



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CLARISSA DE FRANÇA OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA
FRAÇÃO METANÓLICA DE *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. HOWARD**

Recife
2017

CLARISSA DE FRANÇA OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA
FRAÇÃO METANÓLICA DE *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. HOWARD**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, nível Doutorado, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof^a. Dr. Antônio Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente-
Universidade do Minho

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia; Prof^a. Dr^a. Maria das
Graças Carneiro da Cunha- Universidade Federal de Pernambuco.

Recife

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Clarissa de França Oliveira

Estudo farmacológico, toxicológico e caracterização química da fração metanólica de *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard / Clarissa de França Oliveira Silva. – 2017.

144 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio A. M. de O. S. Vicente.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Plantas da caatinga. 3. Farmacologia. I. Vicente, Antônio A. M. de O. S. (Orientador). II. Correia, Maria Tereza dos Santos (Coorientadora). III. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (Coorientadora). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 017

CLARISSA DE FRANÇA OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA
FRAÇÃO METANÓLICA DE *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. HOWARD**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração de Biotecnologia.

Aprovada em: 31 / 07 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Antônio Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente
Universidade do Minho

Prof^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
Universidade CEUMA

AGRADECIMENTOS

À vida que preenche o meu corpo e mente saudáveis, que me permitem planejar, projetar e construir.

Ao Prof. Dr. Antônio Vicente pela oportunidade, confiança e orientação durante todo período de desenvolvimento da pesquisa.

À professora Dra. Maria Tereza Correia dos Santos pela oportunidade, confiança e co-orientação- sem o seu apoio eu não conseguiria chegar ao fim.

À professora Dra. Márcia Vanusa essencialmente pelo incentivo, pelas cobranças fundamentais e pelo apoio e colaboração sem os quais o trabalho não teria sido realizado.

Aos professores Dr. Eduardo Lira pela colaboração, paciência e vontade em ajudar. Tudo foi essencial para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Maria das Graça pela colaboração e apoio para o desenvolvimento da pesquisa.

À Dra. Virgínia Lorena e professora Dra. Cristiane Moutinho pelas parcerias fundamentais e pelo apoio sem o quais este trabalho não teria acontecido.

Ao Dr. Luís Cláudio pelas colaborações e contribuições ao trabalho.

À Dra. Jaqueline e ao Msc. Jorge pelas parcerias e colaborações firmadas.

À professor Dra. Cláudia Sampaio, minha mãe científica, pelo carinho e apoio recebido a quaisquer momentos.

À professora Dra. Fernanda Ângelo e Fernanda Andrade pelas importantes contribuições ao trabalho.

Aos meus pais Lucidalva e Luiz, por sempre me estimularem a estudar, desde cedo, mesmo diante de todas as dificuldades; por mostrar a mim e a minhas irmãs que o conhecimento pode sobressair às adversidades que a vida nos impõe. O amor de vocês me nutre e me impele sempre para frente. Sou eternamente grata, pela oportunidade de tê-los como pais.

Às minhas irmãs, Indira e Mariana, com quem dividi todos os momentos dessa jornada que há muito se iniciou.

Às minhas amigas, irmãs que a vida me permitiu escolher, Raquel Alves, Patrícia, Raquel Belarmino e Renata Lima.

A Túlio Diego, Sarah Romini e Daniel Cavalcanti meus companheiros mais resistentes de todo esse período, sem os quais não haveria tanto brilho, diversão e leveza. Todo carinho a vocês, amigos.

A Humberto e Dionísio, integrantes do laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo pela persistência e pelos momentos de diversão e aprendizado em meio a tanto cansaço e preocupações. Obrigada por tornarem tudo mais leve, sem vocês nada disso teria sido levado adiante.

À Bárbara, Bruno, Camila Paiva, Talita e Daniele pelo companheirismo e colaborações que foram fundamentais para conclusão do trabalho.

A todos os integrantes dos Laboratórios Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica pela colaboração para utilização dos equipamentos e dependências dos laboratórios, mas, sobretudo pelo companheirismo sempre presente.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) pelo suporte laboratorial e pelo uso do Citômetro de Fluxo pertencente ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas – NPT-1.

Ao Centro de Tecnologia e Pesquisas do Nordeste (CETENE) pelas análises químicas realizadas.

Ao Instituto Nacional do Semiárido pelo suporte nas análises químicas realizadas.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco, pelo auxílio e colaboração ao longo desta jornada.

À Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa de Pernambuco, FACEPE, pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

“A espantosa realidade das coisas, é a minha descoberta de todos os dias - Cada coisa
é o que é.
E é difícil explicar a alguém o quanto isso me alegra, e quanto isso me basta.
Basta existir para ser completo.”

(Pessoa, 1979)

RESUMO

A espécie *Buchenavia tetraphylla* (Combretaceae), conhecida como Tanimbuca, é relatada como etnomedicinal por comunidades do semiárido brasileiro. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química da fração metanólica de *B. tetraphylla* (BtMeOH) e investigar seus potenciais biológicos através de atividades anti-inflamatórias, anti-hiperglicêmicas, antioxidantes e antimicrobianas, além de realizar estudos de toxicidade. BtMeOH foi a fração escolhida para realização dos testes por ser mais bioativa mediante screening biológico realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa. Inicialmente foi analisada a citotoxicidade de BtMeOH, a indução da liberação de óxido nítrico (NO) e a determinação das propriedades imunomodulatórias pela quantificação de citocinas TH1 e TH2 em esplenócitos murinos, por citometria de fluxo. A fração BtMeOH não foi tóxica quando utilizada abaixo de 25 µg/mL sendo 10 µg/mL a concentração definida para utilização das atividades posteriores em culturas celulares. BtMeOH inibiu a produção NO de forma significativa e ao mesmo tempo estimulou fortemente a produção das citocinas IL-6 e TNF- α principais indutores do reparo e cicatrização. Para realização das atividades *in vivo* utilizamos camundongos swiss albinos. Foi realizado previamente um estudo de toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg, que não induziu variação significativa no peso dos animais, no consumo de água e ração, nem mostrou alterações histológicas no fígado ou rim quando comparado ao controle. A mesma dose de BtMeOH foi então utilizada para realização dos testes de genotoxicidade e mutagênese *in vivo*, onde não mostrou ser genotóxica ou mutagênica. A avaliação da atividade antihiperglicemiante *in vivo* foi realizada através do teste de tolerância oral à glicose, à sucrose e ao amido em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Foi observada a redução significativa do nível de glicemia em animais diabéticos, provavelmente pela limitação da digestão de oligossacarídeos através da inibição de enzimas digestivas como as α -glucosidases e α -amilase. Além disso avaliamos o efeito de BtMeOH na glicação da albumina. A fração inibiu a formação de produtos iniciais e finais da glicação avançada (AGEs) e reduziu significativamente os níveis de frutamina. BtMeOH também manteve a característica biológica antioxidante da albumina confirmada pelo teste de antihemólise de eritrócitos humanos. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a isolados clínicos de *Escherichia coli* através do método microdiluição em caldo. Os valores de concentração mínima inibitória das frações variaram de 1250 µg/mL a 2500 µg/mL e os de concentração mínima

bactericida de 5000 a >5000 µg/mL. Nas células bacterianas tratadas com BtMeOH, foram observadas modificações externas por microscopia eletrônica de varredura, como rachaduras na superfície celular e crenação. O potencial biológico de *B. tetraphylla* pode estar associado à importantes metabólitos secundários do grupo dos polifenóis, relatados na literatura como importantes agentes antimicrobianos, antioxidantes e antidiabéticos, cuja presença foi confirmada por testes fitoquímicos com cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.

Palavras-chave: Imunomodulação. Citotoxicidade. Antimicrobiano. Toxicidade. Antihiperglicêmico.

ABSTRACT

Communities of the Brazilian semiarid report the species *Buchenavia tetraphylla* family Combretaceae, as ethnomedicinal. The aim of this work has been characterized the chemicals extracts and bioactive fractions of the *B. tetraphylla*; their biological potentials through antimicrobial, anti-inflammatory and antihyperglycaemic activities *in vivo* and *in vitro*, was surveyed; and to verify the safety of use through cytotoxicity assays, acute toxicity, genotoxicity and mutagenesis. The methanolic fraction of *B. tetraphylla* (BtMeOH) was used in bioassays due to be more bioactive. The broth microdilution method with *Escherichia coli* was used to determine the minimum inhibitory concentrations. The extracts ranged from 1250 µg / mL to 2500 µg / mL and the minimum bactericidal concentration of 5000 to > 5000 µg / mL. External modifications, cracking cell surface and cremation were observed in bacterial cells treated with BtMeOH by scanning electron microscopy. Murine splenocytes were used to BtMeOH cytotoxicity analysis, induction of nitric oxide (NO) release by stimulated for 24 hours and determination of immunomodulatory properties by the quantification of TH1 and TH2 cytokines. The BtMeOH fraction was not toxic when used below 25 µg / mL and 10 µg / mL was the defined concentration for use of the subsequent *in vitro* activities. BtMeOH inhibited NO production significantly and at the same time strongly stimulated the production of cytokines IL-6 and TNF-α major inducers of repair and healing. An acute toxicity study was performed prior to *in vivo* activities. BtMeOH did not cause significant variation in the weight of the animals, in feed and water consumption, nor in the weight of the organs, which were macroscopically preserved. The same dose of BtMeOH was then used for genotoxicity and mutagenesis tests *in vivo* that was not to be genotoxic or mutagenic. The *in vivo* anti-inflammatory potential of the fraction was observed through the model of pockets of subcutaneous air and paw edema at doses of 50, 100 and 200mg / mL, with a percentage of leukocyte inhibition of 39, 43 and 43%, respectively. *In vivo* antihyperglycemic activity evaluation was performed through three mechanisms: oral glucose tolerance test, sucrose and starch in diabetic mice, in addition to a preliminary antiglycation test *in vitro*. Significant reduction in blood glucose levels in diabetic animals was observed, probably due to the limitation of the absorption of disaccharides and polysaccharides through the inhibition of digestive enzymes such as disaccharidases and α-amylases. Inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products

(AGEs) and significant reduction of the levels of fructosamine and protein aggregation in the glycated albumin were also observed. BtMeOH was also able to maintain the antioxidant biological feature of albumin confirmed by the red blood cell antihemolysis test. The biological potential of *B. tetraphylla* may be associated with the presence of important secondary metabolites of the polyphenols group, reported in the literature as important antimicrobial, antioxidant and antidiabetic agents.

Keywords: Bioactive Compound. Toxicity. Immunomodulation. Anti-inflammatory. Antihyperglycemic.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero <i>Buchenavia</i> no território brasileiro	24
Figura 2 - Partes diversas do <i>Buchenavia tetraphylla</i> . Em 1 frutos; em 2 folhas; em 3 semente; em 4 porte arbóreo.	25
Figura 3 - Presença de eritrócitos normocromáticos (verdes) e policromáticos (vermelhos) contendo micronúcleo apontado pelas setas.	25
Figura 4 - Patogênese da cetoacidose diabética.....	30
Figura 5 - Visão geral da estrutura do receptor de insulina (IR) com suas subunidades e domínios.....	34
Figura 6 - Vias da sinalização da insulina.	35

ARTIGO I

Figura 1 - Alterações morfológicas induzidas pela fração metanólica de <i>B. tetraphylla</i> em <i>Escherichia coli</i> (linhagens B15 e UFPEDA224).....	54
Figura 2 - Efeitos de BtMeOH sobre a viabilidade de esplenócitos murinos.	55
Figura 3 - Perfil da produção da citocina TNF- α promovido por BtMeOH em culturas de esplenócitos murinos em 24 e 48 horas de incubação.....	55
Figura 4 - Perfil de produção das citocinas IL-2 e IL-6 promovido por BtMeOH em cultura de esplenócitos murinos em 24 e 48 horas de incubação.....	56

ARTIGO II

Figura 1 - Análise histológica da toxicidade do fígado 14 dias após tratamento com BtMeOH 2000mg/kg..... 71

Figura 2 - Análise histológica da Toxicidade dos rins 14 dias após o tratamento. 72

Figura 3 - Avaliação da mutagenicidade *in vivo* de BtMeOH (2000 mg/kg b.w. v.o.) através da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MPH) murinos.. 73

ARTIGO III

Figura 1 - Perfil de HPLC da fração metanólica das folhas de *B. tetraphylla*.. 89

Figura 2 - Efeito da fração BtMeOH e da floridizina na glicemia durante o teste de tolerância oral à glicose (OGTT) e na área sobre a curva (AUC) em camundongos euglicêmicos e diabéticos..... 90

Figura 3 - Efeito da fração BtMeOH e da acarbose na glicemia durante o teste de tolerância oral à sucrose (OSuTT) e na área sobre a curva (AUC) em camundongos euglicêmicos e diabéticos..... 91

Figura 4 - Atividade anti-hiperglicêmica pós-pandrial de BtMeOH no Teste de Tolerância Oral ao Amido (OSTT) e Área Sobre a Curva (AUC). 92

Figura 5 - Efeito de BtMeOH na formação de frutossamina. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. 94

Figura 6 - Efeito BtMeOH na prevenção da hemólise em eritrócitos. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão..... 95

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 - Interpretação dos valores de IDZ (mm) para as linhagens de <i>Escherichia coli</i> obtidas de isolados clínicos (CLSI, 2017).	41
Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade das linhagens obtidas de <i>E. coli</i> aos antibióticos padrão.	48
Tabela 3 - Análise fitoquímica da fração metanólica de <i>B. tetraphylla</i>	52
Tabela 4 - Perfil da atividade antimicrobiana promovida por BtMeOH.....	53

ARTIGO II

Tabela 1 - Evolução do peso corporal, consumo de ração, água e peso dos órgãos (média $\pm$ desvio padrão), dos animais tratados com a fração metanólica de <i>B. tetraphylla</i> em relação ao grupo controle.....	70
Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos do sangue dos animais tratados por via oral com BtMeOH durante 14 dias.	70
Tabela 3 - Resultados do teste do Ensaio Cometa (EC).	73
Tabela 4 - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão e índice de mutagenicidade (IM) induzida por BtMeOH na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA97, TA98 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i>	76

ARTIGO III

Tabela 1 - Percentual de inibição da formação de AGEs fluorescentes por BtMeOH... 93

Tabela 2 - Atividade antioxidante e dosagem de compostos fenólicos e flavonoides
totais..... 96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3 MÉTODO.....	37
3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	37
3.2 PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS	37
3.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS	37
3.4 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS	37
3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	38
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA.....	38
3.6.1 Viabilidade celular	38
3.6.2 Obtenção de células esplênicas de camundongos BALB/c.....	38
3.6.3 Experimento de liberação de óxido nítrico	38
3.6.4 Dosagem das citocinas liberadas nos sobrenadantes de cultura	39
3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA.....	39
3.8 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE IN VIVO.....	39
3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (OGTT)	40
3.10 ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE IN VIVO.....	40
3.10.1 Indução do diabetes em camundongos.....	40
3.10.2 Glicação in vitro da Albumina de Soro Bovino (BSA).....	40
3.10.3 Inibição de Frutosamina.....	41
3.10.4 Ensaio de proteção de eritrócitos.....	41
3.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	41
3.11.1 Ensaio de sequestro do radical dpnh (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	41
3.11.2 Ensaio de sequestro do radical abts (2,2- azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfônico).....	41
3.11.3 Ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (frap).....	42
3.11.4 Inibição do Radical Superoxido pelo método de DMSO alcalino.....	42

3.11.5 Quantificação de Fenóis Totais.....	42
3.11.6 Quantificação de flavonoides.....	42
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADOS.....	43
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E PERFIL IMUNODULADOR DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Buchenavia tetraphylla</i> (AUBL.) R.A. HOWARD.	433
4.2 ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DO POTENCIAL GENOTÓXICO, MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Buchenavia tetraphylla</i> (AUBL.) R.A. HOWARD.....	63
4.3 EFEITO ANTI-HIPERGLICEMIANTE, ANTI-GLICAÇÃO E ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Buchenavia tetraphylla</i> (AUBL.) R.A. HOWARD	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXO A- PARECER COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	114

1 INTRODUÇÃO

A vegetação do semiárido nordestino, em especial da caatinga, compreende formações vegetais altamente ameaçadas, sendo fonte ainda pouco conhecida de recursos naturais. Várias espécies medicinais da caatinga e dos brejos de altitude são amplamente utilizadas na medicina popular e na formulação de produtos fitoterápicos. No entanto, os estudos químicos e biológicos na região ainda são escassos, diante da grande diversidade apresentada.

Nesse ambiente encontram-se representantes da família Combretaceae, que compreende cerca de 500 espécies com distribuição pantropical (Loiola et al., 2009). O gênero *Buchenavia*, pertencente a tal família, abrange 25 espécies dispersas na América Central, Venezuela, Colômbia, Brasil, Peru e Bolívia (Oliveira et al., 2012).

Buchenavia tetraphylla, conhecida como Tanimbuca ou Mirindiba, é uma árvore neotropical relatada como etnomedicinal por comunidades da região semiárida e incluindo grupos indígenas. Vegeta nos solos aluviais do sertão, desenvolvendo-se em tabuleiros sólidos e pedregosos e seu profundo sistema radicular permite retirar água do subsolo para manter-se verde mesmo durante o período de estiagem. A madeira é utilizada na construção civil, como tábuas e vigas, para uso externo, como estacas e varas para porteiras e também para lenha. Seus frutos são comestíveis e procurados principalmente por animais selvagens (Fonseca; Queiroz; Venturoli, 2017).

A utilização das plantas como medicamento é uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento das enfermidades humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso por parte da sabedoria popular. Com os avanços científicos, esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (Bilau et al., 2017). Apesar dos produtos naturais serem frequentemente referenciados como mais seguros que drogas alopáticas, seus compostos podem apresentar efeitos tóxicos que incluem hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e indução de alterações no DNA, como as mutações. Portanto, nem mesmo as preparações caseiras mais simples estão isentas de efeitos indesejáveis (De Oliveira et al., 2016). Nesse sentido, investigações que contribuam para o esclarecimento dos mecanismos de ação das substâncias são fundamentais e os estudos genéticos compreendem uma importante ferramenta para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade.

Em estudo recente sobre a fitoquímica de *B. tetraphylla* verificou-se a presença de polifenóis como flavonoides e taninos, protocianidinas, leucoantocianidinas e triterpenos (Oliveira et al., 2012; Cavalcanti et al., 2017), classes de metabólitos secundários que têm recebido bastante atenção nos recentes anos devido às suas propriedades farmacológicas diversas (Mohammad; Hasan; Mohamed, 2016; Aires, 2017; Mateeva et al., 2017; Aires et al., 2017). Diversos trabalhos têm se empenhado em identificar compostos de origem natural com propriedades antioxidantes e anti-hiperglicemiantes, e os polifenóis estão frequentemente associados a esses efeitos (Dawé et al., 2016; Viau et al., 2016).

Os metabólitos antioxidantes previnem ou inibem a formação de espécies reativas de oxigênio, atenuando o estresse oxidativo característico de algumas doenças como o diabetes mellitus (DM). O DM é um termo utilizado para designar um conjunto de desordens metabólicas provenientes de alterações na secreção ou ação da insulina, podendo levar a um quadro de hiperglicemia crônica (Ahmadieh; Ghazal; Azar, 2017). Essa condição intensifica a auto-oxidação da glicose, a fosforilação oxidativa e a formação de produtos finais de glicação avançada (AGES), aumentando a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Os compostos antioxidantes desempenham um importante papel no tratamento do DM, pois podem aumentar a produção de insulina pelas células β pancreáticas, atenuar a resistência à insulina e melhorar a captação de glicose intestinal (Moukette et al., 2017; Rasouli et al., 2017). Outras atividades têm sido relacionadas aos compostos antioxidantes, como anti-inflamatória e antimicrobiana (Sahin et al., 2017).

A ação antimicrobiana de *B. tetraphylla* foi analisada frente a microrganismos de importância patogênica. Nesses estudos os extratos orgânicos das folhas de *B. tetraphylla* apresentaram atividade antifúngica frente a isolados clínicos de *Candida albicans* e bactérias gram-negativas e gram-positivas (Oliveira et al., 2012; Cavalcanti et al., 2017).

No Nordeste brasileiro, a *Buchenavia tetraphylla* é tradicionalmente utilizada como expectorante, antitussígeno, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza (Agra, 2007). Há, porém, poucas informações científicas a respeito da eficácia e segurança de uso. Dessa forma, é importante e de alta relevância a avaliação química e biológica de seus constituintes, de forma que os resultados possam contribuir com seu arsenal terapêutico. Adicionalmente, os dados deste estudo poderão contribuir como uma alternativa terapêutica eficiente e de baixo custo à população.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial farmacológico, a toxicidade e caracterizar quimicamente os a fração metanólica de *Buchenavia tetraphylla*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Obter a fração metanólica de *B. tetraphylla* (BtMeOH) através de uma série eluotrópica (por gradiente de polaridade de solventes);
- b) Realizar o *screening* fitoquímico da fração metanólica através de Cromatografia em Camada Delgada;
- c) Identificar por meio de padrões os compostos majoritários de BtMeOH através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massa (LC-MS);
- d) Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da fração metanólica através dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- e) Realizar estudos de toxicidade aguda, genotoxicidade e mutagênese;
- f) Avaliar o potencial anti-hiperglicemiante, anti-glicação e antioxidante *in vitro* de BtMeOH;
- g) Avaliar a citotoxicidade, a produção de óxido nítrico (NO) e a imunomodulação de BtMeOH em esplenócitos de camundongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como alimento, vestimenta, habitação, utilizações domésticas, no emprego de terapias e são importantes fontes de substâncias naturais biologicamente ativas (Awad; Awaad, 2017). Um vegetal é considerado medicinal quando possui metabólitos com propriedades químicas associadas a algum tipo de ação farmacológica (Gnoato; Schenkel; Bassani 2005). As substâncias ativas presentes nestas plantas medicinais são produtos do seu metabolismo, os quais podem ser reunidos em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos, e os metabólitos secundários, resultantes da biossíntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcalóides, saponinas, entre outros. (Dourado, 2006; Kumar et al., 2015; Serna; Martinez, 2015).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (Awad; Awaad, 2017). Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial usa ou já usou recursos das plantas medicinais populares para suprir necessidades de assistência médica privada, estimando-se que a venda neste setor cresce cerca de 10% ao ano (Ministério da Saúde, 2006). Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo em grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Em todo território brasileiro e em especial na região nordeste, o uso de preparações caseiras naturais assumem fundamental importância no tratamento de patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (Matos, 2009).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (Bruning et al., 2012). Dessa forma a população mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações que foram sendo acumuladas durante séculos. Essa cultura, entretanto,

precisa estar alicerçada na experiência e no conhecimento científico comprovado (Figueredo; Gurgel; Gurgel Júnior, 2014; Gnoatto et al., 2005). Em maio de 2006, o Ministério da Saúde normalizou por meio da Portaria 971 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que uma das principais medidas inseridas é a proposta para plantas medicinais e fitoterapia, podendo as unidades do SUS implementar o seu uso (Figueredo; Gurgel; Gurgel Júnior, 2014).

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura, dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica - escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética - seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (Verdam; Silva, 2012). As probabilidades de novas descobertas de substâncias inéditas, bioativas ou não, é sem dúvida, maior na seleção randômica. A seleção etnofarmacológica, no entanto, favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas. Nesta abordagem as plantas medicinais são consideradas não apenas como simples matéria prima. A descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico de determinado grupo étnico, se traduz na economia de tempo e dinheiro, constituindo uma importante ferramenta de pré-triagem (Albuquerque; Hanazaki, 2006).

2.1.1 Metabolismo secundário e fitoquímica

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila. Por sua vez, os metabólitos secundários são compostos de estrutura relativamente complexa, produzidos em baixas concentrações e que cumprem funções específicas em cada ser vivo (Silva; Lima, 2016).

A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses

vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Shakya et al., 2017). Fatores ambientais como temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de água influencia diretamente as vias bioquímicas ligadas à produção de metabólitos secundários (Namdeo, 2007).

Segundo Gottlieb (1996), os metabólitos secundários tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais, que se consagraram como princípios ativos eficazes, até hoje empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo da morfina, quinina e cânfora.

Os estudos fitoquímicos podem ser desenvolvidos, de modo geral, em etapas como escolha da planta a ser estudada, identificação botânica, prospecção preliminar de sua composição química, isolamento e a purificação dos constituintes principais e determinação da estrutura molecular dos isolados. Esse tipo de investigação pode indicar os grupos de metabólitos de interesse farmacológico, favorecendo dessa forma o uso sustentável da planta, contribuindo para sua preservação (Matos, 2009).

2.2 FAMÍLIA COMBRETACEAE

Combretaceae é uma família pertencente à ordem Myrtales (Robert Brown), composta por ervas, arbustos, arbustos escandentes, árvores ou lianas, raramente espinhosas (Loiola, 2009). Possui folhas alternas, opostas, espiraladas ou verticiladas, simples e inteiras, sem estípulas, com ou sem tricomas. Apresenta distribuição pantropical, incluindo cerca de 20 gêneros e mais de 500 espécies, encontradas principalmente nas regiões da África e da Ásia, além da América neotropical e Austrália (Von Linsingen, 2009; Fanton; Ricardi-Branco; Silva, 2012). A importância econômica das Combretaceae concentra-se em espécies que apresentam propriedades medicinais, sobretudo aquelas utilizadas na medicina tradicional por tribos e comunidades asiáticas. As plantas do gênero *Terminalia* por exemplo, são bastante empregadas no tratamento de desordens gástricas (Silva et al., 2015; Ali-Khan; Nazan; Mat Jais, 2017), doenças cardiovasculares (Kapoor, 2014), diabetes (Lee et al., 2017),

como antiparasitárias, antimicrobianas (Wazir, 2014; Acharyya, 2015) e anti-inflamatórias (Zhong, 2014). As sementes oleaginosas dos frutos de espécies como *Terminalia catappa* (Castanhola) são amplamente utilizadas como alimentos, possuindo elevado teor nutricional e tecnológico (Souza, 2016). Poucos representantes de Combretaceae são utilizados na ornamentação como *Quisqualis indica* L. e *Terminalia catappa* (Loiola, 2009).

No Brasil Combretaceae está representada por 5 gêneros (Buchenavia, Combretum, Conocarpus, Laguncularia e Terminalia) e 62 espécies das quais 13 são endêmicas, ocorrendo em quase todas as formações vegetais, incluindo caatinga, cerrado, mangue e savana amazônia (Von Linsingen, 2009; Marquete; Loiola, 2015).

2.2.1 Gênero Buchenavia

O gênero Buchenavia compreende 25 espécies, distribuídas desde a América Central até a Venezuela, Colômbia, Guianas, Brasil, Peru e Bolívia. No Brasil está amplamente distribuído, mas seus representantes são encontrados principalmente na região amazônica, com cerca de 20 espécies diferentes. O gênero é caracterizado por porte arbustivo ou arbóreo, folhas simples e alternas, flores sem pétalas, com frutos do tipo drupa e arredondados (Marquete; Loiola, 2015). Apesar de poucos estudos acerca das características químicas do grupo, estudos indicam que espécies deste gênero possuem metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos. A presença desses compostos tem sido associada a atividades biológicas importantes dentro do gênero, como antibacteriana, antifúngica e anti-HIV (Lopes e Maruo, 2014; Teodoro, 2015; Cavalcanti 2017).

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero *Buchenavia* no território brasileiro (Marquete; Loiola, 2015).



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6892>

2.2.2 *Buchenavia tetraphylla*

A *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R.A. HOWARD, conhecida como Tanimbuca ou Mirindiba, é uma árvore de porte muito variável (de 5 a 12 metros de altura) pertencente à família Combretaceae. Possui distribuição neotropical e no Brasil ocorre naturalmente no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, desenvolvendo-se na Caatinga, no Cerrado e em florestas semi-decíduais (Marquete; Loiola, 2015). Suas folhas são simples, coriáceas, contendo pelos sobre as nervuras. A madeira é utilizada na construção civil, como tábuas e vigas, para uso externo, como estacas e varas para porteiras e também para lenha. Seus frutos são comestíveis e procurados principalmente por animais selvagens (Fonseca; Queiroz; Venturoli, 2017). É relatada como etnomedicinal por comunidades da região semiárida e incluindo grupos indígenas (Agra; Freitas; Barbosa-Filho, 2007; Agra et al., 2008; Oliveira et al., 2012). Popularmente essa planta é utilizada como expectorante, antitussígeno, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza (Agra et al., 2007).

Em estudos sobre a fitoquímica de *B. tetraphylla*, verificou-se a presença de flavonoides, protoantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos e tanino gálico (Oliveira et al., 2012), classes de metabólitos secundários que têm recebido bastante atenção nos recentes anos devido às suas propriedades farmacológicas diversas, incluindo efeitos citotóxicos, antioxidantes, quimioproliféricos contra o câncer entre outros (Mohammad; Hasan; Mohamed, 2016; Aires, 2017). Recentemente tem sido demonstrado que a espécie apresenta propriedades frente a microrganismos de

natureza patogênica como linhagens resistentes de *Candida* spp (Teodoro, 2015; Cavalcanti, 2017), *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* entre outros (Oliveira, 2012).

Figura 2 - Partes diversas do *Buchenavia tetraphylla*. Em 1 frutos; em 2 folhas; em 3 semente; em 4 porte arbóreo.



Fonte: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Buchenavia+tetraphylla>

2.3 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE DE PLANTAS MEDICINAIS

Diariamente nos deparamos com substâncias que podem alterar o nosso organismo a nível celular. Os danos celulares podem ser ocasionados por agentes químicos, físicos ou biológicos, que ao interagir com o material genético, afetam o ciclo celular e levam a alterações cromossômicas, sendo por isso chamados de genotóxicos.

As mutações são alterações que podem atingir a sequência de nucleotídeos do DNA (mutações gênicas) ou no número e estruturas dos cromossomos (mutações cromossômicas). Apesar de serem um importante fator para a variabilidade genética em diversos organismos, as mutações podem ser prejudiciais, sobretudo em organismos multicelulares. Os agentes mutagênicos são aqueles capazes de aumentar o número de mutações em um organismo (Silva et al., 2011).

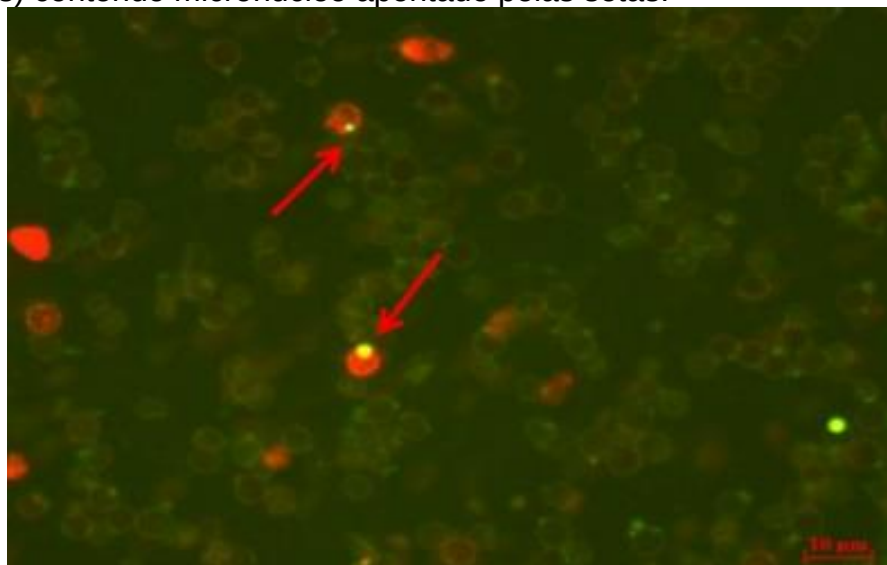
Vários marcadores são utilizados para avaliar a segurança e eficácia de produtos naturais, pois apesar do largo uso pela população, muitos de seus compostos podem

ser potencialmente tóxicos, genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (Bhagat, 2017). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) recomenda testes *in vitro* em *Salmonella typhimurium* para detecção de mutações nos sítios de guanina-citocina (G-C) como as cepas TA1535, TA97, TA98 e TA100. Para a detecção de mudanças nos sítios de adenina-timina (A-T) deve-se utilizar a cepa TA102 ou *Escherichia coli* WP2 uvrA. A ANVISA também recomenda testes de genotoxicidade em roedores para detecção de danos cromossômicos em células hematopoiéticas *in vivo*, como o teste do micronúcleo e o ensaio cometa (ANVISA, 2013).

O teste cometa consiste em uma avaliação de genotoxicidade com a finalidade de detectar quebras de fita simples ou duplas no DNA. No ensaio, células presentes em lâminas são submetidas a uma solução de lise, e indução da desespiralização do DNA. As membranas celulares são rompidas e as proteínas do núcleo liberadas no meio, restando apenas o nucleóide na lâmina. Através de eletroforese em gel, o DNA do nucleóide migra de acordo com seu tamanho, sendo que os fragmentos menores migram mais rapidamente, formando um arraste possível de ser visualizado no microscópio como uma “cauda de cometa”. O material é então analisado quanto ao comprimento e quantidade do material genético presente na cauda. A quantidade e tamanho dos fragmentos de DNA, é diretamente proporcional ao dano. O teste do cometa pode ser realizado em células em proliferação ou não e é considerado simples, eficaz e confiável e tem sido amplamente utilizado para detecção inicial de agentes carcinogênicos via mecanismo mutagênico (Haase et al., 2017; Bhagat, 2017; Zhanataev et al., 2017).

O teste do micronúcleo (MN) consiste em detectar pequenos núcleos acessórios presentes no citoplasma das células em divisão celular, contendo fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que durante a divisão celular não foram incluídos no núcleo. Os agentes mutagênicos podem induzir a quebras cromossômicas (clastogênese) ou perda de cromossomos (aneugênese), e caso essas alterações não forem reparáveis, se transformam em mutações. São comumente utilizados neste ensaio eritroblastos (eritrócitos imaturos, ou policromáticos) que ao se maturarem expõem o núcleo principal, entretanto, os micronúcleos permanecem, podendo ser facilmente detectados (Haase et al., 2017; Gouveia et al., 2017). A combinação dos testes de Ames e MN tem sido efetivos na detecção de agentes genotóxicos carcinogênicos (Bhagat, 2017; Matsumoto et al., 2017).

Figura 3 - Presença de eritrócitos normocromáticos (verdes) e policromáticos (vermelhos) contendo micronúcleo apontado pelas setas.



Fonte: O autor (2017).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS

Desde a antiguidade as plantas são empregadas na cura de doenças inclusive para o tratamento de infecções microbianas. Ao longo dos últimos anos cresceu o interesse sobre compostos obtidos de plantas sobretudo aqueles que são ativos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas multirresistentes (Barbieri et al., 2017). A resistência antimicrobiana é a capacidade de os microrganismos crescerem mesmo quando expostos a antibióticos ou antifúngicos. Os microrganismos podem exibir resistência natural ou adquirida, através de elementos genéticos móveis, sendo que o uso irracional de medicamentos antifúngicos e antibacterianos acelerou o surgimento de cepas resistentes (Anyanwu; Okoye, 2017). Este tem sido um dos maiores entraves para a saúde a nível mundial, e além disto, representa um importante problema econômico devido ao aumento de custo com o tratamento dessas infecções. Segundo o relatório realizado pelo economista Jim O'Neill, até 2050 o custo financeiro para o combate de microrganismos multirresistentes pode chegar a 100 trilhões de dólares caso o problema não seja contornado (O'Neill, 2017).

Além da eficiência reduzida dos antibióticos e outros antimicrobianos, alguns desses agentes também podem apresentar efeitos indesejáveis aos pacientes, devido à sua toxicidade. Diante desta crise, é emergencial a busca por fármacos seguros, estáveis, padronizados e eficientes. Nesse sentido, os compostos extraídos de plantas,

cuja diversidade molecular é ampla, podem servir como modelos apropriados para a produção de medicamentos efetivos e mais específicos contra bactérias, fungos, helmintos, protozoários ou vírus (Anyanwu; Okoye, 2017; Barbieri et al., 2017). Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de comprovar e determinar a ampla variedade das atividades antimicrobianas de compostos bioativos isolados de plantas ou de extratos vegetais onde esses metabólitos podem apresentar efeito sinérgico (Cools et al., 2017; Marchese et al., 2017; Sakkas; Papadopoulou, 2016; Slobodníková et al, 2016).

2.5 SISTEMA IMUNOLÓGICO E INFLAMAÇÃO

O Sistema Imunológico (SI) é constituído por um conjunto de órgãos, tecidos, células e moléculas responsáveis pela defesa do organismo e reparo tecidual. A resposta imune pode ser classificada em imunidade inata ou natural e adaptativa ou adquirida.

O sistema imune inato representa a defesa presente em indivíduos saudáveis desde o nascimento. Inclui barreiras anatômicas físicas e químicas da pele e mucosas, secreções (lágrima, saliva), enzimas, substâncias de defesa secretadas (como proteínas do Sistema Complemento), células mononucleares (monócitos/macrófagos), granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e linfócitos NK (Natural Killer). A resposta inflamatória, a liberação de mediadores e o processo de fagocitose realizado principalmente por macrófagos e neutrófilos, são importantes mecanismos desse sistema de defesa. Os macrófagos podem ser ativados e atraídos ao local da injúria pelos próprios agentes infectantes ou pela ação de citocinas liberadas por linfócitos T no local da infecção, como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α e quimiocinas (Abbas; Lichtman, 2017).

Diferentemente da inata, a imunidade adaptativa se desenvolve apenas após a exposição ao agente infeccioso e é altamente específica, sendo capaz de reagir de maneira mais rápida e eficaz em um segundo, terceiro ou quarto contato, propriedade conhecida como “memória imunológica”. A resposta imune adaptativa pode ser dividida em duas categorias: humoral e celular. Pertencem à imunidade humoral os anticorpos produzidos e secretados pelas células B, que ao serem ativadas, se transformam em plasmócitos. Os anticorpos, moléculas efetoras da imunidade humoral, são imunoglobulinas que estão distribuídas em cinco classes- IgA, IgD, IgE, IgG e IgM- que

se ligam aos antígenos formando complexos imunes. Esses complexos agem facilitando a fagocitose e ativando mecanismos de citotoxicidade por macrófagos, neutrófilos, sistema complemento e células NK. A imunidade celular compreende mecanismos que envolvem a ativação dos linfócitos T imaturos, que se proliferam e se diferenciam em células T efetoras expressando receptores CD4 ou CD8, e migram para os locais de infecção. Esse processo é essencial devido ao recrutamento de outros componentes do s.i. para o local da infecção. Os linfócitos T CD4+ auxiliares secretam citocinas que ativam e atraem leucócitos para fagocitar e destruir microrganismos patogênicos. Dependendo do tipo de citocina produzida, os linfócitos auxiliares podem se diferenciar funcionalmente em dois subgrupos principais: Th1 e Th2. Em determinadas condições um subgrupo pode ser convertido em outro, havendo certa plasticidade entre eles. Já os linfócitos T CD8+ citotóxicos induzem à morte de células infectadas com proteínas microbianas intracelulares, eliminando reservatórios de infecção (Abbas; Lichtman, 2017).

2.5.1 Citocinas

Citocinas são glicoproteínas hidrossolúveis produzidas por diversos tipos de células do sistema imunológico, que conduzem a resposta inflamatória aos locais infecção ou lesão. Além disso estão envolvidas em quase todos os processos biológicos como proliferação e diferenciação celular, fibrose, migração, reparação e angiogênese. Possuem secreção autolimitante com efeito parácrino, autócrino ou endócrino, podem ser pleiotrópicas agindo em diferentes tipos de células e redundantes funcionalmente, de modo que diferentes tipos de mediadores possuem ações semelhantes. Várias células podem sintetizar citocinas, após estímulos diversos como toxinas, lesões ou mediadores químicos. Os macrófagos, entretanto, são os principais produtores de interleucinas (IL) pró-inflamatórias como as IL-1, IL-6, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (INF- γ). Já as interleucinas 4, 10, 13 e o TGF- β (fator transformador de crescimento-Beta) são consideradas anti-inflamatórias, pois inibem respostas do s.i (Oliveira et al., 2011; Liu et al., 2017).

2.5.2 Compostos imunomoduladores naturais

As células do sistema imuno-inflamatório são responsáveis por estimular ou coibir as respostas imunes, desempenhando um papel de regulação na fisiopatologia

de doenças importantes através da síntese de substâncias imunomoduladoras (Pandey et al., 2016). Com a descoberta do papel dessas substâncias reguladoras, tornou-se possível a manipulação do sistema imune a fim de potencializar o efeito terapêutico de fármacos em doenças associadas à inflamação crônica (CID), atraindo assim a atenção de várias pesquisas (Ridker; Luscher, 2014). Nesse sentido, agentes anti-inflamatórios são amplamente utilizados no tratamento de tais enfermidades, exercendo, entretanto, danos graves ao s.i. de indivíduos submetidos ao tratamento com alguns desses fármacos. O uso de extratos vegetais e metabólitos secundários com ação anti-inflamatória e imunomoduladora podem representar adjuvantes ideais no tratamento de doenças importantes. Assim, trabalhos recentes têm sugerido que muitas plantas ou outros produtos de origem natural podem ativar o s.i. estimulando a liberação de citocinas, a proliferação de células mononucleares, o aumento do processo de fagocitose e a liberação de NO por macrófagos. Em contrapartida, esses compostos também podem agir como imunossupressores, sendo então utilizados para o tratamento de artrite reumatoide, doenças auto-imunes e outras doenças infecciosas ou inflamatórias (Pandey et al, 2016; Choi et al, 2017; De Siqueira Patriota et al., 2017; Putri et al, 2017; Sadowska et al., 2017).

2.6 DIABETES

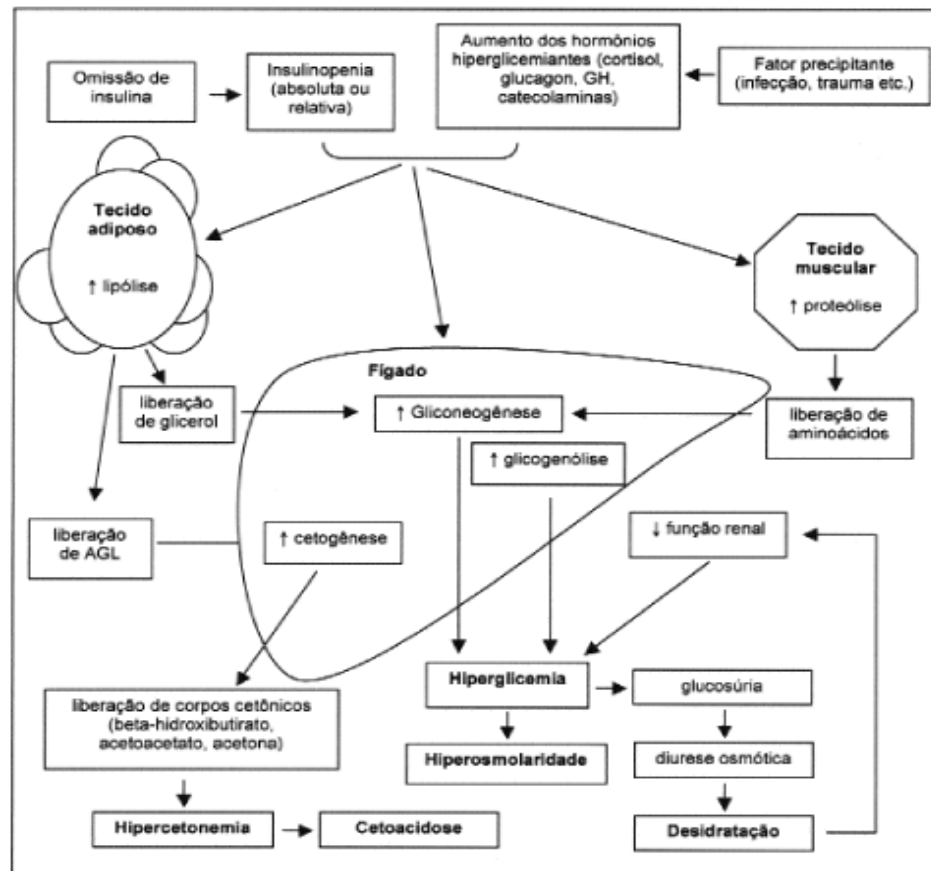
Diabetes *mellitus* (DM) é termo utilizado para designar um conjunto de desordens metabólicas provenientes de alterações na secreção ou ação da insulina, o que leva a alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (Ahmadiéh; Ghazal; Azar 2017). O diabetes foi mencionado pela primeira vez em 1.500 anos a.C. pelos egípcios ao observarem a incontinência urinária. Posteriormente os indianos descreveram a doença e a classificaram como “urina de mel” devido à urina adocicada que atraía formigas e abelhas.

Apesar do diabetes ser descrito desde a antiguidade, foi apenas no início do século XX com a descoberta e manipulação da insulina pelos canadenses Frederick Banting e Charles Bestthe que a patogênese da doença foi compreendida. A insulina foi utilizada pela primeira vez em 1922 e essa terapia espalhou-se pelo mundo salvando milhares de vidas (Menon; Rajesh; Balakrishnan, 2015; Prasad et al., 2016). Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA) o DM pode ser dividido em quatro principais grupos: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (SBD, 2016).

O DM1 é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina, presentes nas ilhotas de Langerhans, levando à dependência de insulina exógena nos pacientes. Em geral é ocasionada por processo autoimune relacionado com uma predisposição genética e fatores ambientais (Kaneko et al., 2017). Os principais genes envolvidos estão relacionados ao HLC (antígeno leucocitário humano) classe II e dentre os elementos ambientais estão infecções virais e deficiência de alguns nutrientes, a exemplo da vitamina D, em indivíduos geneticamente predispostos. As reações autoimunes são desencadeadas principalmente por células T auto-reativas e células B envolvidas na produção de auto-anticorpos anti-insulina (IAA), anti-ilhota pancreática (ICA), além de anticorpos contra ácido glutâmico descarboxilase 65 (GAD65), antitransportador de zinco 8 (Anti-ZnT8) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A (Hinman, 2014; Lamy; Sault; Renard, 2016). A taxa de destruição das células beta pode variar nos indivíduos, sendo mais rápida nas crianças e lenta e progressiva nos adultos, sendo referida nesses últimos como diabetes autoimune latente do adulto (LADA) (SDB, 2015-2016).

O excesso de glicose no sangue leva à utilização de gordura como fonte alternativa de energia e consequente degradação excessiva das reservas adiposas e de proteínas, especialmente no tecido muscular. O aumento da concentração de aminoácidos e ácidos graxos livres, aumentando a concentração de corpos cetônicos. O excesso de glicose e de corpos cetônicos são excretados pela urina juntamente com grandes quantidades de água e íons importantes como sódio e potássio. A cetoacidose diabética, típica do DM1, pode levar a quadros mais graves como coma e morte, caso esta condição não seja revertida (Figura 4) (Barone et al., 2007; Ahmadiéh; Grazal; Azar, 2016).

Figura 4 - Patogênese da cetoacidose diabética.



Fonte: Barone et al. (2007).

O DM2 é inicialmente assintomático e ocorre quando concentrações normais do hormônio insulina não conseguem produzir respostas adequadas em tecidos como muscular e adiposo. Essa redução na sensibilidade dos tecidos é conhecida como resistência à insulina. Os portadores de DM2 podem fazer o uso de insulina, mas não são insulino-dependentes (Wu et al., 2014). Defeitos na ação da insulina decorrem principalmente da redução no número de receptores para insulina, de proteínas transportadoras de glicose ou alterações na translocação desta do citoplasma para a membrana (Machado; Schaam; Seraphim, 2006; Boucher; Kleinridders; Kahn, 2014.)

Vários são os fatores que podem desencadear o DM2, mas este tem sido frequentemente associado à obesidade. Além de fatores genéticos, mudanças nos hábitos sociais, comportamentais e dietéticos dos indivíduos tem contribuído para o surgimento de um atual problema de saúde pública global. Sendo assim, mudanças no estilo de vida, controle da dieta e a prática de exercícios físicos se tornaram práticas importantes e simples para a prevenção desta doença. Ainda nesse sentido, outros elementos vêm sendo recentemente associados à maior predisposição ao DM2 como

a má qualidade do sono (Dutil; Chaputil, 2017) o aumento da exposição à inseticidas organoclorados e organofosforados através do uso de inseticidas e consumo de alimentos contaminados (Xiao; Clark; Park, 2017; Tengholm; Gylfe, 2017).

2.6.1 O hormônio insulina e suas ações metabólicas

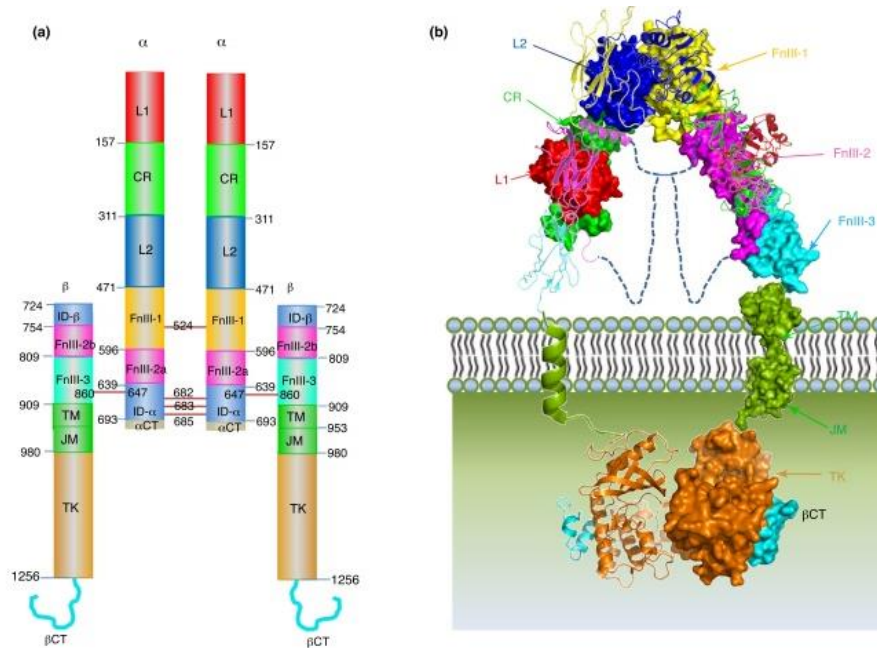
A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans presentes na porção endócrina do pâncreas. É primeiramente sintetizada na forma inativa, a pré-pró-insulina, que ao seguir para o retículo endoplasmático, perde a porção pré e se transforma na molécula precursora, a pró-insulina. A pró-insulina, formada por duas subunidades A e B ligadas a um peptídeo C, segue para o complexo de Golgi onde é clivada para liberação do peptídeo C e formação da molécula final de insulina, com as duas cadeiras A e B ligadas entre si por pontes dissulfeto (Sugawara; Kano; Murata et al., 2014).

Essa substância desempenha um papel metabólico essencial, diminuindo a concentração de glicose sanguínea em resposta à hiperglicemia. Em contrapartida, quando os níveis glicêmicos diminuem drasticamente em jejuns prolongados ou entre as refeições, as células α das ilhotas secretam glucagon, responsável pelo aumento da concentração da glicose (Tengholm; Gylfe, 2017). A insulina é o principal responsável pela captação, utilização e armazenamento dos nutrientes fornecedores de energia, além disso aumenta os níveis de glicose-6-fosfato a partir da fosforilação da glicose, que é convertida em glicogênio no processo de glicogênese (Tanigush, 2016). Consequentemente esse importante hormônio afeta o metabolismo dos tecidos adiposo e muscular, onde promove a síntese de glicogênio e triglicerídeos e inibe a sua degradação. A insulina atua também no tecido hepático inibindo a gliconeogênese, a glicogenólise e a cetogênese (Taniguchi, 2016; Gutiérrez-Rodelo; Roura-Guiberna; Olivares-Reyes, 2017).

A sinalização da insulina envolve a interação com um receptor de membrana específico (IR). O IR é um heterotetrâmero de 350 KDa composto de duas subunidades α localizadas na porção extracelular da membrana plasmática com os sítios de ligação para insulina e duas subunidades β transmembrana onde está localizado o domínio tirosina quinase (TK) (Figura 5). O início da sinalização é marcado pela ligação da insulina à porção α do IR, que induz a mudanças conformacionais e à autofosforilação de resíduos de tirosina presentes na subunidade β . O receptor então fosforila diferentes

proteínas citosólicas, principalmente aquelas que são membros da família substrato do receptor de insulina (IRS) (Lee et al., 2017; Ye et al., 2017).

Figura 5 - Visão geral da estrutura do receptor de insulina (IR) com suas subunidades e domínios.

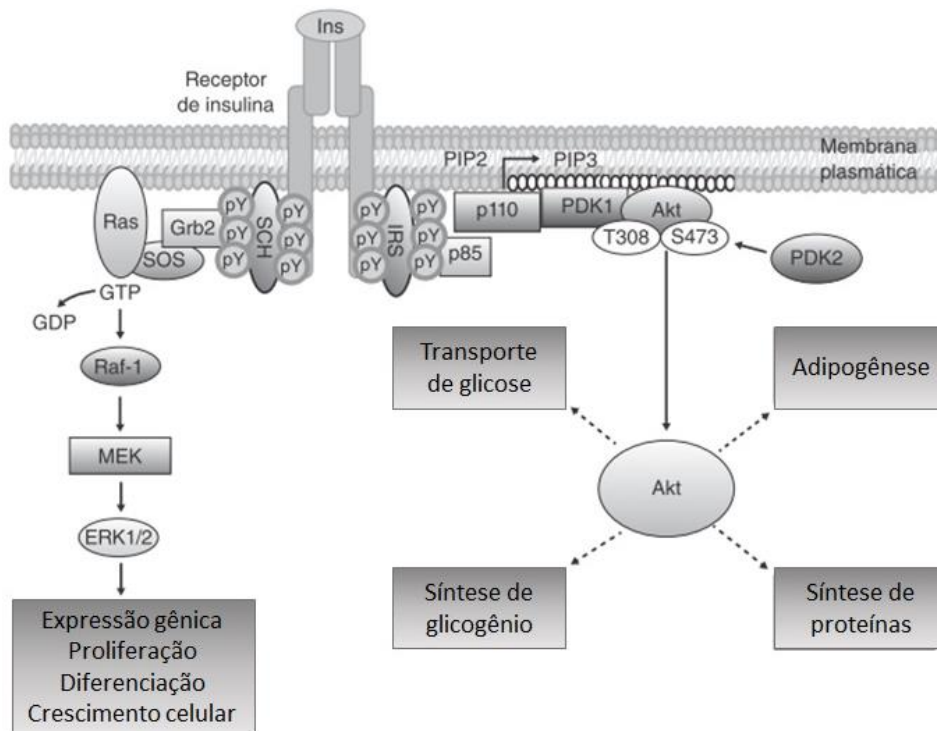


Fonte: Adaptado de Ye (2017). Em A diagrama esquemático da organização do dímero de IR completo. Em B representação do desenho da estrutura dimérica do IR.

As ações da insulina ocorrem por duas principais vias de ativação: a do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/Akt) e a via das quinases ativadas por mitógenos (MAPK/Ras). A via PI3K/Akt parece ser a principal responsável pela maioria das ações metabólicas da insulina, estando envolvida na incorporação da glicose no tecido adiposo e muscular e na síntese de glicogênio (Gutierrez-Rodelo, 2017) (Figura 6).

Akt é uma família de proteínas (Akt 1, Akt2, Akt3) que são fosforiladas pela PI3K, resultando no aumento da translocação de vesículas contendo transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana plasmática para aumentar a captação de glicose na célula. Por outro lado, a via MAPK/Ras está associada aos efeitos da insulina como fator de crescimento, promovendo crescimento, proliferação e diferenciação celular (Luchs, 2006; Gutiérrez-Rodelo; Roura-Guiberna; Olivares-Reyes, 2017; Ye, 2017).

Figura 6 - Vias da sinalização da insulina.



Fonte: Adaptado de Gutiérrez-Rodelo; Roura-Guiberna; Olivares-Reyes (2017).

2.6.2 Estresse oxidativo e diabetes

A ausência de insulina impede que a glicose seja captada normalmente pelos tecidos, podendo levar a um quadro de hiperglicemia crônica. Essa condição promove o aumento da auto-oxidação da glicose, fosforilação oxidativa, peroxidação lipídica e formação de produtos finais de glicação avançada, induzindo à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). O quadro de estresse oxidativo pode causar lesões teciduais superando a defesa antioxidante endógena, contribuindo para a progressão da doença, tanto no DM tipo 1 como no tipo 2 (Justino et al., 2017).

Nos últimos anos, pesquisas tem sugerido que espécies reativas de oxigênio geradas pelas mitocôndrias tem um papel importante no desenvolvimento do DM tipo 2. A redução na oxidação de substratos como lipídeos e carboidratos poderia levar ao acúmulo de elétrons através da cadeia transportadora, aumentando a formação de ânions superóxido. A formação de EROs provoca danos no DNA mitocondrial, agregação de proteínas e peroxidação lipídica, que podem induzir à mitofagia e apoptose, reduzindo o número de mitocôndrias. Além disso, o acúmulo de EROS afeta a secreção de insulina pelas células β pancreáticas e a sensibilidade deste hormônio nos tecidos. O aumento da atividade do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato (NADPH) também está relacionado a resistência à insulina e contribui com a produção de EROS (Gutiérrez-Rodelo; Roura-Guiberna; Olivares-Reyes, 2017).

2.6.3 Compostos naturais com atividade anti-hiperglicemiante e antioxidante

Muitas espécies de plantas representam a base da medicina tradicional em todo mundo e são amplamente utilizadas de forma empírica para tratar algum sintoma do diabetes mellitus, entretanto um pequeno percentual dessas plantas tem sido estudado (Parra-Naranjo et al., 2017). Nesse sentido, pesquisas recentes têm se empenhado em identificar compostos de origem natural, como os presentes em plantas medicinais, sobretudo aqueles classificados como antioxidantes.

Compostos antioxidantes são agentes que podem doar átomos de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, prevenindo ou inibindo a formação de espécies reativas, atenuando o estresse oxidativo (Moukette et al., 2017). Essas substâncias podem ser divididas em dois sistemas, o enzimático, que compreende enzimas endógenas como a superóxido redutase (SOD) e catalase (CAT) e o não enzimático, fazendo parte deste grupo as vitaminas, os flavonóides, licopeno e bilirrubina (De Vasconcelos et al., 2014).

Os polifenóis são uma classe de metabólitos secundários que podem ser divididos em 3 grupos principais, o dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Esses compostos podem encontrados em legumes, frutas e sementes e sua utilização pode estar associada à prevenção do estresse oxidativo, proteção do DNA e aumento do sistema de defesa natural. Esses metabólitos também têm sido relacionados ao aumento da produção de insulina pelas células β pancreáticas, atenuação da resistência à insulina e aumento da captação de glicose (Moukette et al., 2017; Rasouli et al., 2017). Tafesse e colaboradores (2017) verificaram que o extrato aquoso de *Ajuga remota* reduziram drasticamente os níveis de glicose em animais diabéticos induzidos por aloxana, provavelmente devido à presença de flavonoides detectados nas análises fitoquímicas. Outro mecanismo de ação dos polifenóis para redução dos níveis de glicemia é através da inibição de enzimas digestivas como α -amilases e α -glucosidases, que são responsáveis pela quebra de oligossacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos, retardando assim a absorção de glicose (Bati; Kwape; Chaturvedi, 2017; Rasouli et al., 2017).

3 MÉTODO

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O material botânico será coletado no Estado de Pernambuco e depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Os extratos serão preparados em um extrator soxhlet, utilizando os solventes ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Após a realização do fracionamento, a fração metanólica (BtMeOH) foi armazenada em freezer a 4°C para posterior utilização.

3.2 PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS

Para a análise fitoquímica os extratos serão ressuspensos em metanol para uma concentração final de 20mg/ml. Utilizando-se placas de poliamida (11 F254-merck), alíquotas de 10µL serão submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) para análise dos aspectos de compostos de metabólitos secundários, empregando diferentes fases móveis e reveladores específicos. Os testes de afrogenicidade, para confirmação da presença de saponinas, serão realizados em tubos de ensaio.

3.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS

Esta etapa será realizada através de cromatografia em coluna (pressão normal, a média pressão e a alta pressão). A pureza das substâncias isoladas será acompanhada através de cromatografia em camada delgada analítica e, quando necessário, cromatografias em fase gasosa e líquida de alta pressão analítica.

3.4 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS

A identificação química dos compostos isolados será realizada por meio da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN serão registrados em espectrômetro Brucker DPX 500 MHz, operando em 500

MHz para o ^1H . Os espectros serão obtidos em CD_3OD (álcool metílico deuterado) utilizando TMS (tetrametilsilano) como padrão interno.

3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os microrganismos testes serão: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Candida spp.* A determinação da Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima será realizada de acordo com a técnica descrita por Duarte et al. (2003).

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

3.6.1 Viabilidade celular

Será avaliada a citotoxicidade dos compostos em esplenócitos de camundongos nas concentrações (100, 50, 25, 10 e 5 $\mu\text{g/ml}$) por incubação de 24h. Para o teste será realizada a viabilidade celular por anexina e iodeto de propídio. Para a análise da morte celular (10^6) células serão lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas em uma solução tampão (10mM de HEPES pH 7.4, 150mM de NaCl, 5mM de KCl, 1mM de MgCl_2 e 1.8mM de CaCl_2). Posteriormente serão adicionados 5 μL de Anexina V-FITC e 10 μL de iodeto de propídio. A apoptose e a necrose serão quantificadas por citometria de fluxo em 20000 eventos.

3.6.2 Obtenção de células esplênicas de camundongos BALB/c

Células esplênicas serão obtidas de acordo com Pereira et al. (2004).

3.6.3 Experimento de liberação de óxido nítrico

Células esplênicas de camundongos serão utilizadas para investigar a liberação de nitrito nas células estimuladas com extrato metanólico após 24, e 48h de incubação. Os meios de cultura serão coletados e subsequentemente submetidos a testes

colorimétricos de Griess (DING et al., 1988). A concentração de óxido nítrico será estimada pela curva padrão (3,12-100 $\mu\text{mol/mL}$).

3.6.4 Dosagem das citocinas liberadas nos sobrenadantes de cultura

A quantificação das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α nos sobrenadantes de cultura será determinada através da técnica de Citometria de Fluxo. As concentrações dos sobrenadantes serão calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em ng/ml ou pg/ml. O limite de detecção para cada citocina será feito de acordo com o fabricante.

3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA

Para a avaliação da toxicidade da fração BtMeOH foi utilizada a metodologia recomendada pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001).

3.8 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE IN VIVO

Grupos de camundongos fêmeas (n=5) foram tratados com solução salina a 0,9% (controle negativo), ciclofosfamida (25 mg/kg via intraperitoneal, controle positivo) ou BtMeOH (2000 mg/kg por gavagem). Os animais foram anestesiados por uma combinação quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) 48 horas após o tratamento e seu sangue (1mL) foi coletado por punção retro-orbital para utilização no ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade.

A atividade genotóxica de BtMeOH foi avaliada utilizando-se o Ensaio Cometa (EC). A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2). Foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo).

Outro parâmetro analisado foi a frequência de danos (FD%), que foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 até

classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS et al., 2008).

3.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO IN VIVO

O teste do micronúcleo em sangue periférico (MN) foi usado para se verificar o potencial mutagênico *in vivo* de BtMeOH (Hayashi et al., 1998). Atividade mutagênica pelo ensaio de *Salmonella typhimurium* (teste de AMES) e antimutagenicidade. O ensaio de mutagenicidade foi realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos no guia OECD Guideline for Testing of Chemical (2014).

3.10 ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE IN VIVO

3.10.1 Indução do diabetes em camundongos

O diabetes será induzido nos camundongos através de uma única administração por via intraperitoneal de estreptozotocina (90mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão de citrato 0,1 mol/L (pH 4,5), após 12 horas de jejum. Os animais controle receberão apenas tampão citrato. Os camundongos que apresentarem glicemia igual ou superior a 150 mg/dl serão selecionados para o experimento, que incluirá o teste de tolerância oral á glicose (OGTT), à sucrose (OSucTT) e ao amido (OSTT).

3.10.2 Glicação in vitro da Albumina de Soro Bovino (BSA)

O ensaio de BSA glicada foi realizado de acordo com Adisakwattana et al (2014). Resumidamente, 10mg/mL de BSA (0.50mL) foi incubado com 0.46mL de 500mM de frutose em 100 mM de tampão-fosfato (pH 7.4), contendo 0,02% de azida sódica e 0,04mL da fração/quercetina (concentração final: 0.05-1mg/mL) a 37°C por 21 dias. A estimativa de formação de AGEs foi realizada usando um espectrofluorímetro. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para os diferentes AGEs são dados no quadro 1 (adaptado de Awasthi e Saraswathi, 2016).

3.10.3 Inibição de Frutosamina

O nível de frutosamina foi mensurado pelo corante nitroblue-tetrazolium (NBT) segundo Adisakwattana, Thilavech e Chusak (2014).

3.10.4 Ensaio de proteção de eritrócitos

A amostra de sangue (1 ml) de voluntário foi retirada em tubo heparinizado com prévio consentimento por escrito e todo procedimento foi realizado seguindo diretrizes éticas. A capacidade de inibição da fração de *B. tetraphylla* para a hemólise de eritrócitos induzida por H₂O₂ como radical livre iniciador na presença de albumina glicada foi baseada no procedimento de Awasthi e Saraswathi (2015).

3.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.11.1 Ensaio de sequestro do radical dpph (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A eliminação do radical 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl pela fração foi mensurada de acordo com Blois (1958). Uma aliquota de 40µL de diferentes concentrações de fração e padrão foi adicionada a 250 µL de DPPH em metanol (100 µM) em placa de microtitulação de 96 poços. Após incubação por 25 min em ambiente escuro a 37°C, a absorbância foi determinada a 517nm usando leitor de microplaca.

3.11.2 Ensaio de sequestro do radical abts (2,2- azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Solução de ABTS foi preparada pela oxidação de 5 mL de ABTS (7mM) com 80 µL persulfato de potássio (140mM) durante 12-16 horas a temperatura ambiente no escuro antes do uso. ABTS (1mL) foi adicionado a tubos contendo 10 µL da fração e mixadas por vortex por 1 min. A absorbância foi mensurada a 734nm após 6 min. Trolox e BHT foram utilizados como padrões (Re et al., 1999). O percentual de atividade de eliminação do radical foi calculado por comparação com os valores de absorbância do controle negativo (não tratado com a fração).

3.11.3 Ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (frap)

Ensaio de FRAP foi realizado de acordo com o procedimento relatado por Oyaizu (1986).

3.11.4 Inibição do Radical Superoxido pelo método de DMSO alcalino

Brevemente, 0.1 mL de solução de NBT (1 mg/mL em DMSO) foi adicionado a 0.3 mL da fração ou padrão em DMSO e 1 mL de DMSO alcalino (1 mL de DMSO contendo 0.1 mL de 5mM NaOH em água), totalizando um volume final de 1,4 mL. A mistura foi submetida a vortex por 1 min e deixada a temperatura ambiente por 20 min, em seguida a absorbância foi mensurada a 560 nm. Quercetina foi utilizada como padrão referência. (Srinivasan *et al.*, 2007).

3.11.5 Quantificação de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais da fração metanólico foi determinado usando reagente de Folin-Ciocalteu (Awah *et al.*, 2012).

3.11.6 Quantificação de flavonoides

O conteúdo de flavonóides foi determinado de acordo com Awah e colaboradores (2012). Resumidamente, 100 µL da fração em metanol foi misturado com 100 µL tricloreto de alumínio (20% em metanol) e uma gota de ácido acético e depois diluídos com metanol até 5mL. Após 30min, a absorbância foi mensurada a 415nm. Quercetina foi usada como padrão de referência para a curva padrão e o resultado foi expresso como mg quercetina equivalente por grama de peso seco (mgQE/g).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 5.0 ®. A diferença entre os grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA one-way e two-way), seguida pelo teste Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para os testes foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI* E PERFIL IMUNODULADOR DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.) R.A. HOWARD.

Clarissa de França Oliveira Silva¹, José Robson Neves Cavalcanti Filho¹, Cristiane Moutinho Lagos de Melo², Luís Cláudio Nascimento da Silva³, Cibeles Maria Alves da Silva Bessa¹, Thiago Henrique Napoleão¹, Virgínia Maria Barros de Lorena⁴, Júlia Aparecida Lourenço de Souza⁵, Luiz Alberto Lira Soares⁵, Márcia Vanusa Silva¹, Maria das Graças Carneiro Cunha¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Antônio Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente⁶.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil;

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

³Programa de Pós-graduação, Universidade CEUA, São Luis, Brasil;

⁴ Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Pernambuco, Brasil;

⁵Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

⁶Departamento de Biologia e Engenharia, Universidade do Minho, Portugal.

Resumo

Buchenavia tetraphylla é um exemplo de árvore utilizada de forma etnomedicinal por alguns grupos indígenas e comunidades da região semiárida do nordeste brasileiro. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades citotóxica e imunomoduladora em esplenócitos murinos, e antimicrobiana, frente a 10 isolados clínicos de *Escherichia coli*, da fração metanólica (BtMeOH) de folhas de *B. tetraphylla*. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo e o perfil citotóxico e imunomodulador foi obtido através da exposição dos esplenócitos murinos a várias concentrações de BtMeOH. Foi realizada análise das alterações ultraestruturais em *E. coli* por microscopia eletrônica de varredura. Os valores de CMI das frações variaram entre 1250 µg/mL e 2500 µg/mL e os de CMB ocorreram acima de 5000 µg/mL. As bactérias tratadas com BtMeOH alterações estruturais como maiores rachaduras e encolhimento celular. O teste de citotoxicidade demonstrou que a dose de segurança para esplenócitos é abaixo de 25 µg/mL. BtMeOH ainda a estimulou a produção das citocinas IL-2, IL-6 e TNF-α, além de não estimular a produção de óxido nítrico. Apesar do efeito inibidor contra as bactérias testadas, BtMeOH não foi bactericida. A fração

demonstrou ser um promissor agente imunomodulador devido às citocinas estimuladas *in vitro*.

Palavras-chave: imunomodulação, citotoxicidade, citocinas, atividade antimicrobiana.

Introdução

Pesquisas recentes têm demonstrado a importância das plantas como fontes de produtos biologicamente ativos devido à grande diversidade molecular e às propriedades terapêuticas em processos inflamatórios e infecciosos. (Anyanwu, et al., 2017; Awad; Awaad, 2017). *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard, conhecida como Tanimbuca ou Mirindiba, é uma árvore neotropical amplamente utilizada como agente etnomedicinal por comunidades da região semiárida e incluindo grupos indígenas (Agra et al., 2007; Agra et al., 2008; Oliveira et al., 2012). Popularmente essa planta é utilizada como expectorante, antitussígeno, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza (Agra et al., 2007).

Poucos trabalhos foram publicados com o gênero *Buchenavia*, entretanto, pesquisas com *B. tomentosa* e *B. tetraphylla* mostraram atividade antimicrobiana promovida pelos extratos e frações dessa planta contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos (Oliveira et al., 2012; Teodoro et al., 2015; Cavalcanti et al., 2017). Além disso, extratos orgânicos da folha de *B. capitata* mostraram efeito citoprotetor contra o HIV em cultura humana de células linfoblastoides (CEM-SS) e estudos recentes do nosso grupo demonstraram a atividade antimicrobiana promovida por diferentes extratos orgânicos de *B. tetraphylla* (Beutler et al., 1992; Cavalcanti, et al., 2017).

Ao longo dos últimos anos cresceu o interesse sobre compostos obtidos de plantas sobretudo aqueles que são ativos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas multirresistentes, devido a sua diversidade molecular (Anyanwu; Okoye, 2017; Barbieri et al., 2017). Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de comprovar e determinar a ampla variedade das atividades antimicrobianas de compostos bioativos isolados de plantas ou de extratos vegetais onde esses metabólitos podem apresentar efeito sinérgico (Sakkas; Papadopoulou, 2016; Slobodníková et al, 2016).

Nesse sentido, este estudo objetivou avaliar o potencial antimicrobiano contra isolados clínicos de *Escherichia coli* e o perfil citotóxico e imunomodulador da fração metanólica de *B. tetraphylla* com o intuito de contribuir com informações científicas sobre a sua eficácia terapêutica.

Materiais e métodos

Material botânico e obtenção da fração metanólica

Folhas de *Buchenavia tetraphylla* foram coletadas no período de novembro de 2013, no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil). Elas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar e à herborização, sendo uma exsicata devidamente identificada e depositada no Herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) como espécime-testemunho de número 84.104 (Cavalcanti et al., 2017). Após desidratado o material foi triturado em um moinho de facas Macsalab mil (Model 200 LAB) e o pó armazenado em potes escuros até a utilização. Primeiramente foi realizada uma extração com hexano (100 mL) sob agitação constante de 125 rpm durante um período de 72 horas até o esgotamento. O material foi filtrado e a parte líquida concentrada em rotaevaporador, sendo o resíduo submetido a novas extrações, seguindo um gradiente de polaridade, com os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol. Após a realização do fracionamento, a fração metanólica (BtMeOH) foi armazenado em freezer a 4°C para posterior utilização.

Análise fitoquímica da fração BtMeOH

A fração BtMeOH foi submetida a análises de cromatografia em camada delgada para detecção qualitativa de algumas classes de metabólitos secundários. Após a preparação da amostra e dos padrões, eles foram aplicados de forma semiautomática com Linomat 5 da CAMAG®, e o auxílio do software WinCats® em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Merck®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas cromatográficas (Camag®, 10 x 10 cm) após saturação com a fase móvel. A cuba foi saturada durante 30 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. O volume de aplicação da amostra foi de 25 µL e de 7 µL para as substâncias padrões (tabela 1). As bandas foram aplicadas com largura de 10 mm e com distância

entre elas e das bordas das placas de 5 mm. O comprimento da placa foi de 10 cm e a largura variou de acordo com a quantidade de amostras aplicadas. Após a eluição as placas foram secas em temperatura ambiente e foram observadas sob luz UV a 254 e 365 nm e em seguida foram submetidas a derivatização de acordo com a classe de metabólito a ser analisada.

Quadro 1 - Parâmetros utilizados para análise da fração BtMeOH em Cromatografia de Camada Delgada

Classe de metabólito secundário	Substância Padrão	Sistema eluente (v/v)	Reagente revelador	Referência
Derivados cinâmicos	Ácido cafeico e Ácido clorogênico	Acetato de etila:ácido fórmico: água (90:5:5)	NEU + PEG 5% etanólico + UV 365 nm	Wagner; Bladt, 1996
Flavonoides	Quercetina e rutina			Brasseur; Angenot, 1986
Taninos hidrolisáveis	Ácido elágico e Ácido gálico			Stiasy, 1912
Taninos condensados	Catequina	Tolueno:éter (saturado com 10% de ácido acético) de 1:1	Vanilina clorídrica	Roberts et al., 1957
Cumarinas	Cumarina		Hidróxido de Potássio 10% em etanol	Wagner; Bladt, 1996

NEU= Ácido etilborilamino éster, PEG=Polietilenoglicol 400, UV 365 nm= Luz ultravioleta a 365 nm.

Obtenção e perfil de resistência das linhagens utilizadas

Foram utilizados microrganismos *Escherichia coli* susceptíveis pertencentes à coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA224) e linhagens clínicas recentes obtidas de amostras de urina através de solicitações a diversos Laboratórios de Análises Clínicas. Para determinação do perfil de resistência, as linhagens clínicas foram cultivadas em meio Mueller-Hinton-água (MHA) a 37°C por 18 horas. Em seguida, as leveduras foram inoculadas em placas de Petri com o mesmo meio e colocadas em contato com discos de antibióticos comercializados. As placas foram incubadas a 37°C e após um período de 48 horas de incubação, os halos de inibição (IDZ) foram analisados e mensurados conforme

descrito na tabela 1. Foram utilizados 14 antibióticos e o perfil de resistência a cada um deles pelas linhagens obtidas pode ser observado na tabela 2.

Tabela 1 - Interpretação dos valores de IDZ (mm) para as linhagens de *Escherichia coli* obtidas de isolados clínicos (CLSI, 2017).

Código	Drogas	Sensível (S)	Intermediária (I)	Resistente (R)
1	Ampicilina	17	14-16	13
2	Ácido nalidíxico	19	14-18	13
3	Nitrofurantoína	17	15-16	14
4	Tetraciclina	14	15-18	19
5	Amicacina	17	15-16	14
6	Gentamicina	15	13-14	12
7	Imipenem	16	14-15	13
8	Cefepime	14	15-17	18
9	Ceftazidima	18	15-17	14
10	Amoxilina + Clavulanato	18	14-17	13
11	Cefotaxima	23	15-22	14
12	Cefoxitina	14	15-17	18
13	Cefalotina	18	15-17	14
14	Ciprofloxacina	17	14-16	13

Fonte: o autor (2017).

O índice de resistência múltipla a antibióticos (MAR) foi calculado como descrito anteriormente por Krumperman (1983), utilizando a fórmula $MAR = x/y$, onde 'x' é o número de antibióticos aos quais o isolado demonstrou resistência e 'y' é o número total de antibióticos testados.

Tabela 1 - Perfil de suscetibilidade das linhagens obtidas de *E. coli* aos antibióticos padrão.

Isolados clínicos	Código das Drogas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
B01	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S
B02	R	R	S	R	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
B03	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R
B04	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R
B05	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B07	R	R	S	R	S	R	S	S	S	I	S	S	R	R
B08	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I	R
B09	R	R	S	R	S	R	S	S	I	I	R	S	R	R
B10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B11	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B12	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B13	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
B14	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
B15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S

Fonte: O autor (2017).

S: sensível ao antibiótico testado; **R:** resistente ao antibiótico testado; **I:** resposta intermediária.

1 - Ampicilina

2 - Ácido nalidíxico

3 - Nitrofurantoína

4 - Tetraciclina

5 - Amicacina

6 - Gentamicina

7 - Imipenem

8 - Cefepime

9 - Ceftazidima

10 - Amoxil+ Clavul

11 - Cefotaxima

12 - Cefoxitina

13 - Cefalotina

14 - Ciprofloxacina

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI, 2017). Foram preparadas diluições em série da fração metanólica em duplicata em Mueller-Hinton-ágar (MHA) e adicionados 10 µL de suspensão das bactérias (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC / mL). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A solução de resazurina (0,01%) foi utilizada como indicador pela visualização de mudança de cor: qualquer mudança de cor de púrpura para rosa foi registrada como crescimento bacteriano. A concentração mais baixa à qual não ocorreu alteração de cor foi tomada como CMI. Posteriormente, as culturas foram semeadas em placas SDA e incubadas por 48 h a 37 °C para determinar a Concentração Mínima Bactericida (CMB).

Avaliação das alterações ultraestruturais em E. coli promovidas pela fração BtMeOH

As linhagens com melhores resultados para o teste do CMI foram selecionadas para avaliação das alterações morfológicas induzidas pela fração metanólica. Uma amostra de 100 µL de cultura diluída de *E. coli* overnight (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi adicionada a 1 mL de meio de cultura e misturado com BtMeOH (MIC e 2x MIC). Após incubação (12 h ou 24h a 30 ° C) as células foram fixadas (glutaraldeído a 2,5% paraformaldeído a 4% em tampão de fosfato 0,1 mol/L, pH 7,2), pós-fixadas (tetróxido de ósmio a 1% ferricianeto de potássio a 0,8%/L de CaCl₂ em tampão de cacodilato 0,1 mmol/L), desidratadas (séries de acetona graduadas) e incorporadas utilizando um kit de meio embebido de epóxido (Fluka, Suíça). Em seguida, as células de *E. coli* foram colocadas para aderir a uma lamela revestida com poli-L-lisina durante 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram desidratadas (etanol graduado), secas ao ponto crítico, ligadas a esboços de montagem de alumínio, revestidas por pulverização com 20 nmol/L de ouro e obtidas por imagem com uma Quanta 200 F (FEI) segundo Silva et al. (2013).

Obtenção dos esplenócitos murinos para os testes de citotoxicidade e imunomodulação

Animais

Camundongos Balb/C (cinco fêmeas, 6-8 semanas de idade) foram criadas e mantidas no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos em condições padrão de laboratório (20-22 ° C e 12 horas de ciclo claro/escuro) com acesso livre a ração (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água. Os animais foram mantidos de acordo com as normas internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS) e os experimentos foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 0049/2016.

Obtenção dos esplenócitos de camundongos

Este procedimento foi realizado segundo Melo et al. (2011). Após a morte dos animais com gás CO₂, o baço de cada camundongo foi removido assepticamente e colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Num fluxo vertical, cada baço foi transferido para uma placa de Petri onde foram macerados. As suspensões celulares obtidas de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 ml de meio incompleto. Os homogenatos de baço foram sobrepostos numa camada Ficoll-Paque™ PLUS, com a densidade ajustada para 1,076 g/mL e centrifugada a 1000 x g a temperatura ambiente durante 25 min. A camada de células da interface contendo células imunitárias foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada fosfatada (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 g x durante 10 min. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão de azul de tripan. As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 98%.

Análise da viabilidade celular com anexina V-FITC e iodeto de propídeo-PE

Os esplenócitos dos camundongos (10⁶ células) foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado de 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina e streptomicina) e tratadas com a fração BtMeOH nas concentrações de 100, 50, 25, 10 e 5 µg/mL. As células foram incubadas em placas de 24 poços durante 24 horas para analisar a citotoxicidade da fração frente às células. As células cultivadas apenas em meio RPMI 1640 foram utilizadas como controle negativo. Em seguida, os linfócitos foram centrifugados em temperatura ambiente, 450 x g durante 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se ao precipitado 1 ml de PBS 1X. Este foi novamente centrifugado em temperatura ambiente, 450 g x durante 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em solução tampão (10mM de HEPES pH 7.4, 150mM de NaCl, 5mM de KCl, 1mM de MgCl₂ e 1.8mM de CaCl₂), foram adicionadas aos tubos de citometria e marcadas com Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500) e iodeto de propídeo (PI, 20 µg / mL) conjugado ao PE. A citometria de fluxo foi realizada em um FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) e analisada utilizando o software CELL QUEST PRO (Becton Dickinson). A análise de resultados foi realizada em Histogramas. Células que

apresentaram Anexina positiva e PI negativa foram consideradas apoptóticas, células que apresentaram Anexina negativa e PI positiva foram consideradas necróticas e células que apresentaram ambos os parâmetros negativos foram consideradas viáveis.

Produção de citocinas em sobrenadantes de culturas de esplenócitos tratados com BtMeOH pelo método CBA

Os esplenócitos foram cultivados em placas de 24 poços com densidade de 10^6 células/poço com uma concentração de BtMeOH não citotóxica para as células, ou seja, 10µg/mL. Após 24 e 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas e óxido nítrico. A dosagem de citocinas Th1 e Th2 nos sobrenadantes de cultura coletados foi determinada através da técnica de Cytometric Bead Array System (CBA). A CBA foi utilizada para a mensuração quantitativa das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17, conforme recomendado pelo fabricante nos sobrenadantes das células tratadas. Resumidamente, esta técnica emprega uma mistura de 5 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas a serem detectadas no canal FL-2. Desta forma, 50 µl da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti-TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 foi adicionada em cada tubo. Em seguida foram adicionados 50 µl do sobrenadante de cultura e do reagente Human Chemokine PE Detection em todos os tubos. Após essa etapa as amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 ml da solução tampão (Wash Buffer) foi adicionado e os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 min. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 100 µl em cada tubo, onde foram adicionados 300 µl da mesma solução tampão (Wash Buffer) para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo, no software CellQuestPro (Beckton Dickson).

Análise da liberação de óxido nítrico

Os sobrenadantes obtidos segundo o item 2.5.4 foram também utilizados para investigar a liberação de nitrito pelas células imunes após estimulação com BtMeOH. Os sobrenadantes foram submetidos a testes colorimétricos de Griess (Ding et al., 1988). A concentração de óxido nítrico foi estimada pela curva padrão (3,12-100

$\mu\text{mol/mL}$) e a leitura foi realizada em microplaca de 96 poços e em espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) em 595nm.

Análise estatística

Todos os testes antimicrobianos foram realizados em quadruplicata e os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O índice de correlação foi calculado usando o coeficiente de Pearson (ρ). As análises estatísticas da imunomodulação foram realizadas usando-se uma avaliação prévia das amostras pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliação da linearidade da curva Gaussiana (normalidade estatística) e para a comparação entre grupos foi utilizado o teste de Wilcoxon. Todos os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Resultados

Análise química por cromatografia em camada delgada

Os resultados das análises fitoquímicas da fração metanólica de *B. tetraphylla* mostraram a presença de flavonoides como rutina e quercetina, e o ácido elágico representou a classe dos taninos hidrolisáveis (Tabela 3).

Tabela 2 - Análise fitoquímica da fração metanólica de *B. tetraphylla*.

Metabólitos analisados	Substâncias padrão	BtMeOH
Derivados cinâmicos	Ácido cafeico	-
	Ácido clorogênico	-
Flavonoides	Quercetina	+
	Rutina	+
	Ácido elágico	+
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	-
Taninos condensados	Catequina	-
Cumarinas	Cumarina	-

Fonte: o autor (2017).

Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)

A fração metanólica de *B. tetraphylla* apresentou melhor atividade antimicrobiana contra as linhagens B02, B04, B14, B15, UFPEDA224 e a linhagem resistente B09. Os valores de CMI variaram entre 1250 µg/mL para linhagens B15 e UFPEDA224 até 2500 µg/mL para as linhagens B02, B04, B09 e B014 (Tabela 4). Para o CMB todas as linhagens só foram sensíveis a uma concentração maior que 5000 µg/mL, com exceção da UFPEDA224, que apresentou CMB igual a 5000 µg/mL. Para a cepa susceptível UFPEDA24, foi encontrada uma razão CMB/CMI igual a 4. Não houve correlação entre o índice de MAR e o CMI, indicando que os valores encontrados não estão relacionados à resistência bacteriana ($p=0,16$).

Tabela 3 - Perfil da atividade antimicrobiana promovida por BtMeOH

<i>E. coli</i>	BtMeOH		
	Índice de MAR	CMI	CMB
B02	0,21	2500	>5000
B04	0,42	2500	>5000
B06	0	5000	>5000
B09	0,5	2500	>5000
B10	0	5000	>5000
B12	0,07	5000	>5000
B13	0,42	5000	>5000
B14	0,07	2500	>5000
B15	0	1250	>5000
UFPEDA224	0	1250	5000
MÉDIA CMI		3250 ±1581	
MÉDIA CMB		5000 ± 0	

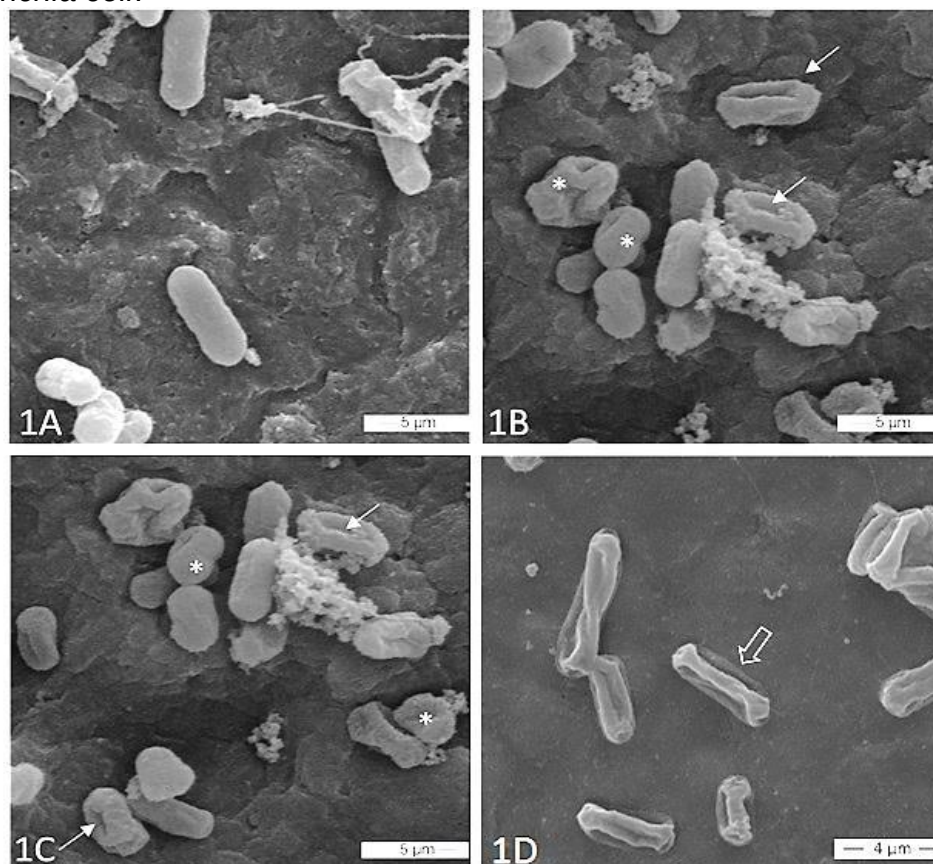
Fonte: O autor (2017). CMI e CMB estão expressos em µg/mL. Índice de MAR: índice de múltipla resistência a antibiótico. UFPEDA: Coleção de microrganismos do departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Danos ultraestruturais promovidos em *E. coli* pela fração BTMEOH

A avaliação das alterações morfológicas induzidas pela fração BtMeOH em *E. coli* foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como esperado, células não tratadas apresentaram morfologia bacilar típica preservada e superfície celular intacta (Figura 1A). Em contraste, as bactérias tratadas com BtMeOH nas concentrações observadas no CMI (tabela 5) exibiram diversas alterações

morfológicas incluindo, superfície celular com rugosidade, múltiplas depressões e cicatrizes na parede celular (ver setas brancas nas figuras 1B e 1C). Em alguns casos, ocorreu redução do tamanho e perda da morfologia típica de bacilo (asteriscos nas figuras 1B e 1C), além de crenação (seta vazia na figura D).

Figura 1 - Alterações morfológicas induzidas pela fração metanólica de *B. tetraphylla* em *Escherichia coli*.



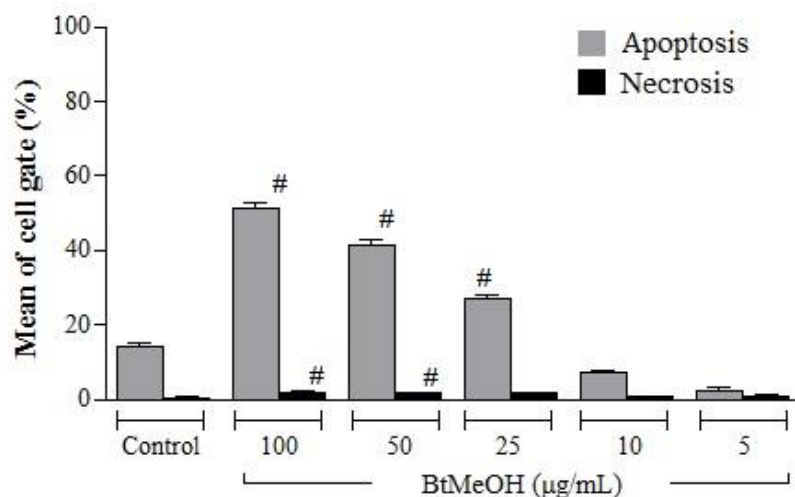
Fonte: O autor (2017). Linhagens B15 e UFPEDA224. (A) Aspectos ultraestruturais das células de *E. coli* controle. (B, C e D) *E. coli* tratada com BtMeOH (1250 µg/mL). Setas brancas = alterações na parede celular como depressões e cicatrizes (1A e 1C); Asteriscos = alterações no tamanho e perda da morfologia celular (1A e 1C); Seta sem preenchimento = crenação celular (1D).

Investigação do perfil citotóxico e imunomodulador de BtMeOH frente à esplenócitos murinos

A fração metanólica de *Buchenavia tetraphylla* (BtMeOH) foi usada em culturas de esplenócitos de camundongos para avaliar o seu potencial citotóxico e imunomodulador. Inicialmente, investigamos a atividade citotóxica promovida por BtMeOH contra esplenócitos de camundongos e a concentração de segurança para

experimentação *in vitro* que pode ser utilizada é abaixo de 25 µg/mL como ilustrado na Figura 2. Nessa concentração BtMeOH não promoveu nem necrose nem apoptose.

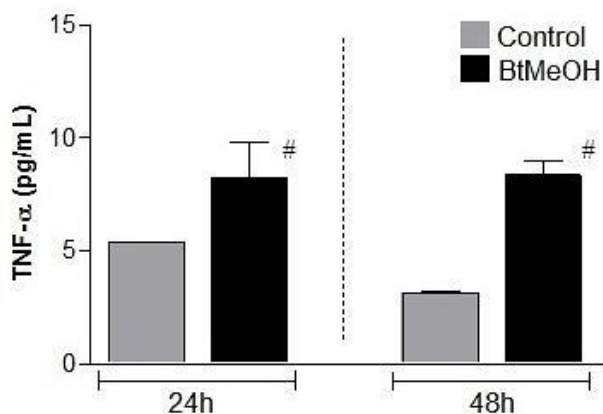
Figura 2 - Efeitos de BtMeOH sobre a viabilidade de esplenócitos murinos.



Fonte: O autor (2017). Na concentração abaixo de 25µg/mL BtMeOH pode ser usado de forma segura em culturas celulares. Controle representa células cultivadas apenas em RPMI. As barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. #P <0,05.

Foram analisadas a produção de citocinas e de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos tratados, *in vitro*, com 10 µg/mL de BtMeOH em 24 e 48 horas de ensaio. Os resultados revelaram que IL-4, IL-10, IFN-γ e IL-17 foram produzidas em baixas concentrações e não apresentaram resultados significativos em relação ao controle. No entanto, houve uma produção significativa de TNF-α em ambos os tempos de culturas (Figura 3) e maior produção de IL-2 e IL-6 em 48 horas de ensaio (Figura 4A e B).

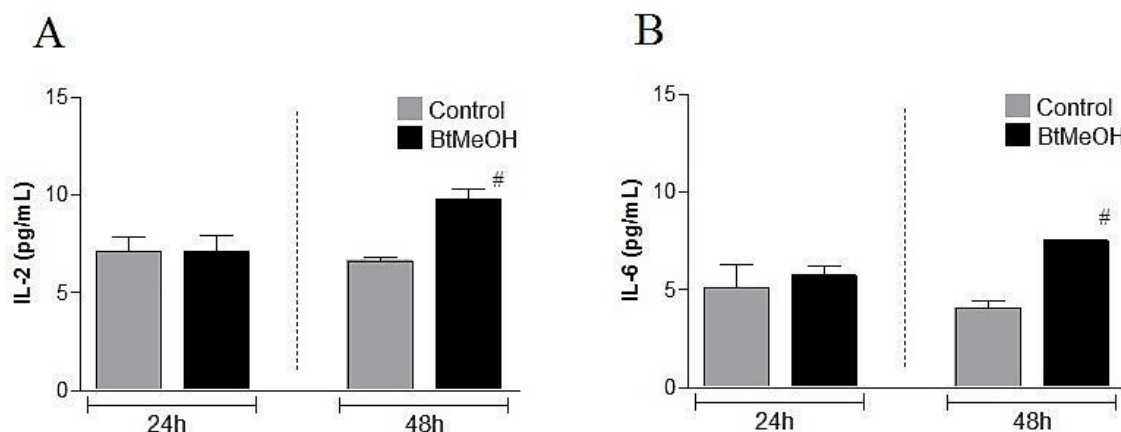
Figura 3 - Perfil da produção da citocina TNF-α promovido por BtMeOH em culturas de esplenócitos murinos em 24 e 48 horas de incubação.



Fonte: O autor (2017). As barras cinzas representam a cultura controle (células + meio) e as barras pretas representam culturas tratadas com BtMeOH em 10 µg/mL. Foram observados resultados significativos

na produção de TNF- α tanto em 24 como em 48 horas de ensaio. As barras verticais representam três experimentos independentes realizados em triplicata. #P< 0.05.

Figura 4 - Perfil de produção das citocinas IL-2 e IL-6 promovido por BtMeOH em cultura de esplenócitos murinos em 24 e 48 horas de incubação.



Fonte: O autor (2017). As barras cinzas representam a cultura controle (células + meio) e as barras pretas representam culturas tratadas com BtMeOH em 10 μ g/mL. Resultados significativos foram observados para ambas as citocinas em 48 horas de incubação. As barras horizontais representam dois experimentos independentes realizados em triplicata. #P< 0.05.

A produção de óxido nítrico também foi mensurada pelo método de Griess em sobrenadantes de cultura de esplenócitos tratados com BtMeOH em 10 μ g/mL. Os resultados mostraram que BtMeOH foi incapaz de induzir a produção significativa deste mediador químico por esplenócitos de camundongos em ambos os tempos de incubação.

Discussão e conclusão

Poucas pesquisas foram realizadas com a planta *Buchenavia tetraphylla* e a maioria dos trabalhos publicados estão associados com sua utilização etnobotânica (Agra et al., 2007; Agra et al., 2008; Oliveira et al., 2012). No entanto, inúmeras funções tem sido atribuídas a representantes da família Combretaceae como efeitos inibitórios sobre a proliferação das células de leucemia promielocítica (HL-60) e leucemia eritromioelastóide humana (K562) (Gossan et al., 2016), inibição da resistência a multirresistência de microorganismos (Rao; Satish, 2016), cicatrização de feridas (Kisseih et al., 2015) e atividade neuroprotetora contra isquemia cerebral e reperfusão (Yaidikar e Thakur, 2015). Neste estudo investigamos se *Buchenavia tetraphylla* era

capaz de inibir o crescimento de linhagens de *Escherichia coli* e se promoveria imunomodulação em culturas de esplenócitos de camundongos.

Nas nossas análises fitoquímicas de polifenóis revelaram a presença de flavonoides e taninos hidrolisáveis como ácido elágico, corroborando com dados anteriormente publicados onde detectou-se a presença de flavonoides e taninos hidrolisáveis na fração metanólica das folhas de *B. tetraphylla* (Cavalcanti et al., 2017). Vários trabalhos têm correlacionado a presença de polifenóis e outros metabólitos secundários em extratos de plantas da família Combretaceae com atividades antimicrobianas (Li et al. 2002).

Compostos isolados do extrato aquoso de *Buchenavia tomentosa* como ácido gálico e ácido elágico mostraram ser importantes inibidores de *Candida* spp (Teodoro et al. 2015). Cavalcanti e colaboradores (2017) demonstraram a atividade fungicida de *B. tetraphylla* contra isolados clínicos de *C. Albicans*, incluindo linhagens resistentes, com CMI variando de 156 µg/mL a 2500 µg/mL e CMM de 1250 a 2500 µg/mL para a fração metanólica. Triterpenos isolados de raízes de *Combretum racemosum* como ácido terminólico e ácido ursólico apresentaram atividade anti-*E.coli* significativa, com valores para CMI de 128 e 256 µg/mL respectivamente (Gossan et al., 2016).

Em nossas investigações, a fração BtMeOH inibiu o crescimento da maioria das cepas de *E. coli* apresentando CMI de 1250-5000 µg/mL. Por outro lado, a BtMeOH apresentou fraca atividade bactericida, com valores de CMB acima de 5000 µg/mL. A razão entre o CMB/CMI encontrada para a maioria das linhagens foi igual ou superior a 4, sugerindo que a fração é bacteriostática (Djimeli et al., 2017; Schallenberger et al., 2010). A atividade bacteriostática de plantas tem sido correlacionada com a presença de taninos e a prevenção de formação de biofilme bacteriano (Trentin et al., 2013). Em estudo semelhante, *Alchornea cordifolia* foi avaliada frente a *E. coli*, apresentando valores semelhantes aos nossos achados, de 1500 µg/mL para o CMI e >6000 µg/mL para o CMB (Djimeli et al., 2017). Amparo et al (2017) testaram o extrato etanólico bruto e frações de *Protium spruceanum* frente a 19 bactérias patogênicas, sendo a fração de acetato de etila considerada a mais ativa, com menor concentração bactericida mínima, variando de 0,3 a 80 mg/mL.

E. coli é um bacilo gram-negativo presente na microbiota normal da maioria dos animais, entretanto algumas cepas multirresistentes apresentam importância clínica (Chantemesse, 2017). Dentre as infecções transmitidas por *E. coli* estão as do trato urinário (Sorlózano-Puerto A, 2017; Stojanovic; Milosevic, 2010; Lopes, 2012), as

hospitalares de alta morbidade e mortalidade, além das infecções transmitidas por via oral-fecal (Santos 2009; Aires 2017).

Aplicação da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura tem sido utilizada como ferramenta útil para as análises de células microbianas, pois as alterações morfológicas decorrentes do contato com compostos bioativos podem direcionar esclarecimentos a respeito de seus mecanismos de ação (Susan; Tanya, 2008). A análise ultraestrutural mostrou que as células de *E. coli* (B15 e UFPE224) tratadas com BtMeOH (CMI=1250 µg/mL) apresentaram alterações morfológicas, além de crenação, que é perda excessiva de volume citosólico, muitas vezes acompanhada de morte celular.

A análise citotóxica de BtMeOH demonstrou que este composto pode ser utilizado com segurança em culturas celulares murinas em uma concentração abaixo de 25 µg/mL sendo eficaz na indução de imunomodulação nessas células. Outros estudos corroboram com nosso resultado. Lacouth-Silva et al. (2015) utilizando um composto isolado de *Combretum leprosum* não apresentou efeito citotóxico contra células mononucleares de sangue periférico humano em concentração entre 0,3 e 1,5 µg/mL em 24 horas de ensaio. Kapoor e colaboradores (2015) utilizando extrato de casca de *Terminalia arjuna* contra linhagem celular de macrófagos humanos mostrou que houve imunomodulação e que a máxima expressão de citocinas foi observada somente às 24 h em culturas com 10 µg/mL da fração.

O perfil de citocinas produzido pelos esplenócitos cultivados com BtMeOH mostrou uma grande possibilidade de a fração ser eficaz na cicatrização de feridas, uma vez que TNF α e IL-6 são as principais citocinas indutoras do reparo e depósito de colágeno durante uma lesão cutânea ou muscular. Além disso, a liberação não significativa de óxido nítrico associada à baixa produção do IFN- γ são promissores na não exacerbação do processo inflamatório e acúmulo de radicais superóxido (Melo et al., 2010). Ralf et al. (2016) mostraram resultados muito semelhantes em comparação com o nosso estudo. Estes autores usando o extrato hexânico de folhas de *Critonia aromatisans* contra macrófagos peritoneais de camundongos NIH machos mostraram maior produção de TNF- α e IL-6 e redução da quantidade de NO.

Schepetkin et al. (2013), utilizando polissacáridos ácidos isolados de *Combretum racemosum*, observaram nos seus resultados que o TNF- α e a IL-6 foram produzidos em concentrações mais elevadas por células mononucleares de sangue periférico humano cultivadas com os polissacarídeos. Ghareeb et al. (2016) investigando um

modelo de vacina terapêutica baseado no enriquecimento *in vivo* de células dendríticas, utilizaram o extrato bruto etanólico de *Berberis vulgaris* e observaram uma liberação mais baixa de IL-4 e IL-10. Além disso, Paik et al. (2016) usaram culturas de esplenócitos de camundongos tratados com extrato de tubérculos de batata, ricos em inibidor de serina protease, e observaram que foram produzidos níveis substanciais de TNF- α e IL-4 enquanto os níveis de IL-10 diminuíram.

Apesar da fração metanólica de *B. tetraphylla* ser uma grande fonte de agentes antimicrobianos, o efeito bactericida contra as linhagens de *E. coli* testadas só foi observado em altas concentrações. BtMeOH apresentou atividade inibitória, sendo um possível agente bacteriostático. Além disso, a fração foi eficaz em induzir imunomodulação em esplenócitos murinos, promovendo a produção de citocinas importantes no processo cicatricial. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a fração metanólica de *B. tetraphylla* deve ser utilizada em testes futuros que comprovem sua eficácia no reparo de lesões desde a fase inflamatória até a prevenção da contaminação microbiológica da ferida.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho. Agradecemos ainda ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) pelo suporte laboratorial e pelo uso do Citômetro de Fluxo pertencente ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas – NPT-1.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 111, p.383- 395, 2007.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, p.14-140, 2007.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian jornal of Pharmacognosy**, v.18, p. 472-508, 2008.

AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Acta biochimica Polonica**. v.64, n. 1374, 2017.

AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Acta biochimica Polonica**, 2017.

AMPARO, T. R., RODRIGUES, I. V., SEIBERT, J. B., SOUZA, R. H. Z., OLIVEIRA, A. R. D., CABRAL, V. A. R.; VIEIRA, P.M.A.; BRANDÃO, G.C.; OKUMA, A.A.; FILHO, S.V.A.; TEIXEIRA, L. F. M.; SOUZA, G.H.B. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. **Natural Product Research**, 2017.

ANYANWU, M. U.; OKOYE, R. C. Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**. v. 6, n. 2, p. 240, 2017.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**. 2017.

BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R.; CRAGG, G. M. Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. **Journal of natural products**, v. 55, n. 2, p. 207-213, 1992.

BRASSEUR & ANGENOT. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol. **Journal of Chromatography**. v.400, p. 351-355, 1986.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

CHANTEMESSE, B.; BETELLI, L.; SOLANAS, S.; VIENNEY, F.; BOLLACHE, L.; HARTMANN, A.; ROCHELET, M. A nitrocefin-based amperometric assay for the rapid quantification of extended- spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters. **Water Research**. v.109, p. 375-381, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21", **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

DJIMELI, M. N.; FODOUOP, S. P. C.; NJATENG, G. S. S.; FOKUNANG, C.; TALA, D. S.; KENGNI, F.; GATSING, D. Antibacterial activities and toxicological study of the

aqueous extract from leaves of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 349, 2017.

GHAREEB, D. A.; ELWAKEEL, E. H.; KHALIL, R.; AZIZ, M. S. Investigation of the Immunomodulatory effect of *Berberis vulgaris* on core-pulsed dendritic cell vaccine. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 325, 2016.

GOSSAN, D. P. A.; MAGID, A. A.; YAO-KOUASSI, P. A.; JOSSE, J.; GANGLOFF, S. C.; MORJANI, H.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L. Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. **Fitoterapia**, v. 110, p. 89-95, 2016

KAPOOR, DIVYA; VIJAYVERGIYA, RAJESH; DHAWAN, VEENA. Terminalia arjuna in coronary artery disease: ethnopharmacology, pre-clinical, clinical & safety evaluation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1029-1045, 2014.

KISSEIH, E.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; SENDKER, J.; ZACHARSKI, D.; BRANDT, S.; HENSEL, A. Phytochemical characterization and in vitro wound healing activity of leaf extracts from *Combretum mucronatum* Schum. & Thonn.: Oligomeric procyanidins as strong inducers of cellular differentiation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 628-636, 2015.

KOMAPE, N. P. M.; ADEROGBA, M.; BAGLA, V. P.; MASOKO, P.; ELOFF, J. N. Anti-bacterial and anti-oxidant activities of leaf extracts of *Combretum vendee* (combretaceae) and the isolation of an anti-bacterial compound. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 5, p. 73-77, 2014.

LACOUTH-SILVA, F.; XAVIER, C. V.; SETÚBAL, S. D. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; DE CASTRO, O. B.; STÁBELI, R. G. The effect of 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20 (29)-ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 420, 2015.

MELO, C. M. L.; DE CASTRO, M. C. A. B.; DE OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. Immunomodulatory response of Cramoll 1, 4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

PAIK, D.; DAS, P.; NASKAR, K.; PRAMANIK, P. K.; CHAKRABORTI, T. Protective inflammatory response against visceral leishmaniasis with potato tuber extract: A new approach of successful therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1295-1302, 2016.

RALF, K.; GABRIEL, B.; ERMILO, A. A. V.; MARTHA, M. G.; MIRBELLA, C. F.; ROCIO, B. A. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Critonia*

aromatisans leaves: Downregulation of pro-inflammatory cytokines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 190, p. 174-182, 2016.

ROBERTS, E.A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; OLDSCHOOL, M.. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science Food Agriculture**, v. 8,p. 72-80, 1957.

SAKKAS, H.; GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, V.; PETSIOS, S.; PAPADOPOULOU, C. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 212, 2016.

SCHEPETKIN, I. A.; KOUAKOU, K.; YAPI, A.; KIRPOTINA, L. N.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory and hemagglutinating activities of acidic polysaccharides isolated from *Combretum racemosum*. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 628-637, 2013.

SILVA, J. F. V.; SILVA, L. C. N.; ARRUDA, I. R. S.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its capacity to enhance the activity of four antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of medicinal plants research**, v.7, n.28, p.2067-2072, 2013.

SLOBODNÍKOVÁ, L.; FIALOVÁ, S.; RENDEKOVÁ, K.; KOVÁČ, J.; MUČAJI, P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1717, 2016.

SORLÓZANO-PUERTO, A.; GÓMEZ-LUQUE, J. M.; LUNA-DEL-CASTILLO, J. D. D.; NAVARRO-MARÍ, J. M.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, J. Etiological and Resistance Profile of Bacteria Involved in Urinary Tract Infections in Young Children. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, Á. C. B.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V. L.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. **Future microbiology**, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A. J. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.

WAGNER, H.; Bladt, S. **Plant drug analysis-A thin layer chromatography atlas**. Springer.(1996).

YAIKAR, L.; THAKUR, S. Punicalagin attenuated cerebral ischemia–reperfusion insult via inhibition of proinflammatory cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 402, n. 1-2, p. 141-148, 2015.

4.2 ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DO POTENCIAL GENOTÓXICO, MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.) R.A. HOWARD.

Clarissa de França Oliveira Silva¹, Talita Giselly dos Santos Souza², Danielle Feijó de Moura², Jorge José de Souza Pereira^{3,4}, Fernanda Miguel de Andrade², Cristiano Aparecido Chagas², Jaqueline de Azevêdo Silva³, Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório⁵, Márcia Vanusa Silva², Maria das Graças Carneiro Cunha¹, Maria Tereza dos Santos Correia², Antônio Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente⁶.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

²Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

³Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

⁴Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

⁵Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

⁶Departamento de Biologia e Engenharia, Universidade do Minho, Portugal.

Resumo

Buchenavia tetraphylla é uma árvore relatada como etnomedicinal por comunidades da região semiárida, utilizada como expectorante, antitussígena, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza. Estudos com *B. tetraphylla* mostraram atividade antimicrobiana promovida pelos seus extratos e frações, não há, porém, informações acerca da sua toxicidade. A utilização de produtos vegetais deve estar sempre alicerçada em informações sobre a composição química e segurança de uso, pois podem ser potencialmente tóxicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade oral aguda, o potencial genotóxico e mutagênico *in vivo* e *in vitro* e anti-mutagênico da fração metanólica de *B. tetraphylla* (BtMeOH). Para os testes *in vivo*, a fração foi administrado por via oral na dose de 2000 mg/kg em camundongos swiss albinos. Os animais foram observados durante 14 dias após administração para avaliação da toxicidade oral aguda. A genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* foram avaliados através do ensaio cometa e teste do micronúcleo respectivamente após 48 horas da administração da fração. O potencial mutagênico *in vitro* foi realizado pelo teste de Ames. BtMeOH não induziu alterações significativas nas análises de toxicidade aguda. A fração não induziu o aumento da frequência ou índice de danos no DNA. O número de micronúcleos nos eritrócitos dos animais tratados com BtMeOH foi semelhante ao do grupo controle negativo. Entretanto, na concentração de 100 mg/mL, a fração BtMeOH apresentou um índice mutagênico (IM) > 2.0 para cepa TA97, indicando ação mutagênica. Já na concentração de 10 mg/mL, BtMeOH não demonstrou evidência mutagênica para nenhuma das cepas testadas. A fração conseguiu ainda reverter mutações induzidas por agentes mutágenos. Esses resultados indicam que BtMeOH não foi genotóxico ou mutagênico de maneira significativa, apresentando poucas alterações nas estruturas do DNA analisadas.

Palavras-chave: Micronúcleo; Ensaio Cometa; Tese de Ames; Segurança de uso; DNA.

Introdução

A vegetação do semiárido nordestino, em especial a caatinga, compreende formações vegetais altamente ameaçadas, sendo fonte ainda pouco conhecida de recursos naturais. Nesse ambiente encontram-se representantes da família Combretaceae, como a *Buchenavia tetraphylla* que possui distribuição neotropical e no Brasil ocorre naturalmente no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Marquete; Loiola, 2015). Essa espécie é relatada como etnomedicinal por comunidades da região semiárida e grupos indígenas (Agra; Freitas; Barbosa-Filho, 2007; Agra et al., 2008; Oliveira et al., 2012), sendo utilizada como expectorante, antitussígena, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza (Agra et al., 2007). Poucos trabalhos foram publicados com o gênero *Buchenavia*, entretanto, pesquisas com *B. tomentosa* e *B. tetraphylla* mostraram atividade antimicrobiana promovida pelos extratos e frações dessa planta contra linhagens, inclusive cepas resistentes de bactérias gram-negativas e gram-positivas e fungos (Oliveira et al., 2012; Teodoro et al., 2015; Cavalcanti et al., 2017). Além disso, extratos orgânicos da folha de *B. capitata* mostraram efeito citoprotetor contra o HIV em cultura humana de células linfoblastoides (CEM-SS) (Beutler et al., 1992). Há, porém, informações científicas insuficientes a respeito desta planta.

A utilização de produtos vegetais deve estar alicerçada em informações sobre a composição química e toxicidade, pois tais produtos não estão isentos de efeitos adversos, podendo ser potencialmente nefrotóxicos, hepatotóxicos, mutagênicos ou genotóxicos (Oliveira et al., 2016). Vários biomarcadores são reconhecidos por agências reguladoras internacionais e utilizados para avaliar a segurança e eficácia de produtos naturais (Bhagat, 2017). Dentre os ensaios mais utilizados estão o teste de mutagenicidade de Ames, o teste do micronúcleo (MN), e o ensaio cometa, capazes de detectar danos importantes no material genético e mutações específicas (Matsumoto et al., 2017).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade oral aguda, o potencial genotóxico e mutagênico da fração metanólica de *B. tetraphylla* em eritrócitos policromáticos de camundongos. Verificamos também a sua mutagenicidade em cepas

recombinantes de *Salmonella typhimurium*, afim de fornecer informações pré-clínicas iniciais sobre da referida espécie.

Materiais e métodos

Material botânico e obtenção da fração metanólica

Folhas de *Buchenavia tetraphylla* foram coletadas no período de novembro de 2013, no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil). Elas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar e à herborização, sendo uma exsicata devidamente identificada e depositada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) como espécime-testemunho de número 84.104. Após desidratado o material foi triturado em um moinho de facas Macsalab mil (Model 200 LAB) e o pó armazenado em potes escuros até a utilização. Primeiramente foi realizada uma extração com hexano (100mL/100g de peso seco) sob agitação constante de 125 rpm durante um período de 72 horas até o esgotamento. O material foi filtrado e a parte líquida concentrada em rotaevaporador, sendo o resíduo submetido a novas extrações, seguindo um gradiente de polaridade, com os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol. Após a realização do fracionamento, a fração metanólica (BtMeOH) foi armazenada em freezer a 4°C para posterior utilização.

Animais

Foram utilizados camundongos machos ou fêmeas swiss albinos, com aproximadamente oito semanas de idade, pesando em torno de 40g. Durante o experimento, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno mantidas a temperatura de 22°C $\pm$ 2°C, umidade relativa de 50 $\pm$ 5%, com ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais receberam água potável e ração a vontade. Todos os procedimentos experimentais obedeceram às normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (protocolo nº 00049/2016).

Avaliação da toxicidade oral aguda

Para a avaliação da toxicidade da fração BtMeOH foi utilizada a metodologia recomendada pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). O método permite a classificação do material que está sendo testado em diversas classes de toxicidade definidas por valores de corte fixos de DL50 (dose letal média) (Reddy, 2015). O teste de toxicidade aguda consistiu na administração da dose de 2000 mg/kg do produto em estudo por gavagem. Foram utilizados 2 grupos, cada um contendo três animais (fêmeas), totalizando 6 animais para o experimento. Este procedimento foi realizado em duplicata. A fração MeOH foi solubilizada em NaCl 0,9% (p/v) e 1% de DMSO e um grupo recebeu apenas o veículo. Após a administração os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias, para a verificação de qualquer alteração comportamental ou nas atividades fisiológicas. Os animais foram avaliados pelo método de screening hipocrático, o qual verifica qualquer comprometimento do animal como: o estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo do animal. Também foram observados o consumo de água, ração e o peso dos órgãos após o término do período de experimentação (fígado e rim). O sangue dos animais também foi coletado para verificação dos parâmetros bioquímicos de proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais (PT), albumina (ALB) e ureia, utilizando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil).

As análises histológicas do fígado e rim dos animais do grupo controle e fração foram realizadas por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina (10% v/v), em seguida desidratados em soluções de etanol em uma série graduada (70-100%), diafanizadas em xilol e embutidas em parafina. Secções histológicas de 5 µm foram cortadas em micrótomo, coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lâmina de cobertura com resina Entellan (Merk- German). As lâminas foram observadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital Moticam 1000 1.3 MP (Motic Incorporation Ltd, Causeway Bay, Hong Kong).

Ensaio de genotoxicidade in vivo

Grupos de camundongos fêmeas (n=5) foram tratados com solução salina a 0,9% (controle negativo), ciclofosfamida (25 mg/kg via intraperitoneal, controle positivo) ou BtMeOH (2000 mg/kg por gavagem). Os animais foram anestesiados por uma combinação quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) 48 horas após o tratamento e seu sangue (1mL) foi coletado por punção retro-orbital para utilização no ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade.

A atividade genotóxica de BtMeOH foi avaliada utilizando-se o Ensaio Cometa (EC). Primeiramente, 15 µL do sangue coletado foram homogeneizados com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo a mistura depositada em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. As lâminas foram mantidas a temperatura 4 °C por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lâminas sem as lamínulas foram submetidas a uma solução de lise por um período de 48 horas (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após a lise as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de ± 300 mA e diferença de potencial de 32V. As lâminas que serviram de controle positivo foram expostas durante 10 minutos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 200 mM. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para a revelação, cada lâmina foi corada com 30µL de solução de brometo de etídio (0,0002%, p/v). A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2). Foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor damos o nome de índice de dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado da seguinte forma:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

Outro parâmetro analisado foi a frequência de danos (FD%), que foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 até

classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS et al., 2008), seguindo a fórmula:

$$FD = \frac{[(n^{\circ} \text{ total} - n^{\circ} \text{ classe } 0) \cdot 100]}{n^{\circ} \text{ total}}$$

Avaliação do potencial mutagênico in vivo

O teste do micronúcleo em sangue periférico (MN) foi usado para se verificar o potencial mutagênico *in vivo* de BtMeOH (Hayashi et al., 1998). Foram colocados em duas lâminas previamente preparadas com laranja de acridina 10 µl de amostra de sangue de cada animal e a presença de micronúcleos foi avaliada utilizando-se um microscópio de fluorescência (OCDE, 2014). Para cada amostra, 2000 eritrócitos policromáticos foram contados, e uma análise cega foi realizada por um único indivíduo.

Atividade mutagênica pelo ensaio de Salmonella typhimurium (teste de AMES) e antimutagenicidade

O ensaio de mutagenicidade foi realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos no guia OECD Guideline for Testing of Chemical (2014). Foram realizadas análises com as cepas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 e TA102 com alterações nos genes da histidina, tornando-as histidina dependentes. Na presença de um agente mutagênico, as colônias podem sofrer novas mutações e reverter o quadro de dependência a histidina. As cepas empregadas neste teste incluíram as com (+his9) e sem metabolização (-his9), com objetivo de selecionar as doses utilizadas nos ensaios e excluir as concentrações que apresentassem citotoxicidade. As concentrações utilizadas de BtMeOH foram de 10 e 100 mg/mL. A citotoxicidade foi detectada a partir da redução de colônias revertentes e da ausência ou diminuição das colônias controle. As frações BtMeOH foram adicionados a tubos de ensaio junto com a solução de cultura bacteriana de *S. typhimurium* TA97, TA98 e TA102, tampão fosfato (pH 7.4) e 2mL de ágar suplementados com 0.5 mM de histidina e biotina. A adição do ativador metabólico S9 foi realizada em um outro ensaio em triplicata, onde as frações BtMeOH foram distribuídas e junto com a solução de cultura bacteriana de

S. thyphimurium TA97, TA98 e TA102, 500µL da solução de ativação metabólica S9 com concentração final de 8% do volume total e 2mL de ágar de superfície suplementados com 0.5 mM de histidina e biotina. As soluções foram homogeneizadas e plaqueadas em placas de Petri contendo Meio Mínimo e incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ à uma temperatura de 37°C. DMSO foi usado como controle negativo, o 4-Nitro-o-phenylenediamine (NPD) como controle positivo para TA97-98 e a Mitomicina C (MMC) como controle positivo para TA102. O teste de antimutagenicidade foi realizado para resultados negativos no teste de Ames, associado aos mutagênicos conhecidos já descritos. O número de colônias revertentes por placa foi contabilizado por meio de contador de colônias após o período de incubação.

Análise estatística

Os resultados da toxicidade aguda foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle. Os resultados do MN e EC foram analisados comparando-se o grupo tratado que recebeu BtMeOH com o grupo controle negativo pelo teste de Mann-Whitney. Para se verificar a eficiência dos testes, os grupos controle negativo (CN) e positivo (CP) foram comparados entre si pelo também pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi $p \leq 0,05$ e o software R foi usado para todas as análises (RDEVELOPMENT, 2012). Para a análise do teste de AMES e antimutagenicidade foi utilizado o teste de fisher no programa R Studio, com nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados

Avaliação da toxicidade oral aguda

Os resultados deste teste estão representados na tabela 1. Os animais receberam a dose de 2000 mg/kg de BtMeOH por via oral. Na primeira hora de observação durante o screening hipocrático, logo após a gavagem, os animais que receberam tratamento apresentaram piloereção e sonolência, entretanto nenhum veio a óbito em 24 horas. Não houve nenhuma variação significativa no peso ou consumo de água e ração em relação aos animais do grupo controle durante os 14 dias de

observação. Também não foram observadas diferenças significativas no peso dos órgãos e na aparência macroscópica dos mesmos. Os resultados obtidos indicam que o produto BtMeOH apresentou baixa toxicidade com DL₅₀ estimada em 2500 mg/kg.

Tabela 1 - Evolução do peso corporal, consumo de ração, água e peso dos órgãos (média $\pm$ desvio padrão), dos animais tratados com a fração metanólica de *B. tetraphylla* em relação ao grupo controle.

Grupos	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso dos animais Inicial/Final (g)	Índice dos órgãos	
				Fígado	Rim
BtMeOH	13,7 $\pm$ 2,0	15,7 $\pm$ 4,9	37,8 – 38,6	1.596	0.344
Controle	15,5 $\pm$ 3,8	19,6 $\pm$ 4,7	37,4 – 36,3	1.696	0.367

Fonte: O autor (2017). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados, houve diferença estatística quanto aos valores da enzima TGO (AST) dos animais tratados com BtMeOH em relação ao controle. Nenhum outro parâmetro bioquímico avaliado variou de forma significativa (tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos do sangue dos animais tratados por via oral com BtMeOH durante 14 dias.

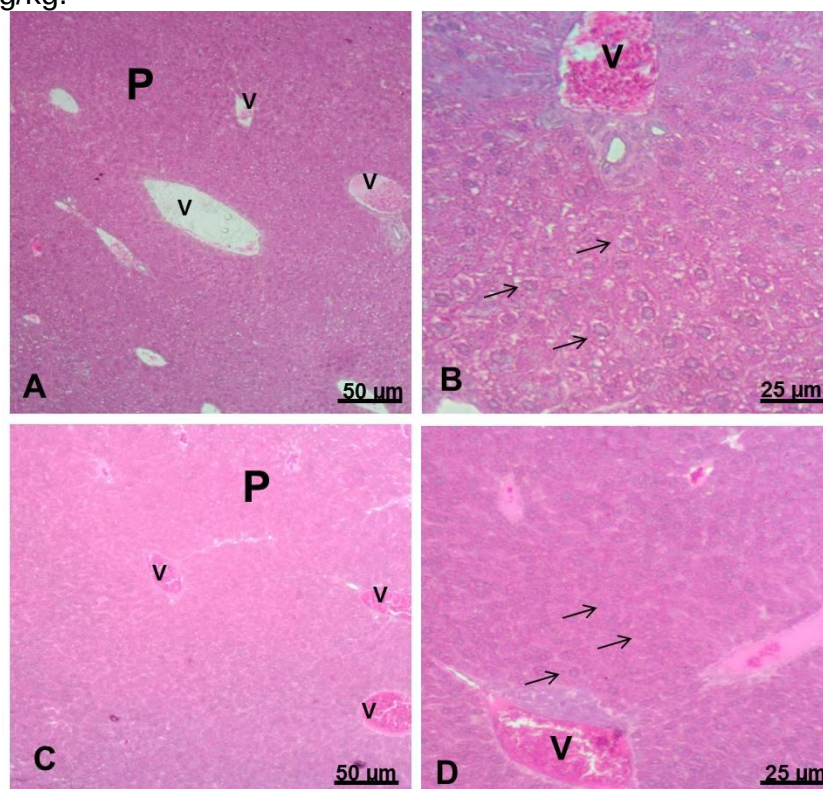
Tratamentos	Parâmetros					
	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	ALB (g/dL)	PT (mg/dL)	UREIA (mg/dL)
Controle	77,05 $\pm$ 4,04	58,79 $\pm$ 8,63	30,47 $\pm$ 19,38	2,76 $\pm$ 0,39	4,36 $\pm$ 0,28	0,41 $\pm$ 0,06
BtMEOH (2000 mg/kg)	120,90 $\pm$ 21,99*	127,74 $\pm$ 38,33	37,41 $\pm$ 16,17	2,59 $\pm$ 0,40	4,34 $\pm$ 0,2	0,60 $\pm$ 0,04

Fonte: O autor (2017). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Quanto às análises histopatológicas, os resultados mostraram que os fígados dos grupos dos animais tratados com BtMeOH na dose de 2000 mg/kg apresentaram externamente uma delgada cápsula composta de tecido conjuntivo fibroso, a cápsula de Glisson, um parênquima bem desenvolvido e com uma malha vascular com vasos de vários calibres (Fig 1A e 1C). Os hepatócitos apresentaram morfologia poliédrica,

núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo (Fig.1B e 1 D), não havendo diferenças morfológicas entre o grupo controle e o grupo após 14 dias do tratamento.

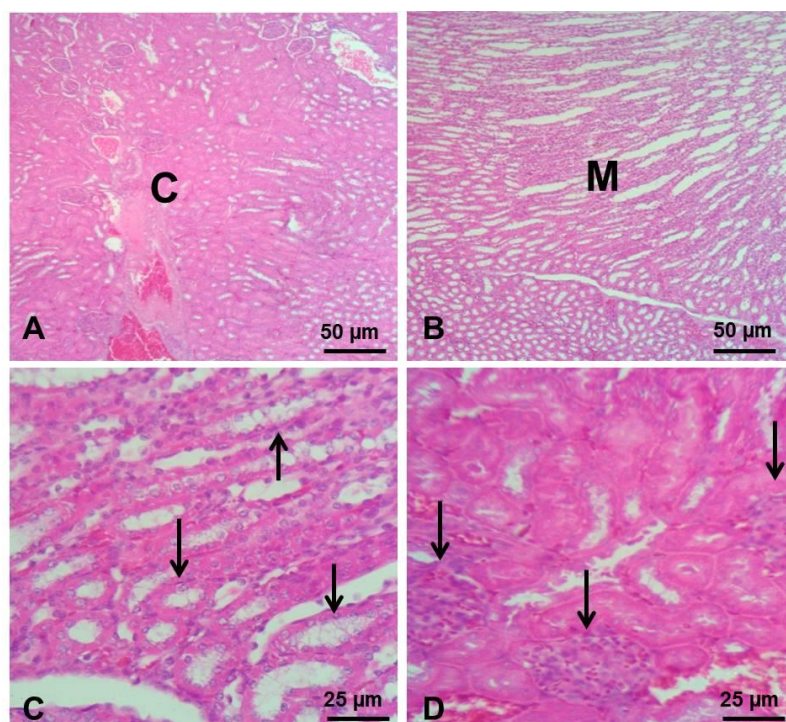
Figura 1 - Análise histológica da toxicidade do fígado 14 dias após tratamento com BtMeOH 2000mg/kg.



Fonte: O autor (2017). **A-** Fígado do grupo controle apresentando um parênquima (P) bem desenvolvido e com uma malha vascular com vasos de vários calibres (V). **B-** Hepatócitos do grupo controle com morfologia poliédrica, núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo (seta), além da presença de vasos. **C-** Fígado do grupo tratado apresentando um parênquima (P) e com vasos de vários calibres (V). **D-** Hepatócitos grupo tratado com morfologia poliédrica, núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo (seta), além da presença de vasos.

Nos resultados obtidos observou-se também que os rins de todos os grupos experimentais não demonstraram alterações morfológicas, apresentando uma região cortical bem desenvolvida (Fig 2A) e uma região medular característica (Fig. 2B). Além disso, os túbulos renais (Fig 2C) e os glomérulos estavam preservados em todos os animais analisados (Fig 2D).

Figura 2 - Análise histológica da Toxicidade dos rins 14 dias após o tratamento.

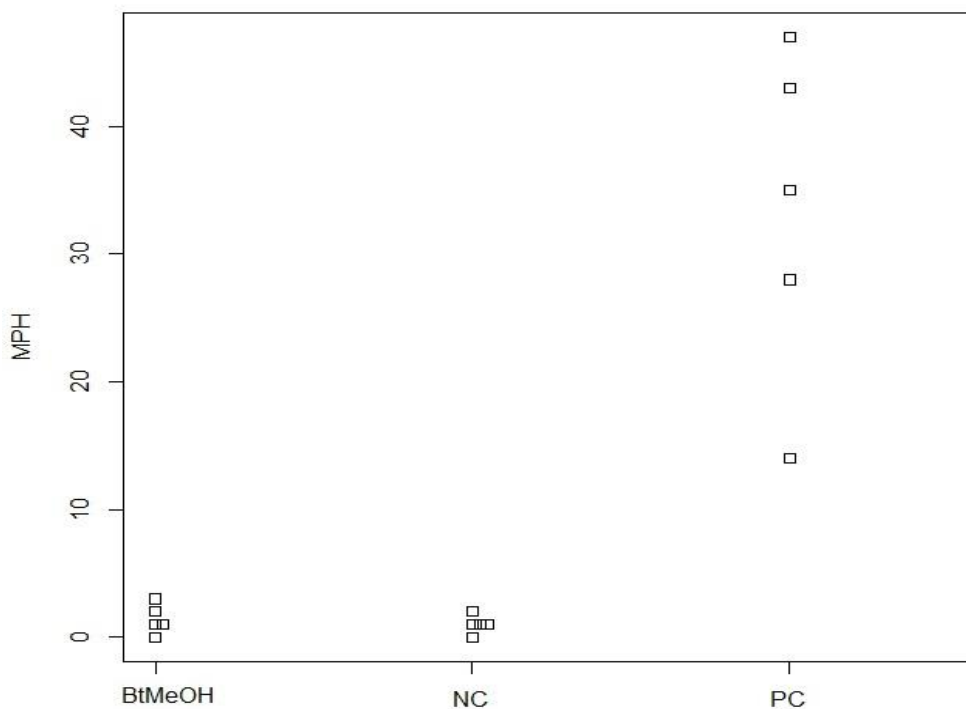


Fonte: O autor (2017). **A-** Rins do grupo controle apresentando uma região cortical bem desenvolvida (C). **B-** Rins do grupo controle apresentando uma região medular característica (M). **C-** Rins Túbulos renais do grupo tratado bem preservados (setas). **D-** Glomérulos do grupo tratado semelhantes ao grupo controle (setas).

Avaliação da genotoxicidade e mutagênese in vivo

Como não houve alta toxicidade na dose de 2000 mg/kg utilizamos tal dose para os testes de genotoxicidade e mutagênese. A figura 1 representa o número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos dos animais dos grupos controle e tratado, sacrificados após 48 horas com os tratamentos específicos. Pode ser observado que o número de eritrócitos policromáticos de BtMeOH foi semelhante ao controle negativo (>10), não havendo diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). Dessa forma, a fração BtMeOH não foi mutagênica. Entretanto, foi significativa a presença de micronúcleos nos animais tratados com ciclofosfamida (controle positivo).

Figura 3 - Avaliação da mutagenicidade in vivo de BtMeOH (2000 mg/kg b.w. v.o.) através da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MPH) murinos.



Fonte: O autor (2017). Cada ponto representa um animal (n=5) do grupo. NC: controle negativo. PC: controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg b.w. i.p.).

A genotoxicidade in vivo também foi analisada após 48 horas da administração de BtMeOH, onde verificou-se a frequência e índice de dano no DNA. Através dos resultados obtidos foi observado que não houve aumento estatisticamente significativo da FD ou ID das amostras dos animais tratados com a fração, em relação ao controle negativo (tabela 4). Já o grupo tratado com ciclofosfamida apresentou aumento dos danos no DNA, como esperado.

Tabela 3 - Resultados do teste do Ensaio Cometa (EC).

Testes	CN	BtMeOH	CP
ID	53,4 ± 3,353	62,4 ± 2,274	351 ± 3,131*
FD	28,4 ± 1,520	42,4 ± 1,252	100 ± 0*

Fonte: O autor (2017). Ensaio Cometa em sangue periférico de camundongos tratados com BtMeOH (2000 mg/kg) através da análise da do Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD). CN: controle negativo. CP: controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg b.w. i.p.). Resultados expressos em Média ± Desvio Padrão. * P < 0,05= diferença significativa com o controle negativo.

Teste de AMES e antimutagenicidade

Os dados dos testes de mutagenicidade com as cepas mutantes *S. Thyphimurium* TA97, 98 e 102 estão apresentados na tabela 5. Os resultados mostraram que na concentração de 100 mg/mL a fração BtMeOH apresentou índice mutagênico (IM) > 2.0 para TA97, indicando que a fração apresentou ação mutagênica significativa: BtMeOH_{100mg/mL} (-his9) $34,2 \pm 5,1$ (2,0) e (+ his9) $30,0 \pm 2,1$ (1,4). Na concentração de 10 mg/mL BtMeOH não houve evidência mutagênica para nenhuma das cepas testadas e, portanto, foi avaliado para o teste antimutagênico utilizando as cepas de *S. thyphimurium* TA98 e TA102. A fração BtMeOH_{100mg/mL} + NPD mostrou >40% de antimutagenicidade com 462 ± 22 cepas revertantes (42%) para TA98 (-his9), e BtMeOH_{10mg/mL} + MMC apresentou baixa antimutagenicidade com 1284 ± 20 revertantes (15%) para TA102 (-his9).

Discussão e conclusão

As plantas têm sido utilizadas para fins terapêuticos há muitos anos e seus compostos são utilizados como modelos para a síntese de muitas drogas no mundo ocidental (Kim et al., 2017; Rhalp; Helm, 1993). Estudos químicos acerca do gênero *Buchenavia* apontou a presença de flavonoides como kaempferol e epicatequina, protoantocianidinas, leucoantocianidinas, ácido quínico, taninos hidrolisáveis como ácido gálico e triterpenos (Oliveira et al., 2012; Teodoro et al., 2015; Cavalcanti et al., 2017). Em testes fitoquímicos da fração metanólica de *B. tetraphylla* realizados anteriormente pelo nosso grupo, encontramos polifenóis do grupo dos flavonoides (quercetina) e dos taninos hidrolisáveis (Silva et al., 2017). Esses metabólitos estão associados às atividades biológicas da planta como antimicrobiana frente a bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos de interesse patogênico (Oliveira et al., 2012; Cavalcanti et al., 2017).

Apesar das recentes propriedades biológicas descobertas e do uso etnomedicinal desta espécie, não há estudos acerca da sua toxicidade oral ou de outras espécies do gênero *Buchenavia*, sendo esta uma pesquisa pioneira. Entretanto, trabalhos realizados com a família Combretaceae mostram que alguns extratos ou compostos de representantes do grupo apresentam baixa toxicidade. Em análise da

toxicidade oral aguda da espécie *Conocarpus erectus*, todos os animais submetidos à dose de 2000 mg/kg sobreviveram (Nascimento et al, 2016).

Jayesh e colaboradores (2017) investigaram a toxicidade aguda oral de *Terminalia bellirica* e na dose máxima de 2000 mg/kg não houve mudanças significativas no consumo de água, ração, no peso corporal, nem alterações histológicas ou nas funções hepática e renal em relação ao grupo controle.

No nosso estudo não foram encontradas modificações histológicas no rim ou fígado do grupo tratado com BtMeOH na dose de 2000 mg/kg. Os tecidos renais não apresentaram quaisquer sinais de degeneração da cápsula de Bowman, dos glomérulos, dos túbulos contorcidos proximais ou distais. Também não foram encontradas evidências de hepatotoxicidade, como vacúolos, lesões ou necrose. Nos testes para toxicidade oral aguda foram empregados camundongos fêmeas, pois estas vêm sendo utilizadas frequentemente para determinação da DL50 devido à sua maior sensibilidade (Jayesh, 2017). A DL50 encontrada neste estudo para a fração BtMeOH segundo as diretrizes estabelecidas pelo guia OECD 423 (OECD, 2001) foi estimada acima de 2000 mg/kg. O protocolo citado não recomenda a realização de testes de toxicidade para a dose de 5000 mg/kg, devido à dificuldade de solubilização e administração, exceto nos casos de necessidade de estudo para garantir a qualidade da saúde humana.

A mutagenicidade in vitro em cepas de *S. thyphimurium* mostrou que BtMeOH foi citotóxico na concentração de 100 mg/mL para a cepa TA97 (IM>2), enquanto que em 10 mg/mL o produto foi atóxico para todas as cepas testadas. Um estudo realizado com o extrato hidroalcoólico de *Terminalia captata*, pertencete à família Combretaceae, apontou que em baixas concentrações (13,12 mg/mL) o produto induziu o aumento de cepas revertentes sem metabolização TA 97 e 100, com índice de mutagenicidade superior a 2,0 (Mininel et al., 2014). O extrato aquoso de *Cecropia pachystachya* aumentou o número de cepas revertentes TA97 sem ativação metabólica, no entanto, o mesmo não foi mutagênico para as cepas com metabolização (Mendonça et al., 2016).

Tabela 4 - Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão e índice de mutagenicidade (IM) induzida por BtMeOH na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, com as cepas TA97, TA98 e TA102 de *Salmonella typhimurium*.

Salmonella typhimurium										
Tratamento (mg/mL)		Mutagenicidade				Antimutagenicidade				
BtMeOH	TA 97		TA 98		TA 102		TA98		TA102	
(mg/mL)	- his9	+ his9	- his9	+his9	- his9	+ his9	- his9	+his9	- his9	+ his9
		119 ± 19		34 ± 1,2		390 ± 46				
10	106 ± 22 (1,3)	(1,2)	26 ± 1,5 (1,1)	(1,4)	398 ± 30 (1,0)	(1,0)	462±22	103±0,1	1284±20	98±54,32
				24 ± 1.5						
100	34,2±5,1 (2,0)*	30±2,1 (1,4)	26 ± 0.3 (1,0)	(1,0)	384,2±51 (1,1)	390±21 (1,0)	-	-	-	-
CP	747±6,4	821±9,2	789±5,1	902±7,4	970±4,9	1019±4,9	-	-	-	-
CN	108±6,4	140±9,1	43±8	20±4	170±6,4	196±9,2	-	-	-	-

CN: Controle negativo (DMSO 100 μ L/placa). CP: Controle positivo (NPD para TA97-98 e MMC como controle positivo para TA102. CONCENTRAÇÕES).

*p<0,05: diferença significativa em relação ao controle.

O teste de AMES é utilizado para avaliar se a substância é capaz de induzir mutações genéticas pontuais e específicas, pois cada linhagem é mutada de maneira diferente no operon da histidina. As cepas TA97 e 98 são capazes de detectar mutágenos que deslocamentos no quadro de leitura do DNA para –C-C-C-C-C-C +1 citosina e para –C-G-C-G-C-G-C-G-, respectivamente. Enquanto que a cepa TA102 detecta agentes indutores de pontes entre as cadeias do DNA e mutações por substituição dos pares de bases (Zhanataev et al., 2017). Yun et al (2016) estudaram o potencial mutagênico de *Artemisia capillaris* através do teste de Ames utilizando as cepas TA98, TA100 e TA102, e observou que o extrato aquoso não foi mutagênico em nenhuma das linhagens com e sem metabolização, em concentrações variando de 3,125 a 5 mg/mL.

Quando incubado com agentes mutagênicos específicos, BtMeOH apresentou percentual de antimutagenicidade de 15% (10mg/mL) para TA102 e 40% (100 mg/mL) para TA98, ambas sem metabolização. Um estudo realizado com *Camellia sinensis* mostrou que em concentrações maiores que 1mg/mL, seu extrato aquoso exibiu 40% de antimutagenicidade em relação a cepa TA98 sem metabolização (Charehsaz et al., 2017).

Mediante os resultados obtidos, podemos concluir que a fração metanólica de *B. tetraphylla* não causou alterações significativas de toxicidade quando administrado por via oral, não sendo capaz de induzir danos genéticos ou mutações em nenhum dos testes realizados *in vivo*. *B. tetraphylla* é uma importante fonte de metabólitos cuja bioatividade são relatados na literatura com frequência. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para a determinação da segurança do uso medicinal das folhas de *B. tetraphylla* pela população.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para condução de estudos não clínicos de toxologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª v. Brasília: ANVISA, p. 14, 2013.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 111, p.383- 395, 2007.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, p.14-140, 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian jornal of Pharmacognosy**, v.18, p. 472-508, 2008.
- AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, 2017.
- BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R.; CRAGG, G. M. Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. **Journal of natural products**, v. 55, n. 2, p. 207-213, 1992.
- BHAGAT, J. Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. **Journal of Applied Toxicology**, 2017.
- CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetrphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.
- CHAREHSAZ, M.; SIPAHI, H.; GIRI, A. K.; AYDIN, A. Antimutagenic and anticlastogenic effects of Turkish Black Tea on TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium* (in vitro) and mice (in vivo). **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1202-1206, 2017.
- CHENG, Z.; JIANG, J.; YANG, X.; CHU, H.; JIN, M.; LI, Y.; TAO, X.; HUANG, Y.; SHANG, L.; WU, S. The research of genetic toxicity of β -phellandrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 28-33, 2017.
- DE OLIVEIRA, A. M.; NASCIMENTO, M. F.; FERREIRA, M. R. A.; MOURA, D.F.; SOUZA, T. G. S.; DA SILVA, G. C.; RAMOS, E.H.S.; PAIVA, P.M.G.; MEDEIROS, P.L.; DA SILVA, T.G.; SOARES, L.A.L.; CHAGAS, C.A.; SOUZA, I.A.; NAPOLEÃO, T.H. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L.(Moraceae) in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 162-168, 2016.

GOUVÊA, M. M.; FERREIRA-MACHADO, S. C.; DA SILVA, T. M.; LIMA, J. S. L.; LAU, C. S. C.; ESPER, L. M. R.; MARQUES, F.F.C.; NETTO, A. D. P. Decontamination of Mikania glomerata Leaves by Gamma Irradiation: Coumarin Determination by HPLC-DAD, Microbiological Control and Genotoxicological Studies. **Planta medica**, v. 11, p. 3-13, 2012.

HAASE, A.; DOMMERSHAUSEN, N.; SCHULZ, M.; LANDSIEDEL, R.; REICHARDT, P.; KRAUSE, B. C.; TENTSCHEIT, J.; LUCH, A. Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. **Archives of Toxicology**, p. 1-17, 2017.

HAYASHI, M. et al. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

JAYESH, K.; HELEN, L. R.; VYSAKH, A.; BINIL, E.; LATHA, M. S. In vivo toxicity evaluation of aqueous acetone extract of Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. fruit. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 349-355, 2017.

KIM, W.; KANG, J.; LEE, S.; YOUN, B. Effects of traditional oriental medicines as anti-cytotoxic agents in radiotherapy. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4593-4601, 2017.

MARQUETE, N.; LOIOLA, M.I.B. **Combretaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90>. Acesso em 8 abr. 2017.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, K.; KANAYAMA, S.; NAKANO, Y.; IMAI, H.; KIBI, M.; WATANABE, T. Structures of antimutagenic constituents in the peels of Citrus limon. **Journal of Natural Medicines**, p. 1-10, 2017.

MENDONÇA, E. D.; DA SILVA, J.; DOS SANTOS, M. S.; CARVALHO, P.; PAPKE, D. K. M.; ORTMANN, C. F.; PICADA, J. M.; FERRAZ, A. D. B. F. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of Cecropia pachystachya Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **Journal of ethnopharmacology**, v. 193, p. 214-220, 2016.

MININEL, F. J.; LEONARDO JUNIOR, C. S.; ESPANHA, L. G.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from Terminalia catappa Linn.(Combretaceae) and their mutagenic activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

NASCIMENTO, D. K.; SOUZA, I. A.; OLIVEIRA, A. F. D.; BARBOSA, M. O.; SANTANA, M. A.; PEREIRA JUNIOR, D. F.; LIRA, E.C.; VIEIRA, J. R. Phytochemical Screening and Acute Toxicity of Aqueous Extract of Leaves of Conocarpus erectus Linnaeus in Swiss Albino Mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1431-1437, 2016.

OCDE. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2014. Disponível em: < <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1455135783&id=id&accname=g>

[uest&checksum=FAA3E240036470DE7F48522BC3B7FFFA](#) >. Acesso em 11 jan. 2017.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD/OCDE. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Guideline For The Testing Of Chemicals**, p. 1-14, 2001.

RALPH, J.; HELM, R. F. Lignin/hydroxycinnamic acid/polysaccharide complexes: synthetic models for regiochemical characterization. **Forage cell wall structure and digestibility**, n. foragecellwalls, p. 201-246, 1993.

REDDY, S.G.E., DOLMA, K.S.; KOUNDAL, R.; SINGH, B. Chemical composition and insecticidal activities of essential oils against diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Natural Products Research**, v. 11, p. 1-5, 2015.

ŞAHİN, S.; SAMLI, R.; TAN, A. S. B.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G.; LORENZO, J. M. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1056, 2017.

SILVA, F. C. DA, et al. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p.13-21, 2011.

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, Á. C. B.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V. L.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. **Future microbiology**, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

TRAESSEL, G. K., SOUZA DE ARAÚJO, F. H., ALMEIDA CASTRO, L. H., FREITAS DE LIMA, F., LIMA TOLOUEI MENEGATI, S. E., JUSTI, P. N.; KASSUYA, C.A.L.; CARDOSO, C.A.L.; ARGANDOÑA, E.J.S.; OESTERREICH, S. A. Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. **Journal of Medicinal Food**, 2017.

YUN, J. W.; KIM, S. H.; KIM, Y. S.; YOU, J. R.; CHO, E. Y.; YOON, J. H.; KWON, E.; AHN, J.H.; JANG, J.J; CHE, J.H; KANG, B.C.. A comprehensive study on in vitro and in vivo toxicological evaluation of *Artemisia capillaris*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 87-95, 2017.

ZHANATAEV, A. K.; EREMINA, N. V.; CHAYKA, Z. V.; KAZEY, V. I.; ANDRIANOVA, E. L.; PURMAL, A. A.; RYDKINA, E.B.; DURNEV, A. D. Genotoxicity of two new carbazole derivatives with antifungal activity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 816, p. 24-31, 2017.

4.3 EFEITO ANTI-HIPERGLICEMIANTE, ANTI-GLICAÇÃO E ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.) R.A. HOWARD

Clarissa de França Oliveira Silva¹, Dionísio Henrique Amaral da Silva², Bruno Souza dos Santos¹, Daniel Rodrigo Cavalcanti Araújo¹, Bárbara de Azevedo Ramos¹, Tiago Fonseca Silva¹, Tulio Diego Silva³, Eduardo Carvalho Lira², Márcia Vanusa Silva¹, Maria das Graças Carneiro da Cunha¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, António Vicente⁴.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

³Central Analítica, Centro de Tecnologia do Nordeste, Pernambuco, Brasil.

⁴Departamento de Biologia e Engenharia, Universidade do Minho, Portugal.

Resumo

Buchenavia tetraphylla é uma de planta utilizada de forma etnomedicinal por comunidades da região semiárida do nordeste brasileiro. Neste trabalho a fração metanólica das folhas de *B. tetraphylla* (BtMeOH) foi investigada quanto ao seu potencial anti-hiperglicemiante, anti-glicação, seu efeito protetor contra hemólise e atividade antioxidante. A avaliação da atividade anti-hiperglicêmica foi realizada através do teste de tolerância oral a glicose (OGTT), sacarose (OSucTT) e amido (OSTT). A anti-glicação foi avaliada através do modelo de co-incubação da fração com albumina do soro bovino e frutose, utilizando marcadores de glicação avançada (AGES) e precoce (frutosamina). Adicionalmente, verificamos o potencial antioxidante da fração e o seu perfil fitoquímico por HPLC. A administração oral de BtMeOH não influenciou os níveis de glicemia dos animais após a sobrecarga de glicose. No entanto, nos testes de OSucTT e OSTT, a fração retardou o pico glicêmico dos animais diabéticos de forma semelhante a acarbose. BtMeOH inibiu a formação de produtos da glicação em diferentes estágios e exerceu efeito protetor contra hemólise induzida pela albumina glicada. O perfil químico apontou a presença de flavonoides derivados de quercetina e taninos derivados de ácido elágico. BtMeOH exibiu altas concentrações de fenóis e flavonoides totais e efeitos antioxidantes, representando uma importante fonte de metabólitos que podem ser empregados para o controle da hiperglicemia e complicações do diabetes ocasionadas pelo estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Plantas medicinais; Hiperglicemia; Glicação; Estresse Oxidativo; Flavonoides.

Introdução

Diabetes *mellitus* (DM) é termo utilizado para designar um conjunto de desordens metabólicas provenientes de alterações na secreção ou ação da insulina, que afeta o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (Ahmadieh; Ghazal; Azar 2017). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), 415 milhões de adultos

apresentam a doença no mundo todo e em 2040 642 milhões de adultos sofrerão de diabetes (Ogurtsova et al., 2017).

Essa doença representa uma preocupação crescente para a saúde pública, tanto devido à sua rápida expansão, quanto aos custos onerosos associados ao tratamento e controle (SDB, 2015-2016; Trikkalinou, 2017).

Alterações na secreção e/ou na ação da insulina impede que a glicose seja captada normalmente pelos tecidos, podendo levar a um quadro de hiperglicemia crônica. Essa condição intensifica a auto-oxidação da glicose, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de produtos finais de glicação avançada (AGES) (Singh et al., 2014; Chetyrkin et al., 2011). AGES moléculas formadas por reações não enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídeos e resíduos de aminoácidos ou ácidos nucleicos (Nunthanawanich et al., 2016; Siddiqui et al., 2016). O excesso de EROS ou AGES está relacionado com a progressão do DM e suas complicações, incluindo neuropatias, nefropatias e retinopatias (Castro, 2011; Chang et al., 2016; Liu et al., 2017). Nesse sentido, vários estudos têm se empenhado em identificar compostos de origem natural, como os presentes em plantas medicinais, que exerçam efeito sobre a glicemia e que tenham efeitos antioxidantes (Kumar et al., 2014; Qin et al., 2017; Zao et al., 2017). Compostos antioxidantes são agentes que podem doar átomos de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, prevenindo ou inibindo a formação de espécies reativas, atenuando o estresse oxidativo (Moukette et al., 2017).

Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R. A. Howard, conhecida como Tanimbuca, é uma árvore de porte variável, com distribuição neotropical, pertencente à família Combretaceae. É amplamente utilizada por comunidades da região semiárida (Agra et al., 2007; Agra et al., 2008; Oliveira et al., 2012) como expectorante, antitussígeno, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza (Agra et al., 2007). Em trabalho publicado recentemente, a fração metanólica de *B. tetraphylla* mostrou atividade contra diferentes isolados clínicos de *Candida albicans*, inclusive linhagens resistentes (Cavalcanti et al., 2017).

Este estudo objetivou avaliar o potencial anti-hiperglicemiante da fração metanólica de *Buchenavia tetraphylla* em camundongos swiss albinos diabéticos, bem como determinar seu perfil antioxidante e os efeitos inibitórios sobre produtos da glicação avançada.

Materiais e métodos

Material botânico e obtenção da fração metanólica

Folhas de *B. tetraphylla* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau em novembro de 2013, herborizadas e depositadas no Herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) como espécime-testemunho de número 84.104. A obtenção da fração metanólica de *B. tetraphylla* (BtMeOH) foi realizada segundo Cavalcanti e colaboradores (2017).

Análise de BtMeOH por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A fração BtMeOH foi solubilizada em metanol e filtrada em membrana de 0,22 µm resultando em uma concentração final de 5mg/mL. Posteriormente a mesma foi analisada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, através do equipamento Agilent 1260 Infinity com bomba quaternária e degaseificador (G1311D), injetor automático (G1329B), forno de coluna (G1316A), e detector DAD (G4212B). As análises foram realizadas através de coluna Zorbax SB (C18), 4,6 x 250 mm, com pré-coluna Zorbax® (Agilent) SB-C18 5 µm e 4,6 x12,5mm, com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada usando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetona), 95%- 5% (A), 0-30 minutos, com fluxo de 2,4 mL/min. O cromatograma de trabalho foi em 256 nm com varredura completa em 190-400 nm. Foram utilizados os compostos padrões puros (Sigma Aldrich): ácido caféico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido elágico, ácido trans-ferúlico, luteolina, catequina, quercitina, rutina e geranina. A identificação de cada composto foi estabelecida por tempo de retenção e comparando o espectro UV dos picos obtidos com os previamente obtidos pela injeção dos padrões puros.

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos Swiss albinos (30±3g). Durante o experimento, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno mantidas a temperatura de 22°C ± 2°C, umidade relativa de 50 ± 5%, com ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais receberam água potável e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais obedeceram às normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro

para Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (protocolo nº 00049/2016).

Indução do diabetes em camundongos

O diabetes foi induzido nos camundongos através de uma única administração por via intraperitoneal de estreptozotocina (90mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão de citrato 0,1 mol/L (pH 4,5), após 12 horas de jejum. Os animais controle receberam apenas tampão citrato. Os camundongos que apresentaram glicemia igual ou superior a 150 mg/dl foram selecionados para o experimento.

Teste de tolerância oral à glicose (OGTT)

Após jejum noturno de 16 horas, o teste de tolerância oral à glicose foi realizado. Os camundongos foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1 (controle): Camundongos normoglicêmicos que receberam água destilada (10 mL/kg).

Grupo 2: Camundongos diabéticos tratados com flordizina (200mg/kg).

Grupo 3: Camundongos diabéticos que receberam água destilada (10 mL/kg).

Grupo 4: Camundongos diabéticos tratados com BtMeOH (500mg/kg).

Após 10 minutos de cada administração descrita, todos os grupos receberam por via oral uma dose de 1,5 mg/kg de glicose. Amostras de sangue foram coletas por punção caudal para mensuração da glicemia nos tempos 0 (antes da administração de cada tratamento), 30, 60, 90 e 120 minutos depois da administração da glicose. O nível de glicose foi determinado através glicosímetro (*On Call® Plus MedLevensohn*).

Teste de tolerância oral à sucrose (OSucTT)

O OSucTT foi realizado conforme descrito no item anterior, porém para o controle positivo foi utilizada Acarbose. Sacarose na dose de 4g/kg foi administrado no lugar da glicose.

Teste de tolerância oral ao amido (OSTT)

O OSTT foi realizado conforme descrito no item anterior, porém para o controle positivo foi utilizada Acarbose. Amido na dose de 3g/kg foi administrado no lugar da glicose.

Glicação in vitro da Albumina de Soro Bovino (BSA)

O ensaio de BSA glicada foi realizado de acordo com Adisakwattana et al (2014). Resumidamente, 10mg/mL de BSA (0.50mL) foi incubado com 0.46mL de 500mM de frutose em 100 mM de tampão-fosfato (pH 7.4), contendo 0,02% de azida sódica e 0,04mL da fração/quercetina (concentração final: 0.05-1mg/mL) a 37°C por 21 dias. A estimativa de formação de AGEs foi realizada usando um espectrofluorímetro. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para os diferentes AGEs são dados no quadro 1 (adaptado de Awasthi e Saraswathi, 2016).

Quadro 1. Comprimentos de ondas de excitação e emissão de diferentes AGEs.

Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)	Comprimento de onda de excitação (nm)	Comprimento de onda de emissão (nm)	Referências
AGEs total	350	440	Thornalley e Rabbani, 2014.
Argipiridina	320	380	Meerwaldt et al., 2005.
Vesperlisine	350	405	Meerwaldt et al., 2005.
Pentosidina	335	385	Meerwaldt et al., 2005; Bohlooli et al., 2013.
Crossline	380	440	Bohlooli et al., 2013.

Fonte: O autor (2017).

Inibição de Frutosamina

O nível de frutosamina foi mensurado pelo corante nitroblue-tetrazolium (NBT) segundo Adisakwattana, Thilavech e Chusak (2014). Resumidamente, BSA glicada (10 µL) foi incubada com 5 mM NBT (90 µL) em 100 mM de tampão carbonato (80 mL de 0.1M-Na₂CO₃ + 20mL de 0.1M-NaHCO₃), pH 10.4 a 37°C por 30 minutos. A absorbância

foi registrada a 530 nm usando espectrofotômetro. Quercetina foi utilizada como controle positivo.

Ensaio de proteção de eritrócitos

A amostra de sangue (1 ml) de voluntário foi retirada em tubo heparinizado com prévio consentimento por escrito e todo procedimento foi realizado seguindo diretrizes éticas. A capacidade de inibição da fração de *B. tetraphylla* para a hemólise de eritrócitos induzida por H₂O₂ como radical livre iniciador na presença de albumina glicada foi baseada no procedimento de Awasthi e Saraswathi (2015). Resumidamente, amostra de sangue foi centrifugada (3000 rpm, 15 min) e lavada três vezes com solução de cloreto de sódio (0,15 M). Os eritrócitos foram ressuspensos em PBS (pH 7,4) e padronizados numa suspensão a 5% para utilização nos ensaios. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de eritrócitos foi misturada a 100 µL de BSA glicada tratada (fração/quercetina) e não tratada, em seguida, adicionaram-se 25 µL de H₂O₂ (100 µM em PBS, pH 7.4) seguindo-se a incubação a 37°C durante 1 h. Os eritrócitos foram tratados com 100 µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para obter hemólise completa. A absorbância foi medida a 540 nm.

Ensaio de Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A eliminação do radical 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl pela fração foi mensurada de acordo com Blois (1958). Uma alíquota de 40µL de diferentes concentrações de fração e padrão foi adicionada a 250 µL de DPPH em metanol (100 µM) em placa de microtitulação de 96 poços. Após incubação por 25 min em ambiente escuro a 37°C, a absorbância foi determinada a 517nm usando leitor de microplaca.

Ensaio de Sequestro do Radical ABTS (2,2- azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Solução de ABTS foi preparada pela oxidação de 5 mL de ABTS (7mM) com 80 µL persulfato de potássio (140mM) durante 12-16 horas a temperatura ambiente no escuro antes do uso. ABTS (1mL) foi adicionado a tubos contendo 10 µL da fração e mixadas por vortex por 1 min. A absorbância foi mensurada a 734nm após 6 min. Trolox e BHT foram utilizados como padrões (Re et al., 1999). O percentual de atividade de

eliminação do radical foi calculado por comparação com os valores de absorbância do controle negativo (não tratado com a fração).

Ensaio do Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

Ensaio de FRAP foi realizado de acordo com o procedimento relatado por Oyaizu (1986). Resumidamente, diferentes concentrações da fração e padrão (1mL) foi misturada com 2,5mL de tampão fosfato (0.2M, pH 6.5) e 2,5mL de ferricianeto de potássio (1%). Após incubação por 30 min a 50°C, 2.5mL de ácido tricloroacético (10%) foi adicionado a cada tubo e a mistura foi centrifugada a 3500g por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e uma alíquota de 2.5mL foi misturado com 2.5mL de água destilada e 0,5mL de FeCl_3 (0.1%). A absorbância foi mensurada a 700nm. Trolox foi utilizado como padrão. Valor de EC50 corresponde a concentração da fração que equivale a absorbância de 0,5 e foi obtido por análise de regressão linear.

Inibição do Radical Superoxido pelo método de DMSO alcalino

Brevemente, 0.1 mL de solução de NBT (1 mg/mL em DMSO) foi adicionado a 0.3 mL da fração ou padrão em DMSO e 1 mL de DMSO alcalino (1 mL de DMSO contendo 0.1 mL de 5mM NaOH em água), totalizando um volume final de 1,4 mL. A mistura foi submetida a vortex por 1 min e deixada a temperatura ambiente por 20 min, em seguida a absorbância foi mensurada a 560 nm. Quercetina foi utilizada como padrão referência. (Srinivasan *et al.*, 2007).

Quantificação de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais da fração metanólico foi determinado usando reagente de Folin-Ciocalteu (Awah *et al.*, 2012). Resumidamente, 100 μL da fração foi misturado com 750 μL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em 10 vezes em água) e deixado em repouso por 22°C por 5 min, 750 μL de solução de Na_2CO_3 (60g/L) foi adicionado a mistura. Após 90 min, a absorbância foi mensurada a 725 nm. Ácido gálico foi utilizado como padrão referência para curva de calibração. O conteúdo de fenóis totais foi expresso como miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de peso seco (mg GAE/ g).

Quantificação de flavonoides

O conteúdo de flavonóides foi determinado de acordo com Awah e colaboradores (2012). Resumidamente, 100 μ L da fração em metanol foi misturado com 100 μ L tricloreto de alumínio (20% em metanol) e uma gota de ácido acético e depois diluídos com metanol até 5mL. Após 30min, a absorbância foi mensurada a 415nm. Quercetina foi usada como padrão de referência para a curva padrão e o resultado foi expresso como mg quercetina equivalente por grama de peso seco (mgQE/g).

Análise estatística

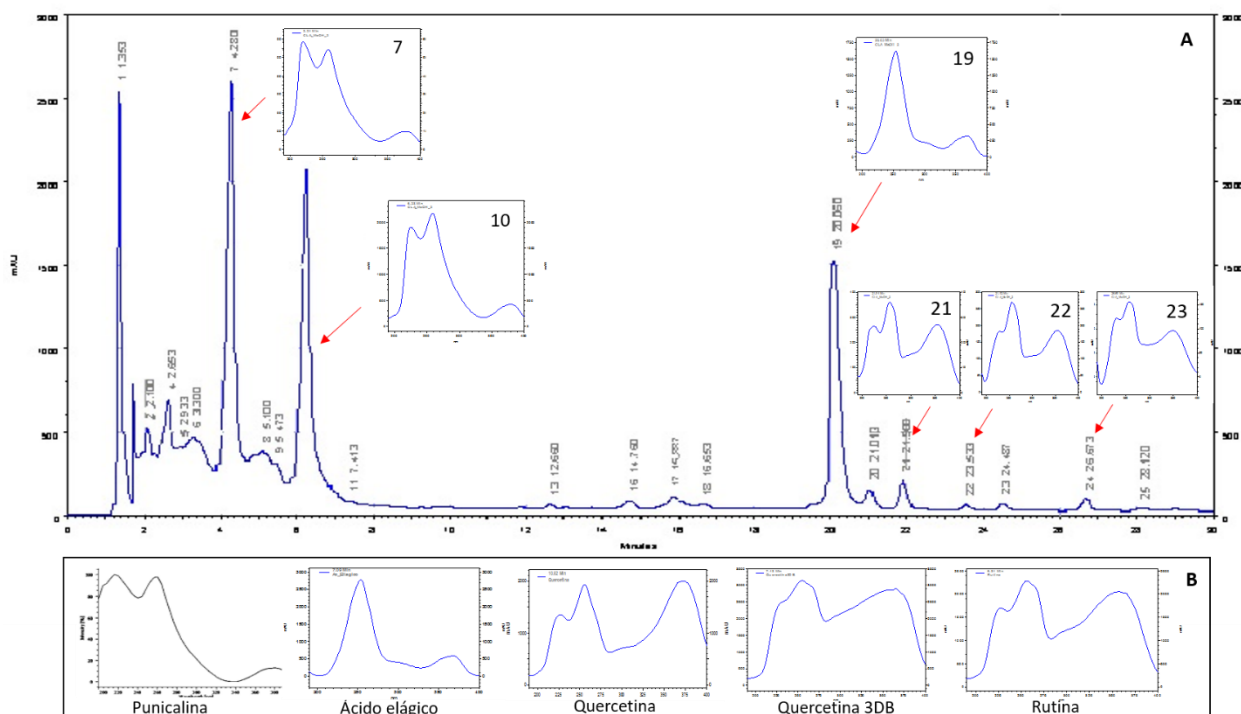
Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 5.0 ®. A diferença entre os grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA one-way e two-way), seguida pelo teste Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para os testes foi $p < 0,05$.

Resultados

Análises de BtMeOH EM HPLC

O cromatograma de BtMeOH e padrões utilizados estão representados na figura 1. Através de comparações com a literatura, observamos que a amostra de BtMeOH apresentou picos semelhantes a metabólitos do grupo dos elagitaninos, com máximos de absorção $\lambda_{\max}$ em 218, 260 e 380 nm (picos 1 e 2) em diferentes tempos de retenção tr 5,43 e tr 13,09 minutos. O pico 3 representa um espectro correspondente ao ácido elágico, entretanto, com tempo de retenção (20,03 min) diferente do padrão utilizado (tr 7,09 min) nas mesmas condições cromatográficas, sugerindo que o composto em questão é um derivado do ácido elágico. Apesar de os cromatogramas 4, 5 e 6 não coincidirem com o mesmo tempo de retenção dos padrões de flavonoides utilizados, os picos obtidos são característicos de flavonoides contendo grupos quercetínicos.

Figura 1 - A. Perfil de HPLC da fração metanólica das folhas de *B. tetraphylla*.

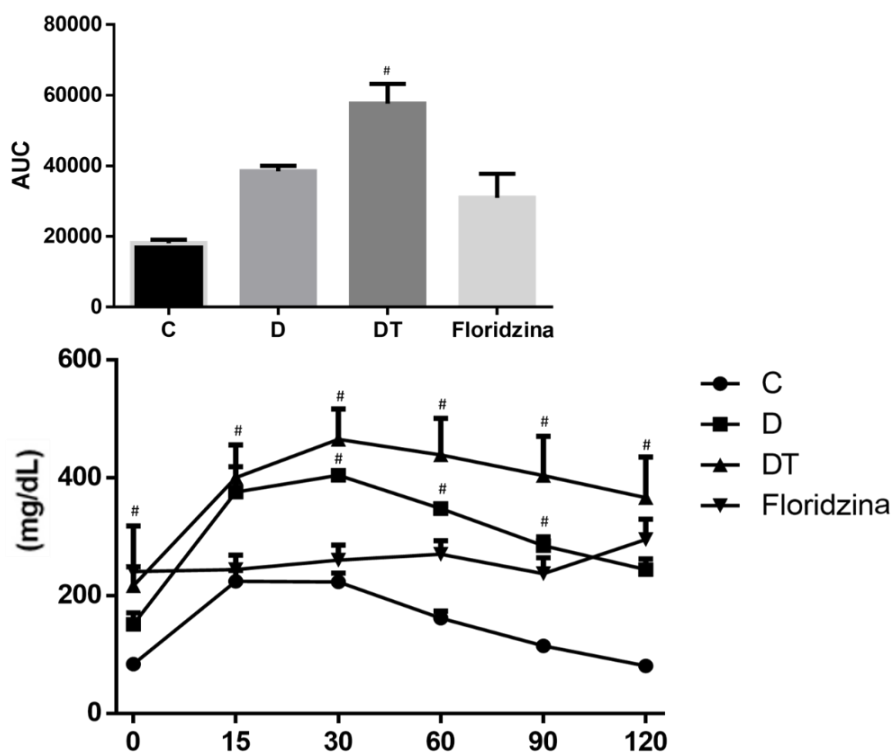


Fonte: O autor (2017). 7 e 10. Espectros correspondentes a derivados de elagitaninos. 19. Espectro corresponde a derivado de ácido elágico. 21, 22 e 23. Espectros correspondentes a flavonoides desconhecidos, característicos do grupo das quercetinas. B. Espectros dos padrões punicalina (elagitanino), ácido elágico, quercetina, quercetina glicosilada e rutina.

Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)

Os resultados dos níveis de glicemia após sobrecarga de glicose via oral estão representados na figura 2. Os animais diabéticos tiveram maior glicemia de jejum (93%) comparado com o grupo controle.

Figura 2 - Efeito da fração BtMeOH e da floridzina na glicemia durante o teste de tolerância oral à glicose (OGTT) em camundongos euglicêmicos e diabéticos.



Fonte: O autor (2017). #p < 0.05 significativo em relação ao controle (C). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média *p < 0.05 significativo em relação ao animal diabético (D).

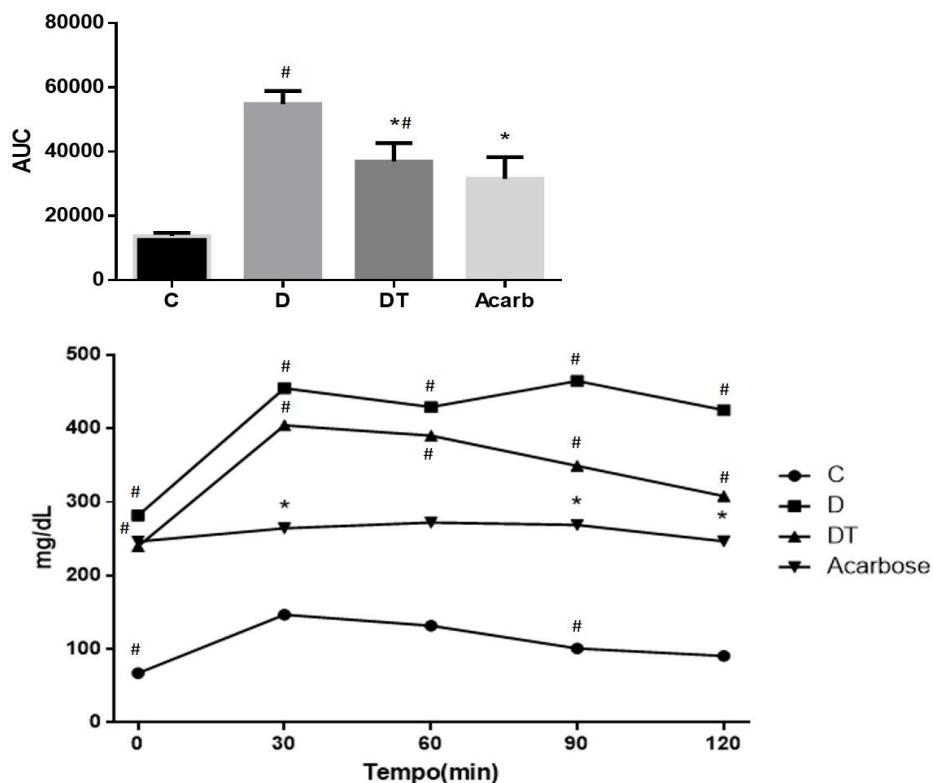
Após a sobrecarga de glicose os animais diabéticos tratados com BtMeOH apresentaram maior glicemia (~90%) em relação ao grupo não tratado (247 mg/dL) nos 30 minutos iniciais. Os níveis glicêmicos dos animais diabéticos, independente do tratamento, permaneceram elevados durante todo o experimento. O grupo controle retornou a valores basais após 90 minutos (98mg/dL). A administração da floridzina não apresentou elevação de glicemia.

A partir disso, foi calculada a área sobre a curva (AUC), que mostrou aumento de 103% no grupo diabético e 136 % no diabético tratado com BtMeOH em relação ao controle.

Teste de Tolerância Oral à Sucrose (OSucTT)

A figura 3 mostra dos efeitos de BtMeOH (500 mg/kg) nos níveis de glicose sanguínea após a sobrecarga de sucrose. A glicemia de jejum dos animais diabéticos foram ~4X superiores aos valores controle (~70 mg/dL).

Figura 3 - Efeito da fração BtMeOH e da acarbose na glicemia durante o teste de tolerância oral à sucrose (OSuTT) em camundongos euglicêmicos e diabéticos.



Fonte: O autor (2017). #p < 0.05 significativo em relação ao controle (C). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média *p < 0.05 significativo em relação ao animal diabético (D).

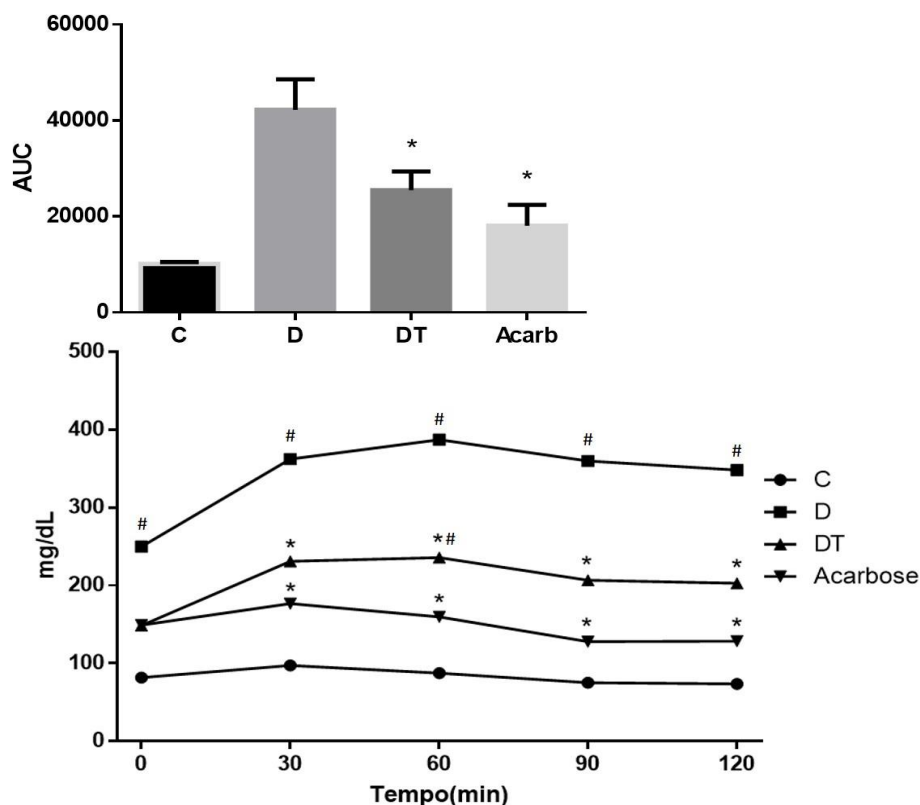
Após a sobrecarga de sacarose, os animais tratados com BtMeOH tiveram pico menor (60%) aos 30 minutos e se manteve reduzida ao longo de todo o experimento em relação aos diabéticos não tratados. O tratamento com acarbose, inibidor da α -glicosidase, não alterou a glicemia. O tratamento com MtBeOH reduziu a AUC (26,2%) em relação ao diabético não tratado, assim como apresentou valor semelhante ao grupo acarbose.

Teste de Tolerância Oral ao Amido (OSTT)

Em relação ao teste de tolerância oral ao amido, os valores médios de glicemia no tempo 0 foram de 81 mg/dL para o grupo controle, 148 mg/dL para os animais diabéticos (Figura 4). Após a sobrecarga com amido, o pico glicêmico dos animais diabéticos tratados com BtMeOH foi 40% menor aos 60 minutos em relação ao grupo

não tratado (387 mg/dL) no mesmo período. O tratamento com BtMeOH e acarbose reduziram glicemia nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos.

Figura 4 - Atividade anti-hiperglicêmica pós-pandrial de BtMeOH no Teste de Tolerância Oral ao Amido (OSTT) em camundongos euglicêmicos e diabéticos.



Fonte: O autor (2017). * $p < 0.05$ significativo em relação ao controle (C). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média # $p < 0.05$ significativo em relação ao animal diabético (D).

O tratameto com acarbose mostrou perfil semelhante ao grupo tratado com BtMeOH. O grupo diabético tratado com BtMeOH mostrou uma AUC 2 vezes menor em relação ao grupo não tratado. O grupo tratado com acarbose reduziu a glicemia em 32,5% em relação ao diabético.

Inibição da formação de Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs)

Para avaliar o efeito de BtMeOH na formação de AGEs utilizamos o modelo de glicação in vitro da albumina (BSA) mediada pela frutose. Neste ensaio a formação de AGEs foi medida pela intensidade de fluorescência conforme as características definidas previamente (quadro 1). Observamos na tabela 1, que ao fim do período de 21 dias de incubação, BtMeOH reduziu a fluorescência de todos os produtos de glicação avançada.

Tabela 1 - Percentual de inibição da formação de AGEs fluorescentes por BtMeOH.

Produtos de Glicação Avançada (AGEs)	BtMeOH (mg/mL)		Quercetina (mg/mL)
	1	0,1	0,1
Argipiridina	85.97±0.23	66.10±1.03	79.34±0.92
Vesperlisina	73.11±0.77	49.61±3.89	65.91±0.72
Pentosidina	85.34±0.24	64.26±2.01	80.76±1.10
Crossline	55.49±2.77	41.00±3.01	47.85±0.19
AGEs total	51.92±0.74	32.80±2.92	53.94±1.21

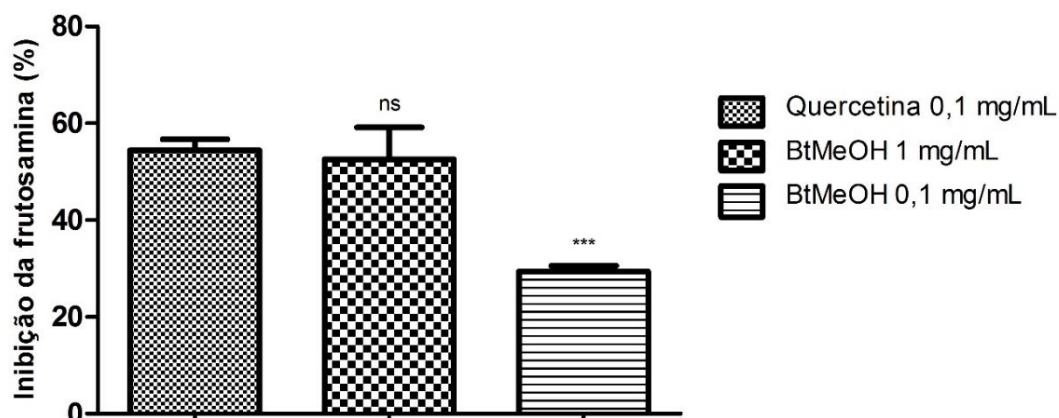
Fonte: O autor (2017). Resultados expressos em média ± desvio padrão.

O percentual de inibição para diferentes AGEs fluorescentes foi diretamente proporcional a concentração da fração BtMeOH. Na concentração de 1mg/mL com inibição variando de 55% para crossline a 85% para argipiridina (tabela 1). Com exceção do crossline, BtMeOH mostrou melhor inibição para todos os AGEs na concentração de 1mg/mL quando comparado ao padrão quercetina. Já na concentração de 0,1 mg/mL, a inibição variou de 49% (vesperlisina) a 66% (argipiridina), sendo menor que a quercetina para todos os AGEs.

Inibição de Produtos da Glicação Precoce

O efeito inibitório de BtMeOH sobre produtos da glicação precoce foi avaliada através do ensaio de frutossamina, utilizando o corante nitroazul tetrazólio. Após 21 dias de incubação, o BtMeOH na concentração de 0,1 mg/mL apresentou 29% de inibição da frutossamina, enquanto que na maior concentração (1 mg/mL) a inibição foi de 52%, próximo ao valor do padrão quercetina (54%) (Figura 5).

Figura 5 - Efeito de BtMeOH na formação de frutossamina.

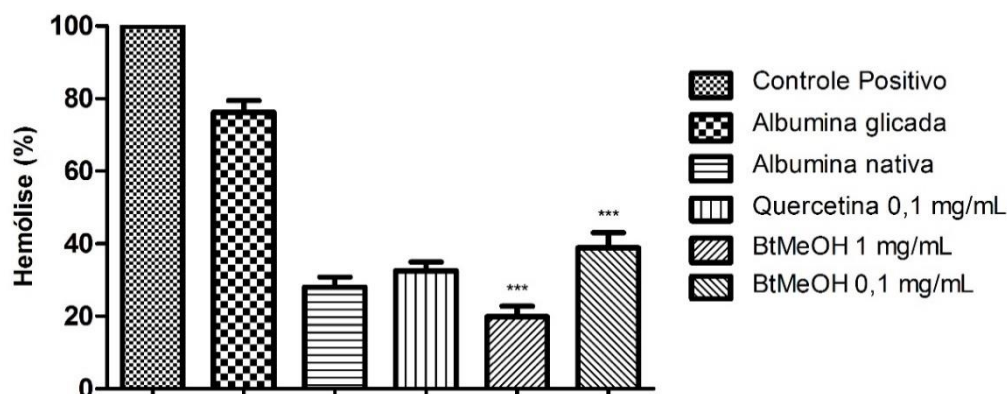


Fonte: O autor (2017). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ***p <0,05 significativo em relação ao padrão quercetina.

Efeito protetor de BtMeOH em eritrócitos humanos

Para avaliar o efeito protetor de BtMeOH contra hemólise, os eritrócitos foram incubados com albumina glicada e/ a fração em diferentes concentrações. Para obter 100% de hemólise dos eritrócitos utilizamos H₂O₂ (100 μ M). A amostra com de eritrócitos contendo apenas albumina glicada apresentou 76% de hemólise, contra 26% da albumina nativa cujas propriedades antioxidantes foram preservadas (Figura 6). Na menor concentração, BtMeOH apresentou um percentual de hemólise (38%) maior em relação à quercetina (32%) e à albumina nativa (26%). Já a amostra de eritrócitos incubados com BtMeOH a 1 mg/mL apresentou um percentual de 19% de hemólise, significativamente menor que o padrão quercetina e as amostras contendo apenas albumina glicada, sugerindo que a BtMeOH manteve os efeitos protetores da albumina.

Figura 6 - Efeito BtMeOH na prevenção da hemólise em eritrócitos.



Fonte: O autor (2017). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ significativo em relação ao padrão quercetina.

Atividades antioxidantes

Os resultados das atividades antioxidantes DHPP, ABTS, Sequestro do Radical Superóxido e FRAP são apresentados na tabela 3. Como podemos observar, a quantidade de BtMeOH necessária para reduzir a concentração de DHPP e ABTS em 50% (IC₅₀) variou de $85,46 \pm 0,67$ a $112,68 \pm 8,44$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mostrando valores maiores que o padrão Trolox e menores quando comparados ao BHT. Em relação ao sequestro do radical superóxido, BtMeOH apresentou IC₅₀ de $129,61 \pm 4,91$ $\mu\text{g/mL}$, maior que o padrão quercetina. No ensaio de FRAP a IC₅₀ de BtMeOH foi de $136 \pm 7,9$ $\mu\text{g/mL}$ contra $15,37 \pm 0,55$ $\mu\text{g/mL}$ do antioxidante Trolox.

Dosagem de fenóis e flavonoides totais

A quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais em BtMeOH foi realizada através dos métodos do Folin-Ciocalteu e de complexação em alumínio, respectivamente. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) e de quercetina (EQ) por mg de. BtMeOH apresentou concentrações de 123,03 mg EAG/mg e 108,90 mg EQ/mg, para compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antioxidante e dosagem de compostos fenólicos e flavonoides totais.

Amostras	DPPH	ABTS	Sequestro do Radical Superóxido	FRAP	Dosagem de fenóis totais	Dosagem de flavonoides totais
BtMeOH	85.46±0.67	112.68±8.44	129.61±4.91	136±7.94	123,03 ^a	108,9 ^b
Trolox	4.26±0.10	6.42±0.09	-	15.37±0.55	-	-
BHT	254.38±7.28	580±39.32	-	-	-	-
Quercetina	-	-	29.32±0.68	-	-	-

Fonte: O autor (2017). Resultados expressos em IC50 (µg/mL)- concentração mínima necessária para inibir ou sequestrar metade do radical. ^aResultados expressos em mg de Equivalente de Ácido Gálico (EAG) por g da amostra. ^bResultados expressos em mg de Equivalente de Quercetina (EQ) por g da amostra

Discussão e conclusão

Pesquisas recentes vêm buscando por novos agentes naturais com propriedades anti-hiperglicemiantes e antioxidantes, que atuem no controle da glicemia e suas complicações (Kumar et al., 2014). Nosso trabalho investigou a atividade anti-hiperglicemiante da fração metanólico de *Buchenavia tetraphylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). A STZ é um agente alquilante produzido pela bactéria *Streptomyces sachromogenes*, utilizado para indução do diabetes mellitus do tipo 1 ou 2 em animais de laboratório. Esta droga promove a destruição das células beta-pancreáticas produtoras de insulina, cuja ausência impede que a glicose seja captada normalmente pelos tecidos, culminando com hiperglicemia (Widyawati et al., 2015; Kumar et al., 2014).

Uma das formas de reduzir os níveis de glicemia após uma dieta rica em carboidratos é através da inibição da captação intestinal de glicose (Abbas et al., 2017). No intestino os monossacarídeos são co-transportados ativamente com sódio para o epitélio através do transportador SGLT1 (transportador ativo de glicose dependente do sódio) e liberados dos enterócitos para a circulação pela via GLUT2 (Satoh et al., 2015; Yusoff et al., 2015). No teste de OGTT a administração de BtMeOH (500 mg/kg) não afetou os níveis de glicose sanguínea de animais diabéticos, cujos valores de glicemia permaneceram maiores que o animal diabético e a floridzina. Como esperado, a floridzina, reduziu os níveis de glicose aos valores basais, pois atua impedindo o transporte de glicose via SGLT1 (Satoh et al., 2015). Isso indica que a fração possivelmente não atua inibindo no transporte de monossacarídeos na borda em escova.

Após a ingestão de carboidratos complexos os mesmos são quebrados em oligossacarídeos e depois em açúcares simples através das enzimas α -glucosidases e α -amilase. Assim, a inibição enzimática constitui uma das formas de controle da

hiperglicemia pós-pandrial, pois elas retardam a absorção de monossacarídeos, incrementando a ação da insulina (Alan et al., 2017; Calzada et al., 2017). Nos testes agudos de tolerância oral à sacarose e ao amido, BtMeOH reduziu os níveis de glicemia 90 minutos após a sua administração de maneira semelhante a acarbose, reconhecido como competidor de α -glucosidase intestinal (Ranjana; Tripathi, 2014). Nossos resultados sugerem que a fração pode ter retardado a absorção de açúcares simples, através da inibição de enzimas intestinais.

Pesquisas recentes têm investigado o efeito de plantas na glicemia pós-pandrial. Após sobrecarga de sacarose, o extrato etanólico das folhas de *Annona cherimola* (300 mg/kg) reduziu o nível de glicose em ratos diabéticos em 4 horas de experimento, quando comparado (Calzada et al., 2017). No mesmo sentido, Widyawati e colaboradores (2015) verificaram que o extrato metanólico de *Syzygium polyanthum* reduziu de forma significativa os níveis de hiperglicemia pós-pandriais através da inibição da absorção intestinal de glicose, efeito atribuído à presença de flavonoides, taninos, glicosídeos e alcaloides (Widyawati et al., 2015). Esses metabólitos também são conhecidos por prevenir a formação de produtos da glicação avançada (AGES) (Chang et al., 2016; Siddiqui et al., 2016). O extrato do fruto de *Punica granatum*, contendo ácido elágico e elagitaninos como punicalina e punicalagina, inibiu de forma significativa a formação de AGEs em BSA induzido por frutose (Kumagai et al., 2017). As AGES são moléculas formadas a partir da reação não enzimática entre açúcares redutores e resíduos de aminoácidos. Os produtos de glicosilação aumentam no estado de hiperglicemia e estão relacionadas a condições patológicas do diabetes (Ansari et al., 2016). Neste estudo verificamos que BtMeOH reduziu em 52% a glicação precoce da frutossamina (1mg/mL), além de inibir até 85% da formação de AGES em BSA, acima do percentual de inibição do padrão quercetina (79%).

Em triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *B. tetraphylla* realizada por Oliveira e colaboradores (2012) foram encontrados metabólitos da classe dos flavonoides (luteolina), protoantocianidinas, leucoantocianidinas, glicosídeos e tanino gálico. Em diferentes extratos orgânicos de *B. tomentosa*, foram identificados ácido gálico, ácido quínico, kaempferol, epicatequina, buchenavianine, derivados de ácido elágico eschweilenol B e C e outros taninos como punicalina, vitexina e corilagina (Teodoro et al., 2015). Nas nossas análises de HPLC foram detectados espectros correspondentes ao grupo dos elagitaninos e flavonoides derivados de quercetina e ácido elágico (Terças et al., 2017). Nossos achados corroboram resultados obtidos por

Cavalcanti e colaboradores (2017) que também identificaram polifenóis (flavonoides e taninos) na fração metanólica de *B. tetraphylla*. Esses metabólitos são frequentemente associados ao alto poder antioxidante, sendo capaz de proteger as estruturas celulares dos danos causados pelo estresse oxidativo (Cock, 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que espécies representantes da família Combretaceae apresentam atividades antioxidantes promissoras atribuídas à presença de compostos da classe dos polifenóis (Dawé et al., 2016; Viau et al., 2016). Em nossos ensaios BtMeOH apresentou conteúdo de fenóis e flavonoides totais de 123 mg/gEAG e 108 mg/gEQ respectivamente, o que pode estar relacionado ao potencial antioxidante da amostra. A fração de Buchenavia apresentou IC50 variando de 85.46 ± 0.67 µg/mL, para o teste de DHPP a 136 ± 7.94 para o FRAP. Extratos da espécie *Terminalia paniculata* apresentaram IC50 de 177.47 ± 1.63 µg/mL para o teste antioxidante do FRAP (Talwar et al., 2013). Hassan e colaboradores (2014) investigaram o potencial antioxidante de *Combretum hartmannianum* através do DHPP com IC50 variando de 14 a >1000 µg/mL. Eles correlacionaram os resultados com o conteúdo de flavonoides e fenóis totais, cujos valores encontrados variaram de 27.6 ± 0.02 mg/gEQ a 392.8 ± 0.01 mg/gEAG respectivamente. Além disso, a fração BtMeOH inibiu a hemólise de eritrócitos co-incubados com albumina glicada, confirmando os efeitos protetores de seus compostos antioxidantes.

Os resultados obtidos mostram que a fração metanólica de *B. tetraphylla* apresentou atividade anti-hiperglicemiante em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. A ação pode estar atribuída à presença de polifenóis na fração, confirmada pelas análises de HPLC, entretanto, estudos futuros são necessários para identificação dos compostos desconhecidos e entendimento do seu mecanismo de ação. A fração apresentou efeito antioxidante e retardou a hemólise de eritrócitos pela albumina glicada, além de interferir na formação de produtos da glicação, sendo um bom candidato para o tratamento do diabetes e suas complicações devido ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Q.; HASSAN, M.; RAZA, H.; KIM, S. J.; CHUNG, K. W.; KIM, G. H.; SEO, S. Y. In vitro, in vivo and in silico anti-hyperglycemic inhibition by sinigrin. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 4, p. 372-379, 2017.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, p.14-140, 2007.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian jornal of Pharmacognosy**, v.18, p. 472-508, 2008.

AHMADIEH, H., GHAZAL, N.; AZAR, S. T. Role of sodium glucose cotransporter-2 inhibitors in type I diabetes mellitus. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 10, p. 161, 2017.

ALAM, M. A.; ZAIDUL, I. S. M.; GHAFUOR, K.; SAHENA, F.; HAKIM, M. A.; RAFII, M. Y.; ABIR, H. M.; BOSTANUDIN, M.F.; PERUMAL, V.; KHATIB, A. In vitro antioxidant and, α -glucosidase inhibitory activities and comprehensive metabolite profiling of methanol extract and its fractions from *Clinacanthus nutans*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 181, 2017.

AWAH, F.M.; UZOEGWU, P.N.; IFEONU, P.; OYUGI, J.O.; RUTHERFORD, J.; YAO, X.; FEHRMANN, F.; FOWKE, K.R.; EZE, M.O. Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1279–1286, 2012.

AWASTHI, S.; SARASWATHI, N. T. Carbonyl scavenging and chemical chaperon like function of essential amino acids attenuates non-enzymatic glycation of albumin. **RSC Advances**, v. 6, n. 29, p. 24557-24564, 2016.

BOHLOOLI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; TAGHAVI, F.; MAGHAMI, P.; SABOURY, A.A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, Z.; FARHADI, M.; HONG, J.; SHEIBANI, N.; HABIBI-REZAEI, N. **International Journal Biological Macromolecules**, 2013, 62, 358 – 364.

CALZADA, F.; SOLARES-PASCASIO, J. I.; ORDOÑEZ-RAZO, R. M.; VELAZQUEZ, C.; BARBOSA, E.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, N.; LUNA, D.M.; CORREA-BASURTO, J. Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona cherimola* miller and rutin on alloxan-induced diabetic rats. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 1, p. 1, 2017.

CASTRO, E. O Papel dos Produtos Finais de Glicosilação Avançada na Nefropatia Diabética. **Arquivos de Medicina**, v. 25, n. 1, p. 27-37, 2011.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of

Buchenavia tetraphylla against Candida albicans strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

CHANG, CHIA-CHUAN; YUAN, W.; ROAN, H. Y.; CHANG, J. L.; HUANG, H. C.; LEE, Y. C.; TSAY, H. J.; LIU, H. K. The ethyl acetate fraction of corn silk exhibits dual antioxidant and anti-glycation activities and protects insulin-secreting cells from glucotoxicity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 432, 2016.

CHETYRKIN, S.; MATHIS, M.; PEDCHENKO, V.; SANCHEZ, O. A.; MCDONALD, W. H.; HACHEY, D. L.; MADU, H.; STEC, D.; HUDSON, B.; VOZIYAN, P. Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. **Biochemistry**, v. 50, n. 27, p. 6102-6112, 2011.

COCK, I. E. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus Terminalia (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 203-229, 2015.

DAWÉ, A.; TALOM, B.; KAPCHE, G. D. W. F.; SIDDIQUI, K.; YAKAI, F.; TALLA, E.; SHAIQ, M.A.; LUBNA, I.; NGADJUI, B. T. Termiglaucescin, a new polyhydroxy triterpene glucoside from Terminalia glaucescens with antioxidant and anti-inflammatory potential. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 5-6, p. 203-208, 2017.

HASSAN, L. E. A.; AHAMED, M. B. K.; MAJID, A. S. A.; BAHARETHA, H. M.; MUSLIM, N. S.; NASSAR, Z. D.; MAJID, A. M. A. Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 406, 2014.

KUMAGAI, Y.; NAKATANI, S.; ONODERA, H.; NAGATOMO, A.; NISHIDA, N.; MATSUURA, Y.; KOBATA, K.; WADA, M. Anti-Glycation effects of Pomegranate (Punica granatum L.) fruit extract and its components in vivo and in vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7760-7764, 2015.

KUMAR, V.; ANWAR, F.; AHMED, D.; VERMA, A.; AHMED, A.; DAMANHOURI, Z. A.; MISHRA, V.; RAMTEKE, P. W.; BHATT, P. C.; MUJEEB, M. leaf extract: an antihyperlipidemic, antihyperglycaemic and antioxidant activity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 76, 2014.

LIU, W.; WEI, Z.; MA, H.; CAI, A.; LIU, Y.; SUN, J.; DA SILVA, N. A.; JOHNSON, S. L.; KIRSCHENBAUM, L. J.; CHO, B. P.; DAIN, J. A.; ROWLEY, D.C.; SHAIKH, Z. A.; DAIN, J. A. Anti-glycation and anti-oxidative effects of a phenolic-enriched maple syrup extract and its protective effects on normal human colon cells. **Food & function**, v. 8, n. 2, p. 757-766, 2017.

MEERWALDT, T. R; LINKS, R.; GRAAFF, S. R.; THORPE, J. W.; BAYNES, J. HARTOG, R.; SMIT, ANN. N. Y. **Academy of Science**, 2005, 1043, 290 – 298.

MOUKETTE, B. M.; AMA MOOR, V. J.; BIAPA NYA, C. P.; NANFACK, P.; NZUFO, F. T.; KENFACK, M. A.; NGOGANG, J. Y.; PIEME, C. A. Antioxidant and Synergistic Antidiabetic Activities of a Three-Plant Preparation Used in Cameroon Folk Medicine. **International Scholarly Research Notices**, v. 2017, 2017.

NUNTHANAWANICH, P.; SOMPONG, W.; SIRIKWANPONG, S.; MÄKYNNEN, K.; ADISAKWATTANA, S.; DAHLAN, W.; NGAMUKOTE, S. Moringa oleifera aqueous leaf extract inhibits reducing monosaccharide-induced protein glycation and oxidation of bovine serum albumin. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2016.

OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U.; GUARIGUATA, L.; CHO, N. H.; D. CAVAN; J.E. SHAW; MAKAROFF, L. E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40-50, 2017.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

P. J. THORNALLEY & N. RABBANI. **Biochimica et. Biophysica Acta**, n. 1840, p. 818 – 829, 2014.

QIN, N. B.; JIA, C. C.; XU, J.; LI, D. H.; XU, F. X.; BAI, J.; LI, Z. L.; HUA, H. M. New amides from seeds of *Silybum marianum* with potential antioxidant and antidiabetic activities. **Fitoterapia**, v. 119, p. 83-89, 2017.

RANJANA; TRIPATHI, Y. B. Insulin secreting and α -glucosidase inhibitory activity of hexane extract of *Annona squamosa* Linn. in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. **Indian Journal of experimental Biology**. 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

SATOH, T.; IGARASHI, M.; YAMADA, S.; TAKAHASHI, N.; WATANABE, K. Inhibitory effect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal α -glucosidase activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 161, p. 147-155, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: 2015-2016.

SIDDIQUI, M. A.; RASHEED, S.; SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; AL-SAID, M. S.; MUSARRAT, J.; CHOUDHARY, M. I. In-Vitro dual inhibition of protein glycation, and oxidation by some Arabian plants. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 276, 2016.

SINGH, V. P.; BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Advanced glycation end products and diabetic complications. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2014.

SRINIVASAN, R. M. J. N.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; SURESH, B. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 284-291, 2007.

TALWAR, S.; NAYAK, P. G.; MUDGAL, J.; PAUL, P.; BANSAL, P.; NANDAKUMAR, K. Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo analgesic potential of Terminalia paniculata aqueous bark extract. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 12, p. 1153-1161, 2013.

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, Á. C. B.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V. L.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from Buchenavia tomentosa on Candida albicans and non-albicans. **Future microbiology**, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

TERÇAS, A. G.; DE SOUZA MONTEIRO, A.; MOFFA, E. B.; DOS SANTOS, J. R.; DE SOUSA, E. M.; PINTO, A. R.; COSTA, P.C.S.; BORGES, A.C.R.; TORRES, L.M.B.; ALLAN K. D. BARROS FILHO. Phytochemical Characterization of Terminalia catappa Linn. Extracts and Their antifungal Activities against Candida spp. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

TRIKKALINOU, A.; PAPAZAFIROPOULOU, A. K.; ANDREAS MELIDONIS, A. Type 2 diabetes and quality of life. **World Journal of Diabetes**, v. 8, n. 4, p. 120, 2017.

VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; PFLÜGER, P.; FACUNDO, V. A.; SAFFI, J. Structural aspects of antioxidant and genotoxic activities of two flavonoids obtained from ethanolic extract of Combretum leprosum. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

WIDYAWATI, T.; YUSOFF, N. A.; ASMAWI, M. Z.; AHMAD, M. Antihyperglycemic effect of methanol extract of syzygium polyanthum (wight.) leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 7764-7780, 2015.

ZHAO, J. Q.; WANG, Y. M.; YANG, Y. L.; ZENG, Y.; MEI, L. J.; SHI, Y. P.; TAO, Y. D. **Food Chemistry**, v. 230, p. 117-124, 2017.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- As análises químicas demonstraram que a fração metanólica de *Buchenavia tetraphylla* apresentou flavonoides e taninos hidrolisáveis de grande importância biológica;
- BtMeOH inibiu isolados clínicos de *Escherichia coli*, induzindo importantes alterações morfológicas nas células tratadas, mas não foi bactericida;
- Através do ensaio de citotoxicidade pode-se constatar que a concentração mais segura para uso da fração metanólica em culturas celulares é abaixo de 25 µg/mL, pois acima desta concentração o produto induziu apoptose ou necrose em esplenócitos murinos;
- Na concentração de 10 µg/mL, o produto estimulou a produção de citocinas envolvidas em processos de cicatrização;
- Em testes *in vivo* realizados na concentração de 2000 mg/kg, BtMeOH não apresentou toxicidade, nem foi mutagênico ou genotóxico;
- A fração foi mutagênica para frente a cepa TA097 de *Salmonella typhimurium* na concentração de 100mg/mL, e atóxico para as demais linhagens testadas na concentração de 10 e 100mg/mL. A fração também apresentou potencial antimutagênico;
- A fração metanólica apresentou ainda potencial antioxidante e anti-glicação inibindo a ligação da glicose à albumina; além disso apresentou efeito protetor contra hemólise de eritrócitos co-incubados com albumina glicada;
- O produto foi anti-hiperglicemiante, reduzindo os níveis de glicose em testes de tolerância à sacarose e amido em animais diabéticos, na dose de 500 mg/kg;
- *Buchenavia tetraphylla* se mostrou um potente agente frente a testes biológicos variados, sendo forte candidato a modelo para produção de fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. São Paulo: Revinter, 2003. ISBN 85-7309-729-9.
- ACHARYYA, S.; SARKAR, P.; SAHA, D. R.; PATRA, A.; RAMAMURTHY, T.; BAG, P. K. Intracellular and membrane-damaging activities of methyl gallate isolated from *Terminalia chebula* against multidrug-resistant *Shigella* spp. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 8, p. 901-909, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª v. Brasília: ANVISA, p. 14, 2013.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 111, p.383- 395, 2007.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, p.14-140, 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian jornal of Pharmacognosy**, v.18, p. 472-508, 2008.
- AHMADIEH, H.; GHAZAL, N.; AZAR, S. T. Role of sodium glucose cotransporter-2 inhibitors in type I diabetes mellitus. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 10, p. 161, 2017.
- AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Acta biochimica Polonica**, 2017.
- AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Acta biochimica Polonica**. v.64, n. 1374, 2017.
- ALBUQUERQUE, U. P. D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALI KHAN, M. S.; NAZAN, S.; MAT JAIS, A. M. Flavonoids and antioxidant activity mediated gastroprotective action of Leathery Murdah, *Terminalia coriacea* (Roxb.) Wight & Arn. Leaf methanolic extract in rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2017.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 33, n. 1, p. 62-69, 2010.

ANYANWU, M. U.; OKOYE, R. C. Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 240, 2017.

ARSHAD, L.; HAQUE, M. A.; ABBAS BUKHARI, S. N.; JANTAN, I. An overview of structure–activity relationship studies of curcumin analogs as antioxidant and anti-inflammatory agents. **Future Medicinal Chemistry**, n. 0, 2017.

ASIF, M. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. **Journal of education and health promotion**, v. 3, n. 1, p. 1, 2014.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, 2017.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A., DAGLIA, M., SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44-68, 2017.

BARONE, B.; RODACKI, M.; CENCI, M. C. P.; ZAJDENVERG, L.; MILECH, A.; DE OLIVEIRA, J. E. P. Cetoacidose diabética em adultos – atualização de uma complicação antiga. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**, v. 51, p. 9, 2007.

BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4567-4598, 2011.

BATI, K.; KWAPE, T.E.; CHATURVEDI, P. Anti-Diabetic Effects of an Ethanol Extract of Cassia abbreviata Stem Bark on Diabetic Rats and Possible Mechanism of Its Action:-Anti-diabetic Properties of Cassia abbreviata. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 20, n. 1, p. 45, 2017.

BHAGAT, J. Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. **Journal of Applied Toxicology**, 2017.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 1, p. a009191, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRUNING, M.C.R.; BITTENCOURT, G. M.; VIANNA, M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios

de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, 2012.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

a), A.; KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology**, v. 64, n. 1, p. 57-80, 2014.

CHOI, J. H.; JO, S. G.; JUNG, S. K.; PARK, W. T.; KIM, K. Y.; PARK, Y. W.; PARK, J. H. Immunomodulatory effects of ethanol extract of germinated ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). **Laboratory Animal Research**, v. 33, n. 1, p. 32-39, 2017.

COOLS, T. L.; STRUYFS, C.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. **Future Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 441-454, 2017.

DAWÉ, A.; TALOM, B.; KAPCHE, G. D. W. F.; SIDDIQUI, K.; YAKAI, F.; TALLA, E.; SHAIQ, M.A.; LUBNA, I.; NGADJUI, B. T. Termiglaucescin, a new polyhydroxy triterpene glucoside from *Terminalia glaucescens* with antioxidant and anti-inflammatory potential. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 5-6, p. 203-208, 2017.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, 2014.

DE OLIVEIRA, A. M.; NASCIMENTO, M. F.; FERREIRA, M. R. A.; MOURA, D.F.; SOUZA, T. G. S.; DA SILVA, G. C.; RAMOS, E.H.S.; PAIVA, P.M.G.; MEDEIROS, P.L.; DA SILVA, T.G.; SOARES, L.A.L.; CHAGAS, C.A.; SOUZA, I.A.; NAPOLEÃO, T.H. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L.(Moraceae) in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 162-168, 2016.

DE SIQUEIRA PATRIOTA, L. L.; PROCÓPIO, T. F.; DE SANTANA BRITO, J.; SEBAG, V.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; DE ARAÚJO SOARES, A. K.; MOREIRA, T. A. L.; SOARES, T. S.; SILVA, T. D.; PAIVA, P. M. G.; LORENAC, V. M. B. L.; MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, L. P.; NAPOLEÃO, T. H. N. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

DE VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

DINDA, B.; DINDA, S.; DASSHARMA, S.; BANIK, R., CHAKRABORTY, A.; DINDA, M. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 31, p. 68-80, 2017.

DOURADO, R. S. Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.). **Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo**, 2006.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L. D.; BENSEÑOR, I. J. M.; MILL, J. G.; SCHMIDT, M. I.; LOTUFO, P. A.; VIGO, A.; BARRETO, S. M. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de saúde pública; Journal of public health**. v. 46, n. 1, p. 126-134, 2012.

DUTIL, C.; CHAPUT, J. P. Inadequate sleep as a contributor to type 2 diabetes in children and adolescents. **Nutrition & Diabetes**, v. 7, n. 5, p. e266, 2017.

FANTON, J. C. M.; RICARDI-BRANCO, F.; SILVA, A. M. *Terminalia palaeopubescens* sp. nov. (Combretaceae) da Formação Fonseca (Eoceno/Oligoceno) de Minas Gerais, Brasil: morfologia foliar, fungos epifílicos associados e paleoclima. **Ameghiniana**, v. 49, n. 3, p. 273-288, 2012.

FONSECA, C., S.; QUEIROZ, E. D.; VENTUROLI, F. **Identificação de espécies florestais na Escola de Agronomia da UFG**. Goiânia, Fábio Venturoli, p. 70, 2017.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI V. L. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 723-726, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A.; BORIN, M. R. **Biodiversidade um Enfoque Químico-biológico**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996.

GOUVÊA, M. M.; FERREIRA-MACHADO, S. C.; DA SILVA, T. M.; LIMA, J. S. L.; LAU, C. S. C.; ESPER, L. M. R.; MARQUES, F.F.C.; NETTO, A. D. P. Decontamination of *Mikania glomerata* Leaves by Gamma Irradiation: Coumarin Determination by HPLC-DAD, **Microbiological Control and Genotoxicological Studies. Planta medica**, v. 11, p. 3-13, 2012.

GUTIÉRREZ-RODELO, C.; ROURA-GUIBERNA, A.; OLIVARES-REYES, J. A. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. **Gaceta Médica de México**, p. 153, 2017.

HAASE, A.; DOMMERSHAUSEN, N.; SCHULZ, M.; LANDSIEDEL, R.; REICHARDT, P.; KRAUSE, B. C.; TENTSCHERT, J.; LUCH, A. Genotoxicity testing

of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. **Archives of Toxicology**, p. 1-17, 2017.

HINMAN, R. M.; SMITH, M. J.; CAMBIER, J. C. B cells and type 1 diabetes... in mice and men. **Immunology letters**, v. 160, n. 2, p. 128-132, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas 7th edition**. Disponível em: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/20-atlas-5th-edition>. Acesso em: 20 de maio de 2017.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; CAIXETA, D. C.; DE SOUZA, A. V.; TEIXEIRA, R. R.; SILVA, H. C. G.; MOURA, F. B. R.; MORAES, I. B.; ESPINDOLA, F. S. Hepatoprotective properties of a polyphenols-enriched fraction from *Annona crassiflora* Mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.

KANEKO, K.; SATAKE, C.; YAMAMOTO, J.; TAKAHASHI, H.; SAWADA, S.; IMAI, J.; YAMADA, T.; KATAGIRI, H. A case of idiopathic type 1 diabetes with subsequent recovery of endogenous insulin secretion despite initial diagnosis of fulminant type 1 diabetes. **Endocrine Journal**, v.3, n.64, p. 369-364, 2017.

KAPOOR, D.; VIJAYVERGIYA, R.; DHAWAN, V. Terminalia arjuna in coronary artery disease: Ethnopharmacology, pre-clinical, clinical & safety evaluation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1029-1045, 2014.

KUMAR, G.; TULI, H. S.; MITTAL, S.; SHANDILYA, J. K.; TIWARI, A.; SANDHU, S. S. **Tumor Biology**. v.36, p. 4005, 2015.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. Robbins & Cotran. **Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

LAMY, PIERRE-JEAN; SAULT, CORINNE; RENARD, ERIC. Une interférence dans le dosage de l'insuline révèle un syndrome auto-immun anti-insuline. In: **Annales de Biologie Clinique**. p. 490-494, 2016.

LEE, D. Y.; KIM, H. W.; YANG, H.; SUNG, S. H. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Terminalia chebula* Retz and their α -glucosidase inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 137, p. 109-116, 2017.

LEE, J.; MIYAZAKI, M.; ROMEO, G. R.; SHOELSON, S. E. Insulin receptor activation with transmembrane domain ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 28, p. 19769-19777, 2014.

LIU, X.; XIE, J.; JIA, S.; HUANG, L.; WANG, Z.; LI, C.; XIE, M. Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW264. 7. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 576-581, 2017.

LOIOLA, M. I. B.; ROCHA, E. A.; BARACHO, G. S.; AGRA, M. D. F. Flora of Paraíba, Brazil: Solanum L., Solanaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 330-342, 2009.

LOPES, D.; MARUO, V. Toxicidade de Buchenavia tomentosa—revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2015.

LUCHS, A. Transdução de sinal: um olhar sobre a insulina. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 3, p. 157-164, 2006.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, p. 177-189, 2006.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI M.; NABAVI, S. M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-22, 2017.

MARQUETE, N.; LOIOLA, M.I.B. Combretaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90>>. Acesso em 10 mar, 2016.

MARQUETE, N.; LOIOLA, M.I.B. **Combretaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6892>>. Acesso em 15 dez, 2017.

MATEEVA, N.; EYUNNI, S. V.; REDDA, K. K.; ONONUJU, U.; HANSBERRY, T. D.; AIKENS, C.; NAG, A. Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2350-2356, 2017.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Ed 3. UFC, 2009.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, K.; KANAYAMA, S.; NAKANO, Y.; IMAI, H.; KIBI, M.; WATANABE, T. Structures of antimutagenic constituents in the peels of Citrus limon. **Journal of Natural Medicines**, p. 1-10, 2017.

MENON, S.; RAJESH, G.; BALAKRISHNAN, V. Pancreas and Diabetes Mellitus: The Relationship between the Organ and the Disease. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 63, p. 51, 2015.

MESQUITA, J.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; ALEXANDRE, W. S. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVINEL, W. M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**. p. 66-81, 2008.

MOHAMMAD, F.; HASAN, W. A.; MOHAMED, E. G. Natural antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation; inhibition of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 2017.

MORIKAWA, T.; MATSUDA, H.; & YOSHIKAWA, M. A. Review of Anti-inflammatory Terpenoids from the Incense Gum Resins Frankincense and Myrrh. **Journal of Oleo Science**, p. 16149, 2017.

MOUKETTE, B. M.; AMA MOOR, V. J.; BIAPA NYA, C. P.; NANFACK, P.; NZUFO, F. T.; KENFACK, M. A.; NGOGANG, J. Y.; PIEME, C. A. Antioxidant and Synergistic Antidiabetic Activities of a Three-Plant Preparation Used in Cameroon Folk Medicine. **International Scholarly Research Notices**, v. 2017, 2017.

MURAYYAN, A. I.; MANOHAR, C. M.; HAYWARD, G.; NEETHIRAJAN, S. Antiproliferative activity of Ontario grown onions against colorectal adenocarcinoma cells. **Food Research International**, v. 96, p. 12-18, 2017.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy reviews**, v. 1, n. 1, p. 69, 2007.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**, 2016.

OLIVEIRA, C. M. B. D.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 2011.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

PANDEY, S.; CABOT, P. J.; SHAW, P. N.; HEWAVITHARANA, A. K. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Carica papaya*. **Journal of Immunotoxicology**, v. 13, n. 4, p. 590-602, 2016.

PARRA-NARANJO, A.; DELGADO-MONTEMAYOR, C.; FRAGA-LÓPEZ, A.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; SALAZAR-ARANDA, R.; ACEVEDO-FERNÁNDEZ, J. J.; WAKSMAN, N. Acute Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of Teuhetenone A Isolated from *Turnera diffusa*. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 599, 2017.

PESSOA, FERNANDO. **Poemas de Alberto Caeiro**, 7ª edição, Lisboa, Ática, 1979.

PRASAD, B. K.; PRASAD, S.; ROHIT; SUPRIYA. Diabetes Mellitus. **Internacional Journal of pharmacy and pharmaceutical research**. v. 6, 2016.

PUTRI, D. U.; RINTISWATI, N.; SOESATYO, M. H.; HARYANA, S. M. Immune modulation properties of herbal plant leaves: *Phyllanthus niruri* aqueous extract on immune cells of tuberculosis patient-in vitro study. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2017.

- RASOULI, H.; HOSSEINI-GHAZVINI, S. M. B.; ADIBI, H.; KHODARAHMI, R. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. **Food & Function**, 2017.
- RIDKER, P. M.; LÜSCHER, T. F. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. **European heart journal**, v. 35, n. 27, p. 1782-1791, 2014.
- SADOWSKA, B.; MICOTA, B.; RÓŻALSKI, M.; REDZYNIA, M.; RÓŻALSKI, M. The immunomodulatory potential of Leonurus cardiaca extract in relation to endothelial cells and platelets. **Innate Immunity**, v. 23, n. 3, p. 285-295, 2017.
- ŞAHIN, S.; SAMLI, R.; TAN, A. S. B.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G.; LORENZO, J. M. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1056, 2017.
- SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 27, p. 3, 2017.
- SANTOS, M. A. S.; OLIVEIRA, M. M. D.; ANDRADE, S. S. C. D. A.; NUNES, M. L.; MALTA, D. C., & MOURA, L. D. Tendências da morbidade hospitalar por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2002 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 3, p. 389-398, 2015.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.
- SERNA, D. M. O.; MARTÍNEZ, J. H. I. Phenolics and polyphenolics from melastomataceae species. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17818-17847, 2015.
- SHAKYA, P.; MARSLIN, G.; SIRAM, K.; BEERHUES, L.; FRANKLIN, G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of Hypericum perforatum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.
- SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de Eugenia uniflora L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.
- SILVA, F. C. da, et al. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**. v.2, n.1, p.13-21, 2011.
- SILVA, L. P.; DE ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MININEL, F. J.; DOS SANTOS, L. C.; Dellela F. K.; FELISBINO, S. L.; VILEGAS, W.; DA ROCHA, R. M.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; BAUAB, T. M.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C.

A. A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-Helicobacter pylori and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015.

SLOBODNÍKOVÁ, L.; FIALOVÁ, S.; RENDEKOVÁ, K.; KOVÁČ, J.; MUČAJI, P. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1717, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: 2015-2016.

SOUZA, A. L. G. D.; FERREIRA, M. C. R.; MIRANDA, L. R. D.; SILVINO, R. C. D. A. S.; LORENZO, N. D.; CORREA, N. C. F.; SANTOS, O. V. D. Aproveitamento nutricional e tecnológico dos frutos da castanhola (*Terminalia catappa* Linn.). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 3, p. 23-29, 2016.

SUGAWARA, T.; KANO, F.; MURATA, M. Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro) insulin in insulin-secreting cells. **Scientific reports**, v. 4, 2014.

STRASSER, B.; PESTA, D. Resistance training for diabetes prevention and therapy: experimental findings and molecular mechanisms. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

TAFESSE, T. B.; HYMETE, A.; MEKONNEN, Y.; TADESSE, M. Antidiabetic activity and phytochemical screening of extracts of the leaves of *Ajuga remota* Benth on alloxan-induced diabetic mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 243, 2017.

TAN, W. D.; LIAO, W.; ZHOU, S.; WONG, W. F. Is There A Future for Andrographolide To Be An Anti-inflammatory Drug? Deciphering Its Major Mechanisms of Action. **Biochemical Pharmacology**, 2017.

TANIGUCHI, M.; MORI, N.; IRAMINA, C.; YASUTAKE, A. Elevation of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity Induced by Amplified Insulin Response in Low Glutathione Levels in Rat Liver. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

TENGHOLM, A.; GYLFE, E. cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. **Diabetes, obesity and metabolism**, 2017.

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, Á. C. B.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V. L.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. **Future microbiology**, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

TRIKKALINOU, A.; PAPAZAFIROPOULOU, A. K.; ANDREAS MELIDONIS, A. Type 2 diabetes and quality of life. **World Journal of Diabetes**, v. 8, n. 4, p. 120, 2017.

VERDAM, M. D. S.; SILVA, C. D. O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010.

VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; PFLÜGER, P.; FACUNDO, V. A.; SAFFI, J. Structural aspects of antioxidant and genotoxic activities of two flavonoids obtained from ethanolic extract of *Combretum leprosum*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

VON LINSINGEN, L.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na região sul do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 738-750, 2009.

WAZIR, A.; SHERWANI, S. K.; AHMAD, M. Antibacterial, Antifungal and antioxidant activities of some medicinal plants. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v.27, n. 6, p. 2145-2152, 2014.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. **International journal of medical sciences**, v. 11, n. 11, p. 1185, 2014.

XIAO, X.; CLARK, J. M.; PARK, Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.

YE, L.; MAJI, S.; SANGHERA, N.; GOPALASINGAM, P.; GORBUNOV, E.; TARASOV, S.; EPSTEIN, O.; KLEIN-SEETHARAMAN, J. Structure and dynamics of the insulin receptor: implications for receptor activation and drug discovery. **Drug Discovery Today**, 2017.

ZHANATAEV, A. K.; EREMINA, N. V.; CHAYKA, Z. V.; KAZEY, V. I.; ANDRIANOVA, E. L.; PURMAL, A. A.; RYDKINA, E.B.; DURNEV, A. D. Genotoxicity of two new carbazole derivatives with antifungal activity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 816, p. 24-31, 2017.

ZHONG, X.; SHI, Y.; CHEN, J.; XU, J.; WANG, L.; BEIER, R. C.; HOU, X.; LIU, F. Polyphenol extracts from *Punica granatum* and *Terminalia chebula* are anti-inflammatory and increase the survival rate of chickens challenged with *Escherichia coli*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 10, p. 1575-1582, 2014.

ANEXO A- PARECER COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 24/17

Recife, 10 de abril de 2017.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. **Maria Tereza dos Santos Correia**
Departamento de Bioquímica
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0049/2016**

Certificamos que a proposta intitulada "**Isolamento, caracterização estrutural e potencial farmacológico de metabólitos secundários de Buchenavia Tetraphlla**" registrada com o nº0049/2016 sob a responsabilidade de Prof.ª **Maria Tereza dos Santos Correia** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/11/2016 a 20/11/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo albino e Camundongo Swiss
Nº de animais	105 (90 Swiss e 15 Balb/c)
Peso/Idade	Swiss: 28-30g 60-90 dias e Balb/c 25g/60-90 dias
Sexo	Macho: 70 Swiss/ 15Balb/c e Fêmeas: 20Swiss
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos.

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

