcoholic solution of extraction (99,8% of ethanol in distilled water) in the proportion of 1:1, for three-days. The suspension was filtered, solvent evaporated under reduced pressure and lyophilized to obtain 261.13 g of hydroalcoholic extract of *D. furfuracea* (HEDF). 80g of this was partitioned with ethyl acetate (Ac-OEt) and methanol (Mt-OH) to obtain, of 2.28 g ethyl acetate fraction and 75.6 g of methanolic fraction. The procedure yielded 24.87% for HEDF, 94.5% for Mt-OH and 3.35% for Ac-OEt fraction.

2.4 Identification and Quantitation of Phenolic Compounds of HEDF by HPLC.

Mt-OH and Ac-OEt fractions were submitted to the chromatographic analysis of reversal phase. The chemical composition of the HEDF was previously determined by our group [5] using the same procedure described in this section.

The chromatographic analyses were performed under the same gradient conditions using the column C18 (4.6 mm x 250 mm) charged with particles of 5µm of diameter. The mobile phase was water containing 1% of formic acid (A), acetonitrile (B) and the composition gradient was: 13% of B until 10 minutes and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% of B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 minutes, respectively according with [13] with some modifications. Fractions were analyzed at a concentration of 5mg/mL. The presence of ten antioxidant compounds was investigated: gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, caffeic acid, catechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin and kaempferol. The identification of these compounds was performed by comparing their retention time and the UV radiation absorption spectral to the commercial standards. The flow rate was 0.7 ml/min, injection volume of 40 µl and the wavelength of 254 nm to the gallic acid, 280 nm to the catechin, 325 nm to caffeic acid, ellagic acid and chlorogenic acid, and 365 nm to quercetin,

quercitrin, isoquercitrin, rutin and kaempferol. All the samples and the mobile phase were filtered through a membrane filter of 0.45 μm (Millipore) and, after this, they were degassed with a ultrasonic bath before the use.

The solutions of the standards of reference were prepared in a mobile phase of HPLC in a range of concentrations from 0.030 to 0.250 mg/ml to kaempferol, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutine and catechin and from 0.030 to 0.250 mg/ml to gallic acid, caffeic acid, ellagic acid and chlorogenic acid. The peaks of chromatography were confirmed by comparing their retention time to the standards of reference and by the spectral of DAD (200 a 400 nm). All the operations of chromatography were performed at room temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated on the basis in the standard deviation of the responses and in the inclination of three analytical independent curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve [14].

2.5 Determination of total phenols

The quantification of phenolic compounds was performed using the Folin-Ciocalteu method that involves the reduction of the reagent by phenolic compounds present in the samples forming a blue complex whose intensity increases linearly at 760 nm, as described by [15]. For the assays, 4 μl of samples (HEDF; Mt-OH and Ac-OEt) at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ to an incubation medium consisting of 0.1N Folin-Ciocalteu's reagent and 1.25 % (v/v) Na_2CO_3 in a final volume of 284 μl . After two hours of incubation in the dark, at room temperature, the absorbance was measured at 760 nm. The experiments were carried out in triplicates. The index of total phenolic compounds were expressed as equivalents of gallic acid *per* gram of the sample (mg GAEq/g), calculated through a curve of gallic acid, built with concentrations ranging from 50 to 500 $\mu\text{g/ml}$.

2.6 Determination of total flavonoids.

The quantification of flavonoids was made according with [16]. The method is based on the measurement of absorbance, at 415nm, of the complex formed between flavonoid compounds and aluminum cation in ethanol. For the assays, samples were incubated with AlCl_3 (2%) in a 1:1 reation. The final volume of the reaction medium was 300 μl . The experiments were carried out in triplicates. The index of total flavonoids were expressed as equivalents of quercetin *per* gram of the sample (mg QEq/g), calculated through a curve of quercetin, built with concentrations ranging from 0.625 to 25 $\mu\text{g/ml}$.

2.7 Antioxidant activity

2.7.1 Scavenger activity of the radical DPPH

The antioxidant activity of the extract and fractions was also checked by the DPPH method as described elsewhere [17] with minor changes. This test is based on the reduction of the stable free radical DPPH which presents a deep violet color in solution and turns to a yellowish color when neutralized. The mixture of the reaction was composed by 50 μ l of samples (extract and fractions) 50 μ l of solvent and 100 μ l of solution 0.3 mM of the radical DPPH in ethanol. The measurement of the absorbance was at 517nm after 30 minutes. The samples (HEDF; Mt-OH and Ac-OEt) were diluted in ethanol and water (1:1) and the standard substance, ascorbic acid, was diluted in water. All tests were made in triplicates. Results were expressed as IC₅₀ values defined as the concentration of antioxidant required to sequester 50% of the DPPH radicals. IC₅₀ was calculated by non-linear regression.

2.7.2 FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

The FRAP assay was conducted as described previously [18]. FRAP solution consisted in 10mM TPTZ, 20mM ferric chloride in acetate buffer 0.3. In 96 well microtiter plate, we added 9 μ l of the samples (HEDF; Mt-OH and Ac-OEt); 27 μ l of water and 270 μ l of the FRAP solution. After incubation at 37°C for 30 minutes absorbance was taken at 595nm. Samples readings were compared to a ferrous sulfate II standard curve. Results were expressed as μ M ferrous sulfate II (FeSO₄) equivalents *per* gram of sample. Experiments were done in triplicates.

2.8 Antifungal activity

2.8.1 Culture medium and inoculums

The antifungal activity was evaluated using the standard fungal strains *Candida albicans* (ATCC 40277), *Candida krusei* (ATCC 6438), *Candida tropicalis* (ATCC 40042) donated by the Universidade Estadual da Paraíba. In the biological tests, we used the following culture medium: Sabouraud Dextrose Agar (semi-solid) and Sabouraud, DextroseBroth (liquid) prepared according to the manufacturer's specifications. Fungal cultures kept at 4°C were transported to the Sabouraud Dextrose Agar medium and incubated at 35°C for 24 hours. As to the preparation of the inoculum, the pricked-out strains were transferred to the sterile saline solution (0.9% NaCl), composing a fungal suspension (inoculum) until obtaining the concentration of 10⁵UFC/ml according to the scale of McFaland [19].

2.8.2 Minimum inhibitory concentration test – CIM and the modulation of standard antifungal action

The method of micro dilution in saucy was used to determine the minimum inhibitory concentration (CIM). The samples (HEDF; Mt-OH and Ac-OEt) were weighed and solubilized initially in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted at 1024 µg/ml using sterile distilled water (test solution).

We distributed 100µl of inocula, prepared previously, in each cavity of a 96 wells microtiter plate and, thereafter, submitted to a serial double dilution using 100 µl of the samples with concentrations that range from 1024 to 0.5 µg/ml. The plates were transported to the incubator for 24 hours at 35° C [20]. The identification of CIM was performed through the visual observation of the turbidity provoked by the fungal growth, being the CIM defined as the lowest concentration of the sample in which no fungal growth was observed [19].

To observe how these samples could affect the action of the standard antifungal agents against the strains tested, we used the method proposed by Coutinho [21]. The extract and the fractions were tested using a sub-inhibitory concentration (MIC/8 = 64 µg/ml). We distributed, in each well, 100 µl of solution containing 1.675µl of liquid medium (Sabouraud Dextrose Broth) 10%; 200 µl of inoculum (fungal suspension) and 125 µl of the natural product (extract and fractions). After that, 100 µl of the antifungal agents were added to the first cavity and following the serial dilution along the other cavities. The concentrations of the antifungal agents (fluconazole and nystatin) ranged from 1024 to 0.5 µg/ml. The tests were performed in triplicate.

2.9 Statistical Analysis

Statistical differences between samples were tested by analysis of variance ANOVA followed by Tukey's or Dunnet's *post hoc* test when necessary. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Identification and Quantification of phenolic compounds by HPLC

The chromatographic and spectral profile of Mt-OH and Ac-OEt fractions revealed the presence of gallic acid ($t_R = 9.95$ min; peak 1), catechin ($t_R = 16.08$ min; peak 2); chlorogenic acid ($t_R = 20.14$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.63$ min; peak 4), ellagic acid ($t_R = 37.29$ min; peak 5), rutin ($t_R = 39.87$ min; peak 6), isoquercitrine ($t_R = 44.93$ min; peak 7), quercitrine ($t_R = 48.15$ min; peak 8), quercetine ($t_R = 51.07$ min; peak 9) and kampferol ($t_R = 61.56$ min; peak 10).

The main compounds present in the Mt-OH fraction were caffeic acid (32.47 ± 0.03 mg/g) and quercitrin (31.96 ± 0.03 mg/g) while catechin (2.69 ± 0.01 mg/g) and the gallic acid (5.47 ± 0.03 mg/g) were the least abundant. In the Ac-OEt fraction, major compounds were quercitrin (32.97 ± 0.037 mg/g) and isoquercitrin (31.56 ± 0.01 mg/g) while catechin (3.16 ± 0.02 mg/g) and rutin (5.49 ± 0.02 mg/g) were the least present (**Fig. 1 and Table 1**).

In another study of our group identified by chromatographic profile of HEDF demonstrated the presence of caffeic acid and rutin as major compounds (33.17 ± 0.03 mg/g and 20.05 ± 0.01 mg/g respectively) while gallic acid (5.29 ± 0.01 mg/g) and catechin (5.31 ± 0.01 mg/g) were the least abundant [5].

The determination of total phenols and flavonoids is showed in **Table 2**. The content of total phenols and flavonoids was higher in Ac-OEt fraction (657.05 mg/EAG/g and 120.9 mg EQ/g respectively), followed by Mt-OH fraction (289.33 mg/EAG/g and 76.26 mg EQ/g, respectively) and HEDF (231.26 mg EAG/g and 87.57 mg EQ/g respectively) [5]. The levels of total phenols for *D. furfuraceae* extract and fractions, is comparable with other Brazilian medicinal plants.

The *in vitro* antioxidant potential of extract HEDF and fractions of *D. furfuraceae* was evaluate by two different methods, FRAP, which measure the Ferric reducing antioxidant power of compounds and by ability of sequestering the synthetic radical DPPH. The HEDF presented the best Ferric reducing potential (166.73 ± 5.13 μ M of FeII/g of sample), followed by Mt-OH (126.43 ± 4.98) and Ac-OEt fractions (118.20 ± 1.08) (**Table 3**). The potential of Sequestering of Radical DPPH was expressed as IC₅₀ in μ g/mL of extract or fractions and compared with the positive control Ascorbic Acid. HEDF presented the better antioxidant activity in the DPPH test with IC₅₀ values of 33.15 μ g/mL when compared to Ac-OEt (39.32 μ g/mL) and Mt-OH (42.32 μ g/mL).

Phenolic compounds and some of their derivatives are known by their antioxidant properties. The antioxidant activity of some medicinal plants is correlated to the total phenolic and flavonoids indexes [22]. Although the total index of phenols and flavonoids has been higher in the fractions than in crude extract, it's possible connect these compounds with *in vitro* antioxidant activity, as determined by FRAP and DPPH methods. Though the *in vitro* antioxidant activity was higher in the crude extract than the fractions, this analysis suggests that other compounds in the crude extract of *D. furfuracea* contribute to its more effective antioxidant activity. In a previously published study by our group, the HEDF was demonstrated to present alkaloids in its phytochemical constitution [5].

In this study, the antifungal potential of the HEDF, methanolic (Mt-OH) and ethylacetate (Ac-OEt) fractions was tested against standard strains of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. According to the results, both extract and fractions presented minimal inhibitory concentration (CIM) ≥ 1024 μ g/ml against all the fungi strains tested. However, the extract and the fractions of *D. furfuracea* presented synergic effect when they were associated to fluconazole, indicating its modulatory action against fungi when associated with clinically relevant drugs. The HEDF and Mt-OH fraction potentialized the effect of the fluconazole when tested against *C. krusei* (**Fig. 2a and 2b**).

respectively). The methanolic fraction also presented synergism with fluconazole against *C. tropicalis* (**Fig. 2b**) and Ac-OEt fraction potentialized the effect of fluconazole against *C. albicans* (**Fig. 2c**).

The primary mechanism of fluconazole action occurs by the inhibition of the fungal enzyme lanosterol 14 α -demethylase (CYP51), which is a cytochrome enzyme P-450, involved in the synthesis of the ergosterol – the most important sterol in the fungal cell membrane [23]. It is known that many medicinal plants may modulate the activity of several antimicrobial agents [21]. In a previous study, the aqueous extract of the leaves and fractions of *D. furfuracea*, when combined with aminoglycosides presented synergic activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [24].

Phenolic compounds and flavonoids have demonstrated potential therapeutic activities as antifungal, antibacterial and antioxidant agents [25]. Although the mechanisms underlying to antimicrobial pharmacology of the phenolic compounds are rather variable, many of them act by promoting damages to the function of the cell membrane or cell wall [26]. The analysis by HPLC of the extract and fractions of *D. furfuracea*, as described previously, revealed the predominance of the following compounds: caffeic acid, chlorogenic acid, rutin, quercitrin and isoquercitrin. There is a study that demonstrated that chlorogenic acid presented antifungal activity against the yeast of the gender *Candida* [27]. Six flavonoids that were isolated from plants, among them, rutin, presented antibacterial and antifungal activity [25].

It is possible to speculate that some of these chemical constituents, especially the flavonoids, are responsible for the pharmacological properties found. However, the isolation and the activity of alkaloids and acetogenines have been stood out in studies with plants of the Annonaceae family. The antioxidant activity present in *A. muricata* can be attributed to the presence of acetogenines [28] and was described the antioxidant and antimicrobial capacity of some alkaloids isolated from the peel of *Annona salzannii* [29].

4. Conclusion

We can conclude that the crude extract of *D. furfuracea* (HEDF) and its methanolic (Mt-OH) and ethyl acetate (Ac-OEt) fractions have an important antioxidant activity (*in vitro*) when compared to other natural compounds. The HEDF presented highest antioxidant activity *in vitro* when compared to Mt-OH and Ac-OEt, as determined by DPPH and FRAP methods. However, it was not possible to observe a positive correlation between the antioxidant activity and the total index of phenols and flavonoids identified, indicating that compounds other than phenolics may contribute to the antioxidant potential of the plant extracts. The crude extract and fractions of *D. furfuracea* presented a synergistic activity with fluconazole when tested against strains of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*, indicating a potential antifungal activity via modulation of clinically used drugs against fungal infections. More studies are needed to clarify the mechanisms involved in this phenomenon as well as other potential biomedical and biotechnological applications of *D. furfuracea*.

Acknowledgement

This research was supported by FUNCAP/BPI-CNPq- CAPES, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5. References

1. Silva, C. R., Vieira, P. M., Santos, S. C., Chen-Chen, L. Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic activity and cytotoxicity in bacteria and mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*. v. 84, p. 149-156, 2012.
2. Rodrigues, A. M., De Paula, J. E., Degallier, N., Molez, J. E., Espinhola, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extract against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. v. 22, p. 314 -317, 2006.
3. Silva, D. B., Tulli, E. C. O., Militão, G. C. G., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., Moraes, M. O., Albuquerque, S., de Siqueira, J.M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial the activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*. v. 16, p. 1059-1063, 2009.
4. Silva, D. B.; Tulli, E. C. O., Garcez, W. S., Nascimento, E. A., Smith, J. M. Chemical Constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 18, p. 1560-1565, 2007.
5. Pinho, F. V. S. A, da Silva, G. F., Macedo, G. E., Muller, K. B., Martins, I. K., Ternes, A. P. L., da Costa, J. G. M., Athayde, M. L., Boligon, A. A., Kamdem, J. P., Franco, J. L., Menezes, I. R. A, Posser, T., 2014. Phytochemical constituents and toxicity of *Duguetia furfuracea* hydroalcoholic extract in *Drosophila melanogaster*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1155/2014/838101, 2014.
6. Brown, J. E., Rice-Evans, C. A. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*. *Free Radial Research*. v. 29, n. 3, p. 247-255, 1988.
7. Rao, C. V., Ojha, S. K., Radhakrishnan, K., Govindarajan, R., Rastogi, S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P. Antiulcer activity of *Utleria salicifolia* rhizome extract. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 91, p. 243-249, 2004.

8. Zhang, H., Chen, H. Niu, J., Wang, Y., Xie, L. Role of adaptive immunity in the pathogenesis of *Candida albicans* keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. v. 50, n. 6, p. 2653–2659, 2009.
9. Leite, M. C. A., Bezerra, A. P. B., Sousa, J. P., Guerra, F. Q. S., Lima, E. O., 2014. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2014/378280, 2014.
10. Chandrasekar, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 66, p. 457-465, 2011.
11. Mishra, B. B., Tiwari, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.46, n.10, p.4769 – 4807, 2011.
12. Matos, F. J. A., 2009. *Introdução à fitoquímica experimental*. 3 ed. Editora Univ. Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
13. Boligon, A. A., Brum, T. F., Frolhich, J. K., Froeder, A. L. F., Athayde, M. L. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Research Journal of Phytochemistry*. v. 6, p. 4-91, 2012.
14. Boligon, A. A., Kubiça, T. F., Mário, D. N., Brum, T. F., Piana, M., Weiblen, R. Lovato, L., Alves, S.H., Santos, R.C.V., Alves, C.F.S., Athayde, M.L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extract. *Acta Physiol Plant*. v. 35, p. 2229-2239, 2013.
15. Swain, T. & Hillis, W. E. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica* I. - The Quantitative analysis of Phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 10, p. 63-68, 1959.
16. Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Caizin, J.C., Bailleul, F., Trptin, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moech) Hull and flour. *Journal of Ethnopharmacol*. v. 72, p. 35-42, 2000.
17. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. v. 28, p.25-30, 1995.

18. Benzie, I. F. F., Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. v. 239, p. 70–76, 1996.
19. CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. CLSI document M27-S4, Wayne, PA, 2012.
20. Javadpour, M. M., Juban, M. M., Lo, W. C., Bishop, S. M., Alberty, J. B., Cowell, S. M., Becker, C., McLaughlin, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 39, p. 3107-3113, 1996.
21. Coutinho. H. D. M., Costa, J. G. M., Falcão-Silva, V. S., Siqueira-Junior, J. P., Lima, E. O. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. Against MRSA. *Acta alimentaria*. v. 41, p.67–72, 2012.
22. Sousa de Sá, P. G., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Siqueira-Filho, J. A. Fontana, A. P., Damasceno, P. K. F., Branco, C. R. C., Branco, A., Almeida, J. R. G. S. Total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity of *Selaginella convoluta* (Arn.)Spring (Selaginellaceae), *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. v. 33, p. 561-566, 2012.
23. Como, J. A., Dismukes, W. E., 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *New England Journal of Medicine*. v. 330, p. 263-272, 1994.
24. Fernandes, C. N., Sousa, H. H. F., Borgues, M. C. M., Souza, C. E. S., Guedes, G. M. M., Figueiredo, F. G., Tintino, S.R., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Kerntopf, M.R., Felipe, C.F.B. Evaluation of the modulatory and antibacterial activity of the ethanolic extract and fractions of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 8, p. 16-20, 2014.
25. Orhan, D. D., Ozcelik, B., Ozgen, S., Ergun, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*. v. 165, p. 496-504, 2010.
26. Sohn, H. Y., Son, K. H. Kwon, C. S., Kwon, G. S., Kang, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morusalba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine*. v. 11, p. 666-762, 2004.

27. Lee, J.H., Park, J.H., Kim, Y.S., Han, Y., 2008. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International immunopharmacology*. v. 8, p. 1681-1685, 2008.
28. Baskar, R., Rajeswari, V., Kumar, T.S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 45, p. 480-485, 2007.
29. Costa, E. V., Cruz, P. E. O., Lourenço, C. C., Moraes, V. R. S., Nogueira, P. C. L., Salvador, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* D.C. (Annonaceae). *Natural Product Research*. v. 27, p. 002-1006, 2012.

Figures

Fig. 1. Elution profiles of high performance liquid chromatography analysis a) methanolic (Mt-OH) and b) ethyl acetate (Ac-OEt). Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), rutin (peak 6), isoquercitrin (peak 7), quercitrin (peak 8), quercetin (peak 9), kaempferol (peak 10). Calibration curve of the gallic acid: $Y = 14286x + 1395.8$ ($r = 0.9996$); catechin: $Y = 15097x + 1189.3$ ($r = 0.9997$); caffeic acid: $Y = 12758x + 1259.7$ ($r = 0.9996$); chlorogenic acid: $Y = 13461x + 1275.3$ ($r = 0.9992$); ellagic acid: $Y = 13576x + 1346.4$ ($r = 0.9999$); rutin: $Y = 12845 + 1305.7$ ($r = 0.9999$); quercetin: $Y = 13560x + 1192.6$ ($r = 0.9991$), isoquercitrin : $Y = 12873x + 1325.6$ ($r = 0.9998$); quercitrin: $Y = 11870x + 1329.8$ ($r = 0.9993$) and kaempferol: $Y = 14253x + 1238.9$ ($r = 0.9997$).

Fig. 2. Modulatory activity of a) Methanolic fraction (Mt-OH) and b) Ethyl acetate fraction (Ac-OET) against the fungi *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* (the concentrations of fluconazole and nystatin ranging from 1024 $\mu\text{g/mL}$ to 0.5 $\mu\text{g/mL}$). *** value statistically significant with $P < 0.0001$.

Table 1. Quantification of phenolic compounds of HEDF. Me-OH and Ac-OEt.

Compounds	Me-OH fraction	Ac-OEt fraction	LOD	LOQ
	mg/g	mg/g	µg/mL	µg/mL
Gallicacid	5.47± 0.03	9.85±0.01	0.015	0.049
Catechin	2.69± 0.01	3.16±0.02	0.032	0.105
Chlorogenic acid	7.18± 0.01	25.78±0.01	0.009	0.029
Caffeic acid	32.47± 0.03	21.90±0.03	0.024	0.078
Ellagic acid	7.25 ± 0.01	11.17±0.01	0.013	0.042
Rutin	19.67± 0.02	5.49 ± 0.02	0.027	0.090
Isoquercitrin	14.83± 0.01	31.56±0.01	0.008	0.026
Quercitrin	31.96± 0.03	32.97±0.037	0.035	0.114
Quercetin	6.95 ± 0.01	18.73 ± 0.01	0.019	0.063
Kaempferol	6.91 ± 0.02	20.98 ± 0.02	0.026	0.085

Results are expressed as mean ± S.E. of three determinations. LOD = limit of detection. LOQ = limit of quantification.

Table 2. Total phenols and flavonoids present in extract and fractions of *D. furfuracea*.

Samples	Total Phenols	Total Flavonoids
	mg of EAG/g of the sample	mg of EQ/g of the sample
HEDF	231.26 ± 1.15	76.26 ± 2.73
Mt-OH	289.33 ± 1.22	87.57 ± 2.48
Ac-OEt	657.05 ± 6.33	120.9 ± 2.53

The values were expressed as mean ± SD (n=3); EAC=equivalent of gallic acid; EQ= equivalent of quercetin.

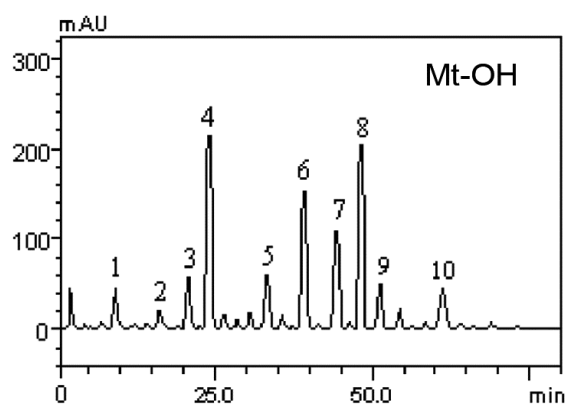
Table 3. Antioxidant activity of HEDF and fractions of *D. furfuracea*.

Samples	Sequestering of the radical DPPH	FRAP
	EC ₅₀ (µg/ml)	EFe ^{II} /g of the sample µM de Fe ^{II} /g of the sample
HEDF	33.15 ^b	166.73 ± 5.13
Mt-OH	42.32 ^c	126.43 ± 4.98
Ac-OEt	39.32 ^c	118.20 ± 1.08
Asc. Ac.	17.50 ^a	-

The values were expressed as mean ± S.D. (n=3); EFe^{II} = Equivalent of Iron; HEDF (hydroalcoholic extract of *D. furfuracea*); Mt-OH (methanolic fraction); AcOEt (ethyl acetate fraction) and Asc. Ac. (ascorbic acid). Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). Averages followed by different letters differ by Tukey's test at $P < 0.05$.

Fig. 1.

a)



b)

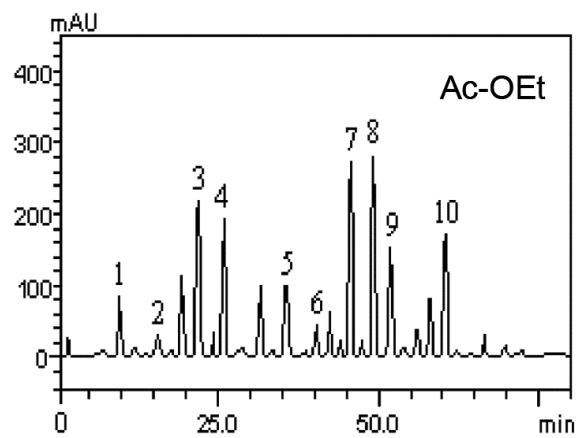


Fig. 2.

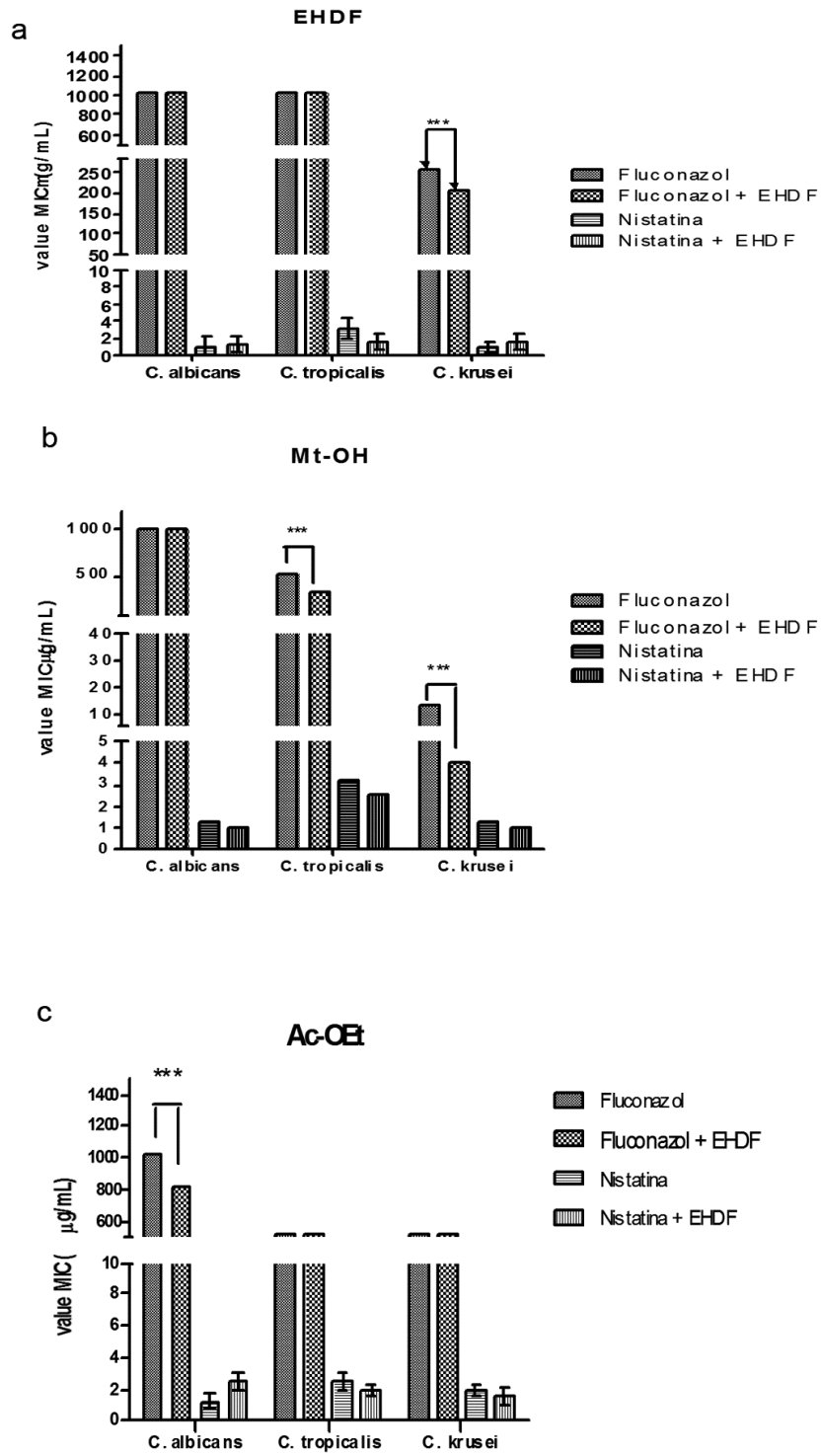


Figure 2

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi analisada a composição fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EHDF) e frações e o efeito do EHDF em modelo de *Drosophila melanogaster*. Concomitantemente, foi avaliado o potencial antioxidante (*in vitro*), e a atividade antifúngica e/ou moduladora do extrato e frações.

Em análise fitoquímica preliminar do EHDF foram rastreados alcaloides, taninos, xantonas, auronas, chalconas, flavona e flavonóis. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHDF e frações resultou para o EHDF o ácido caféico, rutina e quercitrin como os principais compostos, enquanto que o ácido gálico, catequina e kaaempferol foram os menos abundantes. **(Artigo)**. Na fração metanólica (Mt-OH) destacou-se o ácido cafeico e quercitrina, enquanto em menor proporção catequina e o ácido gálico. Para fração acetato de etila (Ac-OEt) os maiores constituintes foram quercitrina e isoquercitrina, enquanto catequina e rutina foram os menos presentes **(Manuscrito)**.

A capacidade antioxidante de produtos naturais tem sido bem documentada para diversas famílias de plantas medicinais, sendo esse potencial muitas vezes relacionado com a presença de flavonoides. Nesse estudo a quantificação total de compostos fenólicos e flavonoides foi maior nas frações Ac-OEt e Mt-OH do que no EHDF **(Manuscrito)**. Resultado semelhante aparece em outros estudos, onde a maior concentração de compostos fenólicos também foi identificada na fração acetato de etila quando comparada com a fração metanólica e ao extrato bruto (ROSA et al., 2009). Entretanto, a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* evidenciou-se melhor no HEDF do que nas frações, para os ensaios de DPPH e FRAP **(Manuscrito)**. A atividade antioxidante do extrato foi semelhante à exibida por outros extratos de plantas também conhecidas por suas propriedades terapêuticas (MAVI et al., 2004; ALHAKMANI et al., 2013). Estudos com extratos descrevem uma ampla faixa de variação na atividade antioxidante desses compostos naturais além de resultados diversificados quando são obtidos por meio de testes *in vitro* ou *in vivo* (SOTIBRÁN et al., 2011; SOUSA DE SÁ et al., 2012).

Nesse estudo não foi possível correlacionar a maior atividade antioxidante exibida pelo extrato seguido das frações, aos níveis totais de compostos fenólicos identificados em ambos **(Manuscrito)**. Levando em consideração a constituição fitoquímica das amostras, o ácido caféico e gálico aparecem em maior proporção no extrato bruto (EHDF), alguns estudos

descrevem o potencial antioxidante desses compostos (KEREM et al., 2006; HUBKOVÁ et al., 2014).

Embora não seja possível inferir com precisão a classe de compostos responsáveis pela ação antioxidante do extrato e frações, está bem estabelecido na literatura o potencial antioxidante dos flavonoides (SOUSA DE SÁ et al., 2012; KUMAR; PANDEY et al., 2013). Possivelmente fatores como natureza química de certos compostos e o sinergismo entre os mesmos possam ter contribuído para o melhor potencial antioxidante do extrato (**Manuscrito**).

Nesse estudo foram investigados os efeitos bioquímicos e comportamentais do consumo do EHDF em modelo de *D. melanogaster* que tem se mostrado relevante na triagem de substâncias tóxicas, além de servir como uma ferramenta molecular capaz de elucidar melhor os mecanismos envolvidos nessa toxicidade (KIM et al., 2011)

O EHDF foi associado à dieta padrão de *D. melanogaster* durante sete dias em diferentes concentrações, o que resultou em aumento significativo da mortalidade no terceiro dia de exposição das moscas as concentrações de 100 e 200mg/ml, e promoveu alterações na motilidade das mesmas mediante a concentração de 50mg/ml (**Artigo**).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela degradação da acetilcolina, em sinapses colinérgicas e neuromusculares em muitos animais incluindo os insetos. A acetilcolina (Ach) tem função relacionada a qualidade de processo cognitivo, ao sistema de motivação e recompensa e junção neuromuscular. A inibição da AChE compromete a hidrólise desse neurotransmissor e leva à acumulação do mesmo nas junções sinápticas (CALIC et al., 2006; ROBERTS; AARON, 2007). Estudos revelam que esta enzima é inibida por agentes tóxicos como rotenona, paraquat e organofosforados gerando nos organismos a perda da homeostase colinérgica (EYER, 1995; MIYAZAWA et al., 2004; DA SILVA et al., 2006; KIM et al., 2013). Neste estudo a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi aumentada nas moscas expostas as concentrações de 1 e 10 mg/ml e inibida mediante a concentração de 50 mg/ml do HEDF. Estudo com onze extratos de cinco espécies de plantas da família Annonaceae, dentre elas *D. furfuracea*, revelou a atividade anticolinestersásica e antitumoral desses extratos (FORMAGIO et al., 2014). Estudos mostram que aumento na atividade da AChE causa redução na neurotransmissão colinérgica e afeta outras funções relacionadas, incluindo a proliferação celular e promoção de apoptose (JIN et al., 2004; SCHMATZ et al., 2009).

Existem provas substanciais que extratos de plantas podem causar toxicidade em células gerando fluidez excessiva ou desnaturação das membranas celulares como resultado

da promoção de estresse oxidativo (DE FREITAS et al., 2008; NTELIOS et al., 2013). Nessa vertente, esse estudo avaliou a viabilidade celular das moscas, que se mostrou significativamente comprometida para todas as concentrações testadas do EHDF (1; 10 e 50mg/ml) embora tenha sido observado um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio apenas nas moscas expostas a concentração de 50mg/ml do EHDF. O mecanismo de toxicidade de vários compostos sintéticos e naturais pode está relacionado à produção elevada na geração de radicais livres e/ou alterações no sistema de defesa antioxidante. Nesse contexto foi avaliada a influência do extrato (*ex vivo*) na atividade das defesas enzimáticas glutationa-S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e não enzimáticas, os tióis proteicos e não proteicos (GSH/PSH). A exposição das moscas as concentrações de 1 e 10 mg/ml do HEDF, resultou em aumento significativo na atividade das enzimas GST, SOD e CAT. Este aumento pode representar uma resposta celular adaptativa, objetivando a neutralização do aumento de ROS identificado nas concentrações mais baixas (1 e 10 mg/ml) do HEDF (**Artigo**). Níveis baixos a moderados de estresse oxidativo conduz a aumento nos sistemas de defesa antioxidante. Estudos demonstraram que moscas expostas a rotenona apresentaram uma elevação significativa das enzimas antioxidantes (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2009).

A elevação na produção de ROS identificada nas moscas expostas a concentração de 50 mg/ml do EHDF, pode ser, pelo menos em parte, responsável pela depleção de GST bem como pela diminuição de NPSH (GSH) identificados (**Artigo**). Estudos relacionam níveis reduzidos de GSH em *D. melanogaster* a aumento de estresse oxidativo como resultado da exposição desses organismos a agentes promovem aumento de ROS (HOSAMANI; RAMESH, 2010).

Estresse oxidativo promove peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial, danos a proteínas e ácidos nucleicos, alterando assim, a função normal das células inclusive levando a morte (VALKO et al., 2007). PARP (Poly-ADP-ribose polymerase) é uma proteína envolvida na reparação do DNA, porém esta proteína pode ser clivada por caspases, família de proteínas ativadas durante o processo de apoptose celular. Há anticorpos que reconhecem especificamente o componente de menor peso molecular, resultante dessa clivagem. Nesse sentido, foi investigada a clivagem da PARP como um índice geral de morte celular, a qual se confirmou nas moscas expostas a todas as concentrações do EHDF analisadas. Nesse mesmo contexto, as MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) são família de proteínas responsáveis pela transdução de sinais a partir da ativação de receptores da membrana, através de uma cascata de fosforilação de proteínas até formação de fatores de transcrição que

regulam a expressão gênica. Os três grandes membros dessa família são ERK (cinase regulada por sinais extracelulares), JNK (cinase região c-jun N-terminal) e p³⁸ MAPK (STRONACH; PERRIMON, 1999; ZHOU et al., 2007). Estão relacionadas a várias funções como crescimento, diferenciação e apoptose. Sendo também afetadas por vários poluentes ambientais, incluindo metais pesados. (PAULA et al., 2012). Normalmente, a ERK é ativada por estímulos miogênicos e regula principalmente o crescimento e diferenciação celular. A JNK e a p³⁸MAPK são ativadas por estresse celular, citocinas inflamatórias e estão envolvidas no processo apoptótico (STRONACH; PERRIMON, 1999). Estudos demonstraram que compostos derivados de plantas, como a curcumina pode modular esta via, a qual está envolvida na propriedade antitumoral atribuída a este composto (CHU; LEVINTHAL; KULICH, 2004; ZHOU et al., 2007). Nesse estudo, a exposição de moscas a 10 mg/mL do HEDF aumentou significativamente a fosforilação de ERK. É bem conhecido que a via ERK é suscetível ao estresse oxidativo (ZHOU et al., 2007). Além disso, o peróxido de hidrogênio, metais, e outros fatores geradores de estresse celular estimulam a fosforilação desta proteína MAPK contribuindo assim para a ativação de diversos alvos citoplasmáticos como fatores de transcrição (TIBBLES; WOODGETT, 1999; POSSER et al., 2009). Demonstrou-se também que as plantas medicinais são capazes de induzir a ativação de genes dependente do fator de transcrição Nrf-2 por via da ERK. Este fator de transcrição é conhecido como o principal regulador da resposta antioxidante celular por estar relacionado à expressão de várias enzimas antioxidantes (RICHTER; WINKEL; SCHUMMER, 2014). Nesse estudo a fosforilação de ERK ocorreu em paralelo ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes, sugerindo a ativação de Nrf-2 como alvo do EHDF, entretanto mais estudos serão necessários para comprovar esta hipótese (**Artigo**).

Nesse trabalho foi detectada a presença de alcalóides e chalconas, além de compostos polifenólicos, no EHDF. Alcalóides, chalconas e alguns análogos têm sido reportados como sendo tóxicos em modelos de zebrafish (LEE et al., 2014). Em alguns trabalhos com *D. furfuracea* foram isolados alcaloides sendo que o potencial citotóxico apresentado foi relacionado à presença e natureza química desses compostos (MESQUITA et al., 2005; SILVA et al., 2006; CAROLLO et al., 2006). Alcaloides oxoaporfirínicos isolados a partir de três espécies da família Annonaceae, incluindo *D. furfuracea*, demonstraram efeito citotóxico em linhagem de células de carcinoma da laringe (Hep2) (SILVA et al., 2007a; 2007b). Por outro lado, um estudo demonstrou a potencialidade de flavonoides isolados de *Arachniodes exilis* promover stress oxidativo e induzir a morte celular por apoptose em células de hepatoma humano HepG2. O flavonóide quercetina causou morte celular por apoptose em

diferentes tipos de células tumorais humanas de forma dependente da fosforilação de ERK, e este efeito ocorreu em paralelo a aumento na produção ROS (LI et al., 2014). Outro estudo demonstrou que o flavonóide quercetina em baixas concentrações, teve efeito protetor contra a toxicidade induzida por H₂O₂, enquanto que, em concentrações mais elevadas introduziu a morte por apoptose em células de hepatoma atuando como um agente pró-oxidantes (WATJEM et al., 2005; METODIEWA et al., 1999).

Este estudo demonstrou que os efeitos do extrato bruto (EHDF) sobre parâmetros bioquímicos e de sobrevivência em *D. melanogaster* depende da concentração e tempo de exposição (**Artigo**).

A ocorrência de infecções fúngicas aumenta a taxas alarmantes, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS, pacientes transplantados, e recém-nascidos (ZHANG et al., 2009). Entre os agentes patogênicos, espécies de *Cândida* são geralmente associados com essas infecções, cuja incidência está atribuída a uma variedade de fatores, ou exógenas ou endógenas. Mais de 100 espécies de *Cândida* são conhecidas e a frequência de distribuição varia de acordo com a localização geográfica (LEITE et al., 2014).

Assim a toxicidade de *D. furfuracea* evidenciada nesse estudo, foi também testada contra estirpes padrão de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. O EHDF e frações Ac-OEt e Mt-OH não apresentaram atividade fungicida, considerando que a concentração inibitória mínima (CIM) identificada para essas amostras foi $\geq 1,024 \mu\text{g/ml}$ contra todas as estirpes de fungos testadas. Entretanto, o extrato e as frações apresentaram efeito sinérgico quando associadas ao fluconazol, melhorando a eficiência desse antifúngico. O HEDF e a fração Mt-OH potencializou o efeito do fluconazol quando testado contra a *C. krusei* e a fração Mt-OH apresentou sinergismo com fluconazol também contra *C. tropicalis*. A fração Ac-OEt potencializou o efeito do fluconazol contra *C. albicans* (**Manuscrito**). O principal mecanismo de ação do fluconazol ocorre através da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51), que é uma enzima citocromo P-450, envolvida na síntese do ergosterol, o esterol mais importante na membrana da célula fúngica (COMO; DISMUKES, 1994). Sabe-se que muitas plantas medicinais podem apresentar atividade antimicrobiana bem como modular a atividade de vários fármacos clinicamente relevantes (COUTINHO, et al., 2012; TINTINO et al., 2013).

Os compostos fenólicos e flavonóides demonstraram potenciais atividades terapêuticas como agentes antifúngicos, agentes antibacterianos e anti-oxidantes (ORHAN et al., 2010). Embora os mecanismos subjacentes à farmacologia antimicrobiana dos compostos fenólicos sejam bastante variáveis, muitos atuam promovendo danos e alterando a função da parede ou

membrana celular (SOHN et al., 2004). A análise por HPLC do extrato e frações de *D. furfuracea* revelou a presença de ácido clorogênico e rutina. Estudo demonstrou que o ácido clorogênico apresentou atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* (LEE et al., 2008). Seis flavonóides isolados de plantas, entre elas, a rutina, apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (ORHAN et al. 2010). No entanto, é prevenida considerar que o isolamento e a atividade de alcalóides se destacam nos estudos com plantas da família Annonaceae. Em Costa et al (2012), a capacidade antioxidante e antimicrobiana foram relacionadas a alcaloides isolados a partir da casca de *Annona salzannii*.

Os extratos vegetais são uma mistura de compostos que atuam de forma complexa em diferentes alvos moleculares gerando efeitos sinérgicos cuja compreensão ainda está longe de ser elucidada (WANG et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012; LIAUDANSKAS et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o extrato bruto de *Duguetia furfuracea* (HEDF) e suas frações metanólica (Mt-OH) e acetato de etila (Ac-OEt) apresentaram atividade antioxidante (*in vitro*). O HEDF apresentou maior atividade antioxidante quando comparado as frações nos métodos DPPH e FRAP. Esse estudo demonstra de forma inédita a toxicidade de *D. furfuracea* no modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*, evidenciado por alterações em vários marcadores de estresse celular e parâmetros comportamentais. O EHDF aumentou significativamente a fosforilação de ERK (a qual é suscetível ao estresse oxidativo) envolvida na toxicidade de muitos compostos. A toxicidade induzida pelo extrato nas moscas pode ser atribuída a uma ação individual ou sinérgica de fitoquímicos encontrados nesta planta. Em geral, nossos resultados sugerem que o estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo subjacente a toxicidade induzida por *D. furfuracea* em *D. melanogaster*. O extrato bruto e frações apresentaram ainda atividade sinérgica com fluconazol quando testado contra cepas de *Candida albicans*, *Candida trocalis* e *Candida krusei*, indicando potencial modulador de atividade antifúngica. Mais estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nesses fenômenos, bem como outras potenciais aplicações de *D. furfuracea*.

7 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Esse trabalho identifica a toxicidade do extrato bruto de *Duguetia furfuracea* (HEDF) mediante alterações comportamentais e em vários marcadores de estresse celular em *Drosophila melanogaster*. Ainda, o extrato bruto e frações metanólica (Mt-OH) e acetato de etila (Ac-OEt) potencializaram o efeito do fluconazol quando testado contra diferentes cepas de *Candida*. Nesse sentido esse estudo tem como perspectivas:

- Estudos (*in vivo*) para identificar o nível de toxicidade aguda em modelos de mamíferos;
- Avaliar a atividade genotóxica em modelos celulares;
- Investigar o envolvimento da expressão de NRF2 na resposta celular mediante a toxicidade da planta;
- Investigar o potencial modulatório antifúngico frente a outros fármacos;

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE, S. D.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* linn. (annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **Afr. J. Traditional.** v. 6, n. 1, p. 30-41, 2009.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacognosia**, vol. 17, p. 114-140, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova.** v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species and other genetic Causing damage. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBAROS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst.** v. 125, p. 989-1009, 2000.
- ARAÚJO, M. G. F; HILARIO, F.; VILEGAS, W.; SNATOS, L. C.; BRUNETTI, I. L.; SOTOMAYOR, C. E.; BAUAB, T. M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. **International Journal of Molecular Sciences.** doi: 10.3390/ijms13079260, 2012.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Braz. J. Food. Technol.** v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.
- BAE, H. S.; KIM, H. J, KANG, J. H.; KUDO, R.; HOSOYA, T.; KUMAZAWA, S.; JUN, M.; KIM, O. Y.; AHN, M. R. Anthocyanin Profile and Antioxidant Activity of Various Berries Cultivated in Korea. **Nat Prod Commun.** v. 10, n. 6, p. 963-968, 2015.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas Mediciniais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem.** v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry.** v. 99, p. 191–203, 2006.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. O. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences.** v. 78, p. 431-441, 2005.
- BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology.** v. 45, p. 480-485, 2007.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance **Nutr. Rev.** v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BECKINGHAM, K. M.; ARMSTRONG, J. D.; TEXADA, M. J.; MUNJAAL, R.; BAKER, D. A. *Drosophila melanogaster*-the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. **Gravitational Space Biology Bulletin.** v. 18, p.17–29, 2005

BOUFFET, E.; JAKACKI, R.; GOLDMAN, S.; HARGRAVE, D.; HAWKINS, C.; SHROFF, M.; HUKIN, J.; BARTELS, U.; FOREMAN, N.; KELLIE, S.; HILDEN, J.; ETZL, M.; WILSON, B.; STEPHENS, D.; TABORI, U.; BARUCHEL, S. Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. **J. Clin. Oncol.** v. 30, n.12, p.1358-63, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.** v. 28, p. 25-30, 1995.

CALIC, M.; VRDOLIAK, A. L.; RADIC, B.; JELIC, D.; JUN, D.; KUCA, K.; KOVARIK, Z. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. **Toxicology.** v. 219, p. 85-96, 2006.

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.

CAROLLO, C. A.; CAROLLO, A. R. H.; SIQUEIRA, J. M.; ALBUQUERQUE, S. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. **J. Chil. Chem. Soc.** v. 51, n. 2, p. 837-841, 2006a.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M.; GARCEZ, W. S.; DINIZ, R.; FERNANDES, N. G. N-Nitrosoanonaine and N-Nitrosoxylophine, Aporphine Alkalids from *Duguetia furfuracea*. **Journal of Natural Products.** v. 69, p. 1222-1224, 2006b.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 66, p. 457-465, 2011.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 66, p.457-465, 2011.

CHATROU, L. W.; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, P. J. M. Studies in annonaceae XXXVI. The *Duguetia* alliance: where the ways part. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v. 87, p. 234-245, 2000.

CHU, C. T.; LEVINTHAL, D. J.; KULICH, S. M. Oxidative neuronal injury: The dark side of ERK1/2. **Eur. J. Biochem.** v. 271, n 11, p. 2060-2066, 2004.

- COELHO, L. S.; FELICIO, L. P.; MIRANDA, C. T.; SILVA, E. M.; VALE, C. R.; LIMA, D. C. S.; DUARTE, S. R.; FERREIRA, H. D.; CHEN-CHEN, L.; CARVALHO, S. Modulatory effects of *Duguetia furfuracea* (A. St. Hil) Benth. and Hook. f. in *Drosophila melanogaster* somatic and germinative cells. **Genetics and Molecular Research**. v. 10, n.1, p. 75-85, 2011.
- COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, S.; BALLESTRER, I.; XAUS, J.; GALVEZ, J.; ZARZUELO, A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway,” **Eur. J. Immunol.** v. 35, p. 584-592, 2005.
- COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **New England Journal of Medicine**. v. 330, p.263-272, 1994.
- COSTA, E. V.; CRUZ, P. E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona A. salzmannii*. DC.(Annonaceae). **Nat. Prod. Res.** v. 27, n.11, p. 1002-6, 2013.
- COUTINHO, H. D. M. Factors Influencing the Virulence of *Candida spp.* **West Indian Medical Journal**, v. 58, p. 160-163, 2009
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; LIMA, E. O. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. Against MRSA. **Acta alimentaria**. v. 41, p. 67–72, 2012.
- CRUZ, R. A. O.; LÓPEZ, J. L. C.; AGUIAR, G. A. G.; GARCIA, H. A.; CORINSTEIN, S.; ROMERO, R. C.; SÁNCHEZ, M. R. Influence of Sorghum Kafirin on Serum Lipid Profile and Antioxidant Activity in Hyperlipidemic Rats (In Vitro and In Vivo Studies). **BioMed Research International**. doi.org/10.1155/2015/164725, 2015.
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. v. 22, p. 39-44, 2003.
- DA SILVA, A. P.; MEOTTI, F. C.; SANTOS, A. R.; FARINA, M. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. **Neurotoxicology**. v. 27, n. 6, p. 1101-1105, 2006.
- DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M.; COSTA HUSS, J. C. DE SOUZA, T. M.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**. v. 22, p. 219–224, 2008.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 26, n 2, p. 446-452, 2006.
- EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds. **Human Experimental Toxicology**. v. 14, n.1, p. 857-864, 1995.

- ERICKSON, L. Rooibos tea: research into antioxidant and antimutagenic properties. **Herbal Gram.** v.59, p. 34-45, 2003.
- FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; DA CUNHA, L. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia funciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 12, p. 17-19, 2002.
- FERNANDES, C. N.; SOUSA, H. H. F.; BORGUES, M. C. M.; SOUZA, C. E. S.; GUEDES, G. M. M.; FIGUEIREDO, F. G.; TINTINO, S.R.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R.; FELIPE, C.F.B. Evaluation of the modulatory and antibacterial activity of the ethanolic extract and fractions of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 8, p.16-20, 2014.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v. 43, n.1, p. 61-8, 1997.
- FONTE, N. N.; CAVALLET, V. J.; BIASI, L. A. A complexidade do trabalho com plantas medicinais: uma reflexão necessária. **Rev. Bras. Plant. Med.** v. 7, n. 1, p. 16-22, 2004.
- FORMAGIO, A. S N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Antioxidants.** v. 3, p. 745-757, 2014.
- FOKOU, P. V. T.; NYARKO, A. K.; APPIAN-OPONG, R.; YAMTHE, L. R. T.; ADDO, P.; ASANTE, I. K.; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological reports on anti-Buruli ulcer medicinal plants in three west African countries. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 172, p. 297-311, 2015.
- GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation,** v. 17, n. 2, p. 153-163, 1999.
- GOPALAKRISHNAN, R.; SUNDARAM, J.; SATTU, K.; PANDI, A.; THIRUVENGADAM, D. Dietary supplementation of silymarin is associated with decreased cell proliferation, increased apoptosis, and activation of detoxification system in hepatocellular carcinoma. **Mol. Cell. Biochem.** v. 377, p.163-76, 2013.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and Medicine. **Oxford Press,** 3. ed., Londres, p. 899, 1999.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology.** v. 141, p. 312–322, 2006.
- HEJAZI, E.; NASROLLAHZADEH, J.; FATEMI, R.; BARZEGAR-YAR, M. L.; SALIMINEJAD, K.; AMIRI, Z.; KIMIAGAR M.; HOUSHYARI M.; TAVAKOLI M.; IDALI, F. Effects of Combined Soy Isoflavone Extract and Docetaxel Treatment on Murine 4T1 Breast Tumor Model. **Avicenna J Med Biotechnol.** v. 7, n 1, p.16-21, 2015.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*," **Neurotoxicology**. v. 30, n. 6, p. 977-985, 2009.

HOSAMANI, R.; RAMESH, S. R.; MURALIDHARA. Attenuation of rotenone-induced mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* supplemented with creatine. **Neurochem. Res.** v. 35, p. 1402-1412, 2010.

HUBKOVÁ, B.; VELIKA, B. BIRKOVÁ, A. GUZI, J.; MAREKOVÁ, M. Hydroxybenzoic acids and their derivatives as peroxynitrite scavengers. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 75, p. S33-S34, 2014.

JIN, Q. H.; HE, H. Y.; SHI, Y. F.; LU, H.; ZHANG, X. -J. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 25, p. 1013–1021, 2004.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2014a. cap. 56, p. 1001-1014.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2014b. cap. 48, p. 849-859.

KAREM, Z.; CHETRIT, P.; SHOSEYOU, O.; REGEU-SHOSHANI, G. Protection of Lipids from Oxidation by Epicatechin, *trans*-Resveratrol, and Gallic and Caffeic Acids in Intestinal Model Systems. **J. Agric. Food. Chem.** v. 54, n. 26, p. 10288-10293, 2006.

KIM, H.; PARK, B.; LEE, K.; YONG CHOI, C. Y.; JANG, S. S.; KIM, Y.; LEE, S. Effects of Naturally Occurring Compounds on Fibril Formation and Oxidative Stress of α -Amyloid. **J. Agric. Food Chem.** v. 53, p. 8537-8541, 2005.

KIM, S. -I.; JUNG, J. -W.; AHN, Y.-J.; RESTIFO, L. L.; KWON, H.-W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **Asia Pacific Entomology Journal**. v. 14, p.509–517, 2011.

KIM, Y.; LEE, S. H. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the class insect? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 43, p. 47-53, 2013.

KONG, K. W.; MAT-JUNIT, S; AMINUDIN, N.; ISMAIL, A.; ABDUL-AZIZ, A. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. **Food Chemistry**. v. 134, p. 324–332, 2012.

KUMAR, S; PANDEY, A. Chemistry and Biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**. doi: 10.1155/2013/162750, 2013.

LEE, J. H.; PARK, J. H.; KIM, Y. S.; HAN, Y. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. **Int. Immunopharmacol.** v. 8, n.12, p.1681-5, 2008.

LEE, Y. T.; FONG, T. H.; CHEN, H. M.; CHANG, C. Y., WANG, Y-H.; CHERN, C-Y.; CHEN, Y-H. Toxicity assessments of chalcone and some synthetic chalcone analogues in a zebrafish model, **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 641-650, 2014.

LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. B.; SOUSA, J. P.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. O. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**. doi:10.1155/2014/378280, 2014.

LI, H.; CHEN, J.; XIONG, C.; WEI, H.; YIN, C.; RUAN, J. Apoptosis induction by the total flavonoids from *Arachniodes exilis* in HepG2 Cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction involving MAPK activation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. doi: 10.1155/2014/906941, 2014.

LIANG, M.; DA, X.; HE, A.; YAO, G.; WEN XIE, W.; GANG LIU, G.; XIANG, J.; MING, Z. Pentamethylquercetin (PMQ) reduces thrombus formation by inhibiting platelet function. **Scientific Reports**. doi: 10.1038/srep11142, 2015.

LIAUDANSKAS, M.; VISKELIS, P.; RAUDONIS, R.; KVIKLYS, D.; VSELIS, N.; JANULIS, V. Phenolic composition and antioxidante activity of *Malus domestica* leaves. **The Scientific World Journal**. doi:10.1155/2014/306217, 2014.

LIPP, F. J. The efficacy, history, and politics of medicinal plants. **Alternative Therapies in Health and Medicine Journal**. v. 2, n. 4, p.36-41, 1996.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A. Antifungal Drug Resistance. **Clinical Infectious Diseases**. v. 36, p 531-541, 2003.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2 ed. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2008.

LU, X.; LIAO, T.; DING, L.; LIU, X.; ZHANG, Y.; CHENG, Y.; DU, J. Interaction of Quercetin with Supported Bilayer Lipid Membranes on Glassy Carbon Electrode. **Int. J. Electrochem. Sci**. v. 3, p.797 – 805, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. R. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MATOS, F. J. A. **Indrodução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009, 148p.

MAVI, A.; TERZI, Z.; OZGEN, V.; YILDIRIM, A.; COSKUN, M. Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). **Biol. Pharm. Bull**. v. 27, n. 5, 2004.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

METODIEWA, D.; JAISWAL, A. K.; CENAS, N.; DICKACAITÉ, E.; SEGURA-AGUILAR, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radical Biology and Medicine.** vol. 26, pp. 107-116, 1999.

MICALLEF, M. A.; GARG, M. L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. **Atherosclerosis.** v. 204, n.2, p.476-82, 2009.

MISRA, J.R.; HORNER, M.A.; LAM, G.; THUMMEL, C.S. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. **Genes Dev.** v. 25, n.17, p.1796-806, 2011.

MIYAZAWA, M.; TSUKAMOTO, T.; ANZAI, J.; ISHIKAWA, Y. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. **Journal Agricultural and Food Chemistry.** v. 52, p.4401-4405, 2004.

MONTEIRO, D. M.; ALBUQUERQUE, V. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quimica Nova.** v. 28, n 5, p. 892-896, 2005.

MOTTA, E.V.S.; PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Rev. Bras. Plant. Med.** v.15, n.2, p.264-272, 2013.

NANCE, C. L.; SIWAK, E. B.; SHEARER, W. T. Preclinical Development of the Green Tea Catechin, Epigallocatechin Gallate, as an HIV-1 Therapy. **Journal Allergy Clin. Immunol.** V. 123, n. 2, p. 459-465, 2009.

NASCIMENTO, G. G. F. ; LOCATELLI, J. ; FREITAS, P. C. ; SILVA, G. L. E. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal Nat. Products.** v. 75, n. 3, p.311-335, 2012.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OTOOLEP, W. Potentiation of methicillin activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Lett.** v. 179, n. 2, p. 233-239, 1999.

NIEMETZ, R.; GROSS, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry.** v.66, n.17, p. 2001-11, 2005.

NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLORIA, L. L.; OLIVEIRA, D. B. Flavonóides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vertices.** n. 14, n. 1, p. 39-57, 2012.

NOSCHANG, C. G.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L. F.; AVILA, M.C.; FACHIN, A.; ARCEGO, D.; VON POZZER TOIGO E.; CREMA, L. M.; DIEHL, L. A.; VENDITE, D.; DALMAZ, C. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. **Neurochem.** v. 34, n 9, p. 1568-74, 2009.

NTELIOS, D.; KARGAKIS, M.; TOPALIS, T.; DROUZAS, A.; POTOLIDIS, E. Acute respiratory failure due to *Nicotiana glauca* ingestion. **Hippokratia**, v. 17, n. 2, p. 183-184, 2013.

ORHAN, D. D.; OZCELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research.** v. 165, p.496-504, 2010.

PALHARES, R. M.P.; DRUMMOND, M. G.; BRASIL, B. S. A. F., COSENZA, G. P.; BRANDÃO, M. G. L.; OLIVEIRA, G. Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **Plos one.** doi: 10.1371/journal.pone.0127866, 2015.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; VON POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.19, p.140-149, 2009.

PAULA, M. T.; ZEMOLIN, A. P.; VARGAS, A P.; GOLOMBIESKI, R. M.; LORETO, E. L. S.; SAIDELLES, A. D.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; ROCHA, J. B. T.; FRNACO, J. L.; POSSER, T. Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant system in *D. melanogaster*. **Environmental Toxicology.** v. 29, no. 6, pp. 621-630, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; FULGENCIO SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International.** v. 39, n. 7, p. 791–800, 2006.

PLOCHMANN, K.; KORTE, G.; KOUTSILIERI, E.; RICHLING, E.; RIEDERER, P.; RETHWILM, A.; SCHREIER, P.; SCHELLER, C. Structure–activity relationships of Xavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 460, p.1-9, 2007.

POSSER, T.; FRANCO, J. L.; BOBROVSKAYA, L.; LEAL, R. B.; DICKSON, P. W.; DUNKLEV, P. R. Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine in PC12 cells hydroxylase. **J. Neurochem.** v. 110, p. 848-856, 2009.

RAO C. V.; OJHA, S. K.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGIS, S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer activity of *Utleria salicifolia* rhizome extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 243-249, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTHER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia.** 7e ed. Elsevier. 2012. cap. 52, p. 649-654.

RICHARDSON, J.E.; CHATROU L.W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H.J.; PIRIE, M.D. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. **Philosophical T. of the Royal Society**. v. 359, p.1495-1508, 2004.

RICHTER, M.; WINKEL, A. F.; SCHUMMER, D.; GERLITZ, M. de HOOP, M.; BRUNNER, B.; GLIEN, M.; SCHMOLL, D. Pau d'arco activates Nrf2 – dependent gene expression via the MEK/ERK-pathway. **The journal of Toxicological Sciences**. v. 39, n. 2, p. 353-361, 2014.

ROBERTS, D. M.; AARON, C. K. Management of acute pesticide poisoning organosphosphorus. **British Medical Journal**. v. 334, p. 629-634, 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciências e Agrotecnologia**. v. 25; n.1; p.102-123, 2001.

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLTZ, J. F.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 22, n 2, p. 314-317, 2006.

ROSA, E. A.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M. TANAKA, C. M. A. PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. Flavonóides e atividade antioxidante em *Palicourea rígida* Kunth, Rubiaceae. v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; DA ROSA, M. M.; RUBIN, M. A.; CHITOLINA, S. M. R.; MORSCH, V. M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal Pharmacology**. v. 610, p. 42–48, 2009.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 540-562, 2010.

SILVA, C. R.; VIEIRA, P. M.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic activity and cytotoxicity in bacteria and mice, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 84, p. 149-156, 2012.

SILVA, C. R.; VIEIRA, P. M.; CHEN-CHEN, L. Antigenotoxic and anticytotoxic activity of *Duguetia furfuracea* in bacteria and mice. **Genetics and Molecular Research**. v 12, n. 3, p. 3718- 3725, 2013.

SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; GARCEZ, W. S.; NASCIMENTO, E. A.; SIGUEIRA, J. M. Chemical Constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 18, n. 8, p. 1560-1565, 2007a.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade

citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonacea. **Química Nova**. v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007b.

SILVA, D. B., TULLI, E. C. O.; MILITÃO, G. C. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALBUQUERQUE, S.; SIGUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**. v. 16, p. 1059-1063, 2009.

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

SHINOHARA, M.; YAMADA, M. Vitamin E and Alzheimer's disease. **Brain Nerve**, v. 67, n. 12, p. 1509 – 1513, 2015.

SLOTKIN, T. A. Cholinergic systems in brain development in disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental Tabaco smoke, organophosphates. **Toxicology Applied Pharmacology**. v. 198, p. 132-151, 2004.

SUDATI, J. H.; VIEIRA, F. A. V.; PAVIN, S. S.; DIAS, G. R. M.; SEEGER, R. L.; GOLOMBIESKI, R.; ATHAYDE, M. L.; SOARES, F. A. S.; ROCHA, J. B. T.; BARBOSA, N. V. *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Neurotoxicology**. v. 37, p.118–126, 2013.

SOARES, V. C G.; VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, p. 835-838, 2006.

SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KWON, C. S.; KWON, G. S.; KANG, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morusalba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**. v. 11, 666-762, 2004.

SOTIBRÁN, A. N. C.; ORDAZ-TÉLLEZ, M. G.; RODRÍGUES-ARNAIZ, R. Flavonoids and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. v. 726, p. 60-65, 2011.

SOUSA DE SÁ, P. G.; GUIMARAES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**. v. 33, n.4, p.561-566, 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2. ed. p. 82-85. 2005.

STRONACH, B. E.; N. PERRIMON, N. Stress signaling in *Drosophila*?, **Oncogene**. v. 18, n. 45, p. 6172-6182, 1999.

- TIBBLES, L. A.; WOODGETT, J. R. The stress-activated protein kinase pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 55, p. 1230–1254, 1999.
- TINTINO, S. R.; CUNHA, R. A. B.; SANTOS, K. K. A. *et al.*, Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. Arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 11, n. 2, p. 157-162, 2013.
- TIWARI, A. K.; PRAGYA, P.; RAM, K.; RAVI.; CHOWDHURI, D. K. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. **Theriogenology**. v. 76, p. 197-216, 2011.
- TOLEDO, M. R. S.; PERES, M. T. L. P.; VIEIRA, M. C.; BAZZANO, T. S. C.; TEIXEIRA, I. R.; MORELES, L. A.; RAMOS, M. B. M.; VALERIO, P.; KITAGUTI, E. H.; OLIVEIRA, H. G. N.; PAULA SOUZA, F.; LIMA, Z. V. Fitotoxicidade do extrato aquosos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil.) B et H. em ratas (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 4, p. 218-222, 2006.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 39, p. 44–84, 2007.
- VAN ZUILEN, C. M; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, J. M. A phylogenetic analysis of *Duguetia* (Annonaceae) based on morphological data plant. **Systematics and Evolutions**. V. 194, p. 173-188, 1995.
- VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Antimicrobial Effect of *Lippia sidoides* and Thymol on *Enterococcus faecalis* Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. **The Scientific World Journal**. doi:10.1155/2014/471580, 2014.
- WANG, B.; DENG, J.; GAO, Y.; ZHU, L.; XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: a review. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1141-1151, 2011.
- WATJEM, W.; MICHELS, G.; STEFFAN, B.; NIERING, P.; CHOVOLOV, Y.; KAMPKOTTER, A.; TRAN-THI, Q. H.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. **Journal of Nutrition**, v. 135, n.3, p. 525-531, 2005.
- WIDLANSKY, M.E.; DUFFY, S. J.; HAMBURG, N. M.; GOKCE, N.; WARDEN, B. A.; WISEMAN, S.; KEANEY, J. F. JR.; FREI, B.; VITA, J.A. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. **Free Radic Biol Med**. v. 38, p. 499-506, 2005.
- WRIGHT, E. JR.; SCISM-BACON, J. L.; GLASS, L. C. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycemia. **Int. J. Clin. Prac**. v. 60, p.308–314, 2006.
- XIONG, X.; YANG, X.; LIU, W.; CHU, F.; WANG, P.; WANG, J. Trends in the Treatment of Hypertension from the Perspective of Traditional Chinese Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. doi: 10.1155/2013/275279, 2013.

ZEMOLIN, A. P. P.; CRUZ, L. C.; PAULA, M. T.; PEREIRA, B. K.; ALBUQUERQUE, M. P.; VICTORIA, F. C.; PEREIRA, A. B.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Toxicity Induced by *Prasiola crista* to Fruit Fly *Drosophila melanogaster* and Cockroach *Nauphoeta cinerea*: **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 77, p. 115-124, 2014.

ZHANG, H.; CHEN, H.; NIU, J.; WANG, Y.; XIE, L. Role of adaptive immunity in the pathogenesis of *Candida albicans* keratitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v. 50, n.6, p.2653–2659, 2009.

ZHAO, T.; QIANG, S.; MAUD, M.; MICHAEL W. Anticancer Properties of *Phyllanthus emblica* (Indian Gooseberry). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. doi:10.1155/2015/950890, 2015.

ZOU, Y; ZHENG, Z.; J. LIN, J. The interruption of the PDGF and EGF signaling pathways by curcumin stimulates gene expression of PPARgamma in rat activated hepatic stellate cell *in vitro*. **Lab. Invest.** v. 87, p. 488-498, 2007.