



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CARINE NUNES DE ALMADA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE AZEITONA DA TERRA
(*Syzygium cumini* L.) E SEU EFEITO CONTRA ESTRESSE INDUZIDO POR PARACETAMOL**

FORTALEZA

2013

CARINE NUNES DE ALMADA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE AZEITONA DA TERRA
(*Syzygium cumini* L.) E SEU EFEITO CONTRA ESTRESSE INDUZIDO POR PARACETAMOL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Co-orientadora: Prof. Dra. Erika Freitas Mota

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A442a Almada, Carine Nunes de.
Atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini* L.) e seu efeito contra estresse induzido por paracetamol / Carine Nunes de Almada. – 2013.
88 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Bioquímica.
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
Coorientação: Prof. Dra. Erika Freitas Mota.
1. Antioxidantes. 2. *Syzygium jambolanum*. 3. Fitoquímicos. 4. Acetaminofen. 5. Química vegetal.
6. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 574.192

CARINE NUNES DE ALMADA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE AZEITONA DA TERRA
(*Syzygium cumini* L.) E SEU EFEITO CONTRA ESTRESSE INDUZIDO POR PARACETAMOL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Erika Freitas Mota (Co-Orientadora)

Universidade Federal do Ceará–UFC



Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan

Universidade Federal do Ceará – UFC



Dra. Neuza Felix Gomes

Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença em minha vida, sempre guiando, iluminando e abençoando os meus caminhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo por ter acreditado em mim e me acolhido tão bem por todos esses anos, pelo incentivo, paciência, carinho, atenção, interesse e dedicação à orientação desse trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Erika Freitas Mota, pelo apoio, ajuda, ensinamentos, interesse e auxílio neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan pelo apoio, confiança e valiosas sugestões e por ter fornecido o extrato etanólico de folhas de azeitona da terra. Além de ter me recebido tão bem e disponibilizado o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC e também por ter aceitado o convite para participar desta banca.

À Profa. Dra. Ana Claudia Marinho da Silva por sua ajuda essencial, apoio, atenção, incentivo e amizade.

À Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro pelas sugestões e ajuda neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara de Miranda por sua colaboração e disponibilização do Laboratório de Fisiologia dos Frutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

À Dra. Neuza Felix Gomes por ser sempre tão atenciosa, estando sempre disposta a ajudar, por suas valiosas contribuições, por sua amizade e por ter aceitado o convite para participar desta banca.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que contribuíram de certa forma para a realização desse trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica e do Laboratório de Fisiologia dos Frutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC pela ajuda, atenção e gentileza.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioenergética, pelos conhecimentos compartilhados, colaboração e amizade. Em especial, a todos os amigos do grupo da Imunologia (Albert, Andresiane, Beatriz, Camila, Dalton, Deborah, Francisca, Geórgia, Joanna, Lívia, Michelle, Nayara e Samilly) por todo o carinho, amizade, companheirismo, ajuda, força e pelos bons momentos passados juntos.

Às minhas amigas Bruna e Jessika, pelo companheirismo e amizade, estando presentes nos momentos difíceis e por acompanharem também as conquistas e alegrias.

Aos meus pais Raimundo e Silvana, pelo amor incondicional, pela educação e pelo apoio incansável.

Às minhas queridas irmãs Carol e Camila pelo amor, amizade, cumplicidade, apoio, compreensão, carinho, paciência, incentivo, confiança e por sempre torcerem por mim.

À toda a minha família e amigos, pela torcida e por sempre terem acreditado em mim.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante todo o curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Se você pode sonhar, você pode fazer.”

Walt Disney

RESUMO

Syzygium cumini é uma planta originária da Índia e adaptada ao Brasil, popularmente conhecida como azeitona da terra, ameixa preta, jambolão e jamun. Neste estudo, as atividades antioxidantes e protetoras do extrato etanólico (EE) de folhas de azeitona da terra foram avaliadas contra danos induzidos por paracetamol no fígado de camundongos. A atividade antioxidante total foi determinada através dos métodos ABTS e DPPH e os teores de vitamina C, polifenóis extraíveis, antocianinas, flavonoides amarelos e carotenoides foram avaliados por diferentes métodos. A toxicidade do EE foi avaliada com diferentes doses até 1200 mg/Kg administradas por via oral durante oito dias consecutivos. Posteriormente, doses do EE (150, 300 e 600 mg/Kg de peso) foram administradas por *gavage* durante 7 dias consecutivos antes do tratamento com dose única de paracetamol (500 mg/Kg, por via oral) e o seu efeito hepatoprotetor foi estudado através do monitoramento de parâmetros bioquímicos. O extrato apresentou elevada atividade antioxidante nos ensaios de ABTS ($2.148,88 \pm 140,26 \mu\text{M Trolox/g}$ de amostra) e DPPH ($87,11 \pm 1,58 \text{ g de amostra/g DPPH}$). Os polifenóis extraíveis predominaram entre os fitoquímicos determinados. Em relação à toxicidade, EE não apresentou efeitos tóxicos nas doses avaliadas. EE (600 mg/kg) apresentou efeito hepatoprotetor que foi evidenciado pela diminuição nas atividades de alanina aminotransferase (56,94%), aspartato aminotransferase (30,14%) e fosfatase alcalina (32,68%) no soro de animais tratados com EE (600 mg/kg) e submetidos a ingestão de paracetamol (grupo EE600+P) em comparação com o grupo paracetamol. No tecido hepático, houve diminuição de 25,68%, 31,67% e 31,97% dos teores de malondialdeído e elevação de 60,03%, 63,67% e 69,12% da atividade da superóxido dismutase nos grupos EE150+P, EE300+P e EE600+P, respectivamente, quando comparados com o grupo paracetamol. Ademais, os grupos sulfidrilas não proteicos no fígado aumentaram 56,74% e 63,61% nos grupos EE300+P e EE600+P quando comparados com o grupo paracetamol. O extrato etanólico de folhas de azeitona da terra conferiu hepatoproteção contra estresse por paracetamol, podendo esse efeito estar associado à sua elevada atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*, jambolão, paracetamol, fitoquímicos, atividade antioxidante, hepatoproteção.

ABSTRACT

Syzygium cumini is a plant originated from India and adapted in Brazil, popularly known as black plum, jambolan and jamun. In this study, the antioxidant and protective activities of ethanolic leaves extract of *Syzygium cumini* (EE) were evaluated on paracetamol-induced liver damage in mice. The total antioxidant activity was determined by ABTS and DPPH methods and the content of vitamin C, extractable polyphenols, anthocyanins, yellows flavonoids and carotenoids were evaluated by different methods. The toxicity of EE was evaluated with different doses up to 1200 mg/kg administered orally for eight consecutive days. Subsequently, doses of the EE (150, 300 and 600 mg/kg weight) were administered by gavage for 7 consecutive days before treatment with single dose of paracetamol (500 mg/kg, orally) and its hepatoprotective effect has been studied by monitoring biochemical parameters. The extract presented high antioxidant activity in ABTS (2148.88 ± 140.26 mM Trolox/g of sample) and DPPH (87.11 ± 1.58 g of sample/g DPPH) assays. The extractable polyphenols prevailed among determined phytochemicals. Regarding toxicity, EE showed no toxic effects at the doses evaluated. EE (600 mg/kg) presented hepatoprotective effect that was evidenced by the decrease in the activities of alanine aminotransferase (56.94%), aspartate aminotransferase (30.14%) and alkaline phosphatase (32.68%) in the serum of animals treated with EE (600 mg/kg) and subjected to ingestion of paracetamol (EE600+ P group) compared with the group paracetamol. In liver tissue, there was a decrease of 25.68%, 31.67% and 31.97% of the malondialdehyde levels and elevation of 60.03%, 63.67% and 69.12% of the dismutase superoxide activity in EE150+ P EE300+ P and EE600+ P groups, respectively, when compared with the paracetamol group. Furthermore, non-protein sulfhydryls groups in the liver increased 56.74% and 63.61% in EE300+P and EE600 + P groups when compared with the paracetamol group. The ethanolic leaves extract of *Syzygium cumini* conferred hepatoprotection against stress by paracetamol, this effect may be associated to its high antioxidant activity.

Keywords: *Syzygium cumini*, jambolan, paracetamol, phytochemicals, antioxidant activity, hepatoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>)	23
Figura 2	Mecanismos de defesa antioxidante	30
Figura 3	Oxidação do ácido ascórbico	31
Figura 4	Estrutura química do tocoferol e tocotrienol	32
Figura 5	Estrutura química do licopeno e β -caroteno	32
Figura 6	Principais classes de polifenóis	34
Figura 7	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a atividade da alanina aminotransferase (ALT)	54
Figura 8	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a atividade da aspartato aminotransferase (AST)	54
Figura 9	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a peroxidação lipídica	55
Figura 10	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>) sobre a mucosa gástrica	56
Figura 11	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) em soro de camundongos tratados com paracetamol	59
Figura 12	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) em soro de camundongos tratados com paracetamol	60
Figura 13	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> nos níveis de fosfatase alcalina (ALP) em soro de camundongos tratados com paracetamol	61
Figura 14	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> nos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em fígado de camundongos tratados com paracetamol	62
Figura 15	Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> nos níveis de grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) em fígado de camundongos tratados com paracetamol	63

- Figura 16 Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de 64
Syzygium cumini nos níveis de superóxido dismutase (SOD)
em fígado de camundongos tratados com paracetamol
- Figura 17 Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de 65
azeitona da terra (*Syzygium cumini*) sobre a mucosa gástrica
de camundongos tratados com paracetamol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização fitoquímica do extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i>	50
Tabela 2	Teor de compostos bioativos em extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i>	51
Tabela 3	Atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> .	52
Tabela 4	Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i>	53
Tabela 5	Efeito da administração de diferentes doses de extrato etanólico de <i>Syzygium cumini</i> no peso do corpo e no peso relativo dos órgãos de animais submetidos a estresse por paracetamol	58

LISTA DE ABREVIATURAS ESIGLAS

AA	Ácido ascórbico
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
APx	Ascobarto peroxidase
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DHA	Ácido dehidroascórbico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EE	Extrato etanólico de folhas de azeitona da terra
FDA	Food and Drug Administration
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO*	Radical hidroxil
i.g.	Intragástrica
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
NBT	Nitro azul de tetrazólico
NO	Óxido nítrico
NP-SH	Grupos sulfidrilas não protéicos
O ₂ * ⁻	Ânion superóxido

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PET	Polifenóis Extraíveis Totais
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	Plantas medicinais e propriedades da azeitona da terra.....	21
3.2	Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS).....	24
3.3	Estresse oxidativo.....	25
3.3.1	Danos hepáticos por estresse oxidativo.....	25
3.3.2	Estresse oxidativo por paracetamol.....	27
3.4	Defesa antioxidante.....	28
3.4.1	Antioxidantes enzimáticos.....	29
3.4.2	Antioxidantes não enzimáticos.....	30
3.4.2.1	Vitamina C e E.....	30
3.4.2.2	Carotenoides.....	32
3.4.2.3	Glutathiona reduzida (GSH).....	33
3.4.2.4	Polifenóis.....	33
4	MATERIAL.....	36
4.1	Material vegetal.....	36
4.2	Animais.....	36
4.3	Reagentes.....	36
5	Métodos.....	37
5.1	Preparação do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>).....	37
5.2	Caracterização fitoquímica do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>).....	37
5.2.1	Preparo das amostras a partir do extrato para determinação dos fitoquímicos.....	37
5.2.2	Determinação de fenóis e taninos.....	
5.2.3	Determinação de flavonoides.....	38
5.2.4	Determinação de flavonóis, flavanonas, flavanonois e xantonas.....	38

5.2.5	Determinação de catequinas.....	38
5.2.6	Determinação de esteroides e triterpenoides.....	38
5.2.7	Determinação de saponinas.....	39
5.2.8	Determinação de alcaloides.....	39
5.3	Estudo da atividade antioxidante total e dos antioxidantes não enzimáticos.....	39
5.3.1	Preparo dos extratos.....	39
5.3.2	Atividade Antioxidante total.....	40
5.3.2.1	Método ABTS.....	40
5.3.2.2	Método DPPH.....	40
5.3.3	Atividade dos antioxidantes não enzimáticos.....	41
5.3.3.1	Determinação de vitamina C.....	41
4.3.3.2	Determinação de antocianinas.....	41
4.3.3.3	Determinação de flavonoides amarelos.....	41
5.3.3.4	Determinação de polifenóis totais.....	42
4.3.3.5	Determinação de carotenoides totais.....	42
5.4	Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>).....	43
5.4.1	Grupos experimentais.....	43
5.4.2	Determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) no soro de camundongos.....	44
5.4.2.1	Coleta de soro.....	44
5.4.2.2	Atividade das enzimas ALT e AST.....	44
5.4.3	Determinação da peroxidação lipídica no fígado de camundongos.....	44
5.4.4	Análise das lesões dos estômagos.....	45
5.5	Determinação do efeito protetor do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>) contra o estresse oxidativo.....	45
5.5.1	Preparação de paracetamol.....	45
5.5.2	Grupos experimentais.....	45
5.5.3	Determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP)	47

	no soro de camundongos.....	
5.5.3.1	Coleta de soro.....	47
5.5.3.2	Atividade das enzimas ALT, AST e ALP.....	47
5.5.4	Determinação da peroxidação lipídica no fígado de camundongos.....	47
5.5.5	Determinação de grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) no fígado de camundongos.....	48
5.5.6	Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de camundongos.....	48
5.5.6.1	Concentração de proteínas.....	49
5.5.7	Análise das lesões dos estômagos.....	49
5.6	Análise estatística.....	49
6	RESULTADOS.....	50
6.1	Perfil fitoquímico do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>).....	50
6.2	Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>).....	50
6.2.1	Determinação de antioxidantes não enzimáticos.....	51
6.2.2	Atividade antioxidante total.....	51
6.3	Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>).....	52
6.4	Avaliação do efeito protetor do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (<i>Syzygium cumini</i>) contra estresse oxidativo induzido por paracetamol.....	56
7	DISCUSSÃO.....	67
8	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na medicina popular vem ganhando cada vez mais destaque, não somente por suas propriedades terapêuticas, mas também por serem mais acessíveis economicamente. O Brasil apresenta uma grande diversidade de vegetais e um número considerável dos mesmos vem sendo utilizado como plantas medicinais pela população. Apesar de seu uso ser bastante difundido grande parte dessas plantas ainda não foi estudada e/ou validada quanto ao seu emprego medicinal (FOGLIO *et al.*, 2006).

Assim, existe no Brasil um déficit entre oferta de plantas e quantidade de pesquisas, o que determina um elevado potencial de estudo nessa área. Dentre as várias espécies de plantas, a azeitona da terra (*Syzygium cumini*) foi selecionada para ser testada por apresentar um grande potencial antioxidante. Estudos mostram que a planta é rica em diversos fitoquímicos benéficos para a saúde, tais como carotenoides, flavonoides e ácidos fenólicos, os quais apresentam potencial antioxidante (BALIGA *et al.*, 2011; FARIA, MARQUES; MERCADANTE, 2011; LIMA *et al.*, 2007; RUAN; ZHANG; LIN, 2008).

Há evidências que uma ótima combinação de compostos antioxidantes pode desempenhar um importante papel para a melhoria do *status* antioxidante dos sistemas biológicos (LIU *et al.*, 2008). Dados da literatura mostram que o extrato de folhas de azeitona da terra possui potente atividade antioxidante e que a mesma pode estar relacionada com seus compostos fenólicos, apresentando uma significativa relação entre potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos (RUAN; ZHANG; LIN, 2008). Outros autores demonstraram o efeito benéfico ao tecido hepático de ratos submetidos a estresse por paracetamol do extrato etanólico da polpa de azeitona da terra (DAS; SARMA, 2009) e a atividade hepatoprotetora do extrato aquoso das folhas de azeitona da terra em ratos submetidos a estresse por tetracloreto de carbono (MORESCO *et al.*, 2007). Contudo, nenhum desses trabalhos avaliou a capacidade protetora do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra contra estresse oxidativo por paracetamol em camundongos.

Vale salientar que a escolha do modelo de hepatotoxicidade por paracetamol deu-se porque dentre as várias drogas para induzir estresse oxidativo, o paracetamol é amplamente usado como analgésico no alívio de febre e dores,

porém o uso excessivo desse fármaco pode danificar múltiplos órgãos, principalmente o fígado (COVER *et al*, 2006.; GRYPIOTI *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini* L.) e seu efeito protetor contra danos oxidativos induzidos por paracetamol em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil fitoquímico do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra;
- Determinar a concentração de polifenóis totais, antocianinas, flavonoides amarelos, carotenoides totais e vitamina C do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra;
- Avaliar a capacidade antioxidante total do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra;
- Verificar a toxicidade *in vivo* do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre as atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) no soro de camundongos submetidos a estresse oxidativo por paracetamol;
- Investigar o efeito do tratamento com extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a peroxidação lipídica no fígado de camundongos submetidos a estresse oxidativo por paracetamol;

- Avaliar o efeito do tratamento com extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre os níveis de grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) no fígado de camundongos submetidos a estresse por paracetamol;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de camundongos submetidos a estresse por paracetamol;
- Investigar o efeito do tratamento com extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre os estômagos de camundongos submetidos ao estresse oxidativo por paracetamol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas medicinais e propriedades da azeitona da terra

Desde os tempos antigos os produtos naturais são utilizados pela humanidade. O grande conhecimento da natureza pelos povos primitivos e indígenas, bem como a convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos, contribuíram para a descoberta de substâncias medicamentosas e o desenvolvimento de pesquisas na área de produtos naturais (VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Estes são fontes importantes de novos fármacos obtidos de plantas ou outras fontes biológicas (CALIXTO, 2005; FOGGIO *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2008).

Plantas medicinais são descritas como materiais ou preparações de origem vegetal com ação terapêutica ou outros benefícios para a saúde humana que contenham tanto ingredientes *in natura* como processados de uma ou mais plantas. Essas podem ser classificadas em três grupos: materiais de plantas (materiais à base de plantas *in natura* ou processadas); produtos tradicionais à base de plantas (comprimidos, pílulas ou cápsulas contendo materiais à base de plantas brutas ou extratos brutos) e produtos padronizados à base de plantas (formulações padronizadas contendo extratos ou substâncias purificadas) (ZHANG *et al.*, 2012).

As plantas podem ser utilizadas com fonte de compostos terapêuticos devido a sua vasta capacidade biossintética. A principal vantagem é a sua composição complexa que consiste em um conjunto de compostos relacionados com várias atividades que interagem para uma maior atividade (SCHMIDT *et al.*, 2008). Grande parte das drogas avaliadas como agentes terapêuticos derivam de produtos naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

O uso das plantas é muitas vezes o único recurso das comunidades para a cura e alívio de doenças (MACIEL *et al.* 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial utilizam-nas, principalmente nos países em desenvolvimento (GURIB-FAKIM, 2006). Nesses países, os fitoterápicos desempenham um papel vital no sistema de saúde, principalmente em áreas rurais (SEN; CHAKRABORTY; DE, 2011). Apesar de serem bastante utilizadas, somente 17% dessas plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal. Esse dado mostra que existe um enorme déficit entre oferta de plantas

(riqueza vegetal) e quantidade de pesquisas que forneçam um respaldo científico quanto a eficácia e segurança em relação ao seu uso (FOGLIO *et al.*, 2006). Assim, a pesquisa de propriedades farmacológicas de plantas e produtos naturais pode proporcionar a descoberta/reconhecimento de substâncias com importantes aplicações terapêuticas (AWODELE *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2002; STICKEL; SCHUPPAN, 2007).

Uma série de plantas medicinais, dentre essas plantas, o *Syzygium cumini* tem apresentado efeitos promissores no tratamento de diversas doenças, em especial as hepáticas (MORESCO *et al.*, 2007).

Syzygium cumini (*Syzygium jambolana*, *Eugenia cumini* ou *Eugenia jambolana*) pertence à família Myrtaceae, sendo popularmente conhecida como jambolão, azeitona da terra, ameixa preta, Jamun e Jamu. Essa planta é originada da Índia, adaptada ao Brasil e distribuída por todo o litoral brasileiro (DAS; SARMA, 2009; SILVA *et al.*, 2012; SWAMI *et al.*, 2012). É considerada uma espécie arbórea (MATOS, 1999). As folhas são lisas, elípticas, brilhantes e de natureza fibrosa. Os frutos possuem uma semente central, são redondos ou oblíquos com 1,5 a 3,5 centímetros de comprimento e são encontrados em grupo de 4-20. Quando maduros, sua coloração varia de roxo escuro a preto. Os frutos são comestíveis e apresentam um sabor adstringente que combina doce e azedo (Figura 1) (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). *S. cumini* é conhecido por possuir diversos fitoquímicos benéficos para a saúde. Estudos mostram que a polpa da fruta é rica em carotenoides (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011), antocianinas, delphinidinas, petunidinas, malvidina-diglicosídeos, sendo esses compostos responsáveis por sua cor roxa brilhante (LI *et al.*, 2009; SAGRAWAT; MANN; KHARYA, 2006; VEIGAS *et al.*, 2007).

Nas sementes, já foram relatadas as presenças de β -sitosterol, jambosino, ácido gálico, ácido elágico, quercetina, corilagina, 3,6-hexahidroxi-difenolglicose e 4,6-hexaidroxidifenol-glicose (SAGRAWAT; MANN; KHARYA, 2006).

A casca do caule possui ácido betulínico, friedelina, 3-friedelanol, β -sitosterol, β -sitosterol-D-glicosídeo, kaempferol, ácido gálico, ácido elágico, miricetina, galotaninos e elagitaninos (SAGRAWAT; MANN; KHARYA, 2006).

As folhas são conhecidas por conter β -sitosterol, ácido betulínico, micaminose, ácido cratególico (maslínico), n-hepatcosano, n-nonacosano, n-hentriacontano, noctacosanol, n-triacontanol, n-dotricontanol, quercetina, miricetina,

miricitrina e o flavonoides glicosídeos e flavonois glicosídeos acilados (MAHMOUD *et al.*, 2001; SAGRAWAT; MANN; KHARYA, 2006), taninos (LIMA *et al.*, 2007) e ácido ferúlico (RUAN; ZHANG; LIN, 2008).



Figura 1: Azeitona da terra (*Syzygium cumini*). Fonte: BALIGA *et al.* (2011).

As sementes e todas as outras partes da planta e têm uma longa história de uso medicinal nos vários sistemas populares de medicina (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). Estudos têm mostrado que o extrato hidroetanólico de folhas (LOGUERCIO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007), extrato aquoso do caule (DJIPA; DELMÉE; QUETIN-LECLERCQ, 2000) e extratos aquoso e acetônico de sementes, caule e folhas (MURUGAN *et al.*, 2011) possuem efeito antimicrobiano. Foi também observado o efeito antioxidante *in vitro* do fruto (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; BENHERLAL; ARUMUGHAN, 2007).

Pode ser citada também a ação anti-inflamatória do extrato etanólico de caule (MURUGANANDAN *et al.*, 2001) e extrato de folhas (LIMA *et al.*, 2007). Além de propriedades analgésica do extrato hidroetanólico (AVILA-PENA *et al.*, 2007) e antialérgica de extrato aquoso de folhas de azeitona da terra (BRITO *et al.*, 2007).

Ademais *Syzygium cumini* é muito estudado por sua ação antidiabética e antihiperlipidêmica. Estudos demonstraram essas atividades em extrato de

sementes (PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 2004; SHARMA; BALOMAJUMDER; ROY 2008) e em extrato etanólico de folhas (SCHOENFELDE *et al.*, 2010).

O efeito radioprotetor (JAGETIA; SHETTY; VIDYASAGAR, 2012) e anticarcinogênico (PARMAR *et al.*, 2010) foram também evidenciados. Extrato de polpa apresentou ação benéfica contra células de câncer de mama (LI *et al.*, 2009).

Ademais foram observadas a ação gastroprotetora e anti ulcerogênica do fruto (CHATURVEDI *et al.*, 2007), de folhas (VIDYA *et al.*, 2011) e de taninos isolados de sementes (RAMIREZ; ROA, 2003) de azeitona da terra. O efeito benéfico do extrato etanólico da polpa e extrato aquoso das folhas de azeitona da terra ao tecido hepático de ratos submetidos a estresse por paracetamol e tetracloreto de carbono, respectivamente, também foram relatados (DAS; SARMA, 2009; MORESCO *et al.*, 2007).

3.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS)

Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio atuam na regulação da função celular normal (ROSENFELDT *et al.*, 2012). ROS e RNS são normalmente geradas por enzimas fortemente reguladas, tais como isoformas de NAD(P)H oxidase e NO sintase (NOS), respectivamente (VALKO *et al.*, 2007).

As ROS e RNS mais abundantes em sistemas biológicos são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (HO^{\cdot}), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LAKSHMI *et al.*, 2009; MENDES, 2008; VALKO *et al.*, 2007).

ROS podem ser tanto prejudiciais como benéficas para os sistemas vivos. Efeitos benéficos ocorrem em concentrações baixas ou moderadas e envolvem proteção contra agentes infecciosos e vias de sinalização celular. Em contraste, quando em altas concentrações, atuam como mediadoras de danos biológicos denominado estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2006).

A superprodução de RNS é conhecida como estresse nitrosativo. Este pode conduzir a reações de nitrosilação que levam a alterações na estrutura das proteínas e inibição da sua função normal (VALKO *et al.*, 2007).

3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desbalanceamento entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos primeiros, podendo levar a danos oxidativos para o organismo (KATALINIC *et al.*, 2006; TRAUSTADOTTIR *et al.*, 2009). Isso ocorre quando há uma produção excessiva de ROS e RNS de um lado e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do outro. As ROS em excesso podem danificar lípidios, proteínas e DNA, alterando ou inibindo as funções normais dessas moléculas (DROGE, 2002).

Assim, esse desequilíbrio entre a taxa de produção e a taxa de remoção de ROS e RNS contribui para o envelhecimento e ocorrência de várias doenças humanas (VALKO *et al.*, 2007), como distúrbios cardiovasculares (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000; LAKSHMI *et al.*, 2009), câncer (VALKO *et al.*, 2006), doenças neurodegenerativas (JENNER, 2003; NIKAM *et al.*, 2009; SAYRE; SMITH; PERRY, 2001; UTTARA *et al.*, 2009), obesidade e resistência à insulina (MARTÍNEZ, 2006), como também acúmulo de macromoléculas e organelas danificadas, incluindo mitocôndrias (TERMAN; GUSTAFSSON; BRUNK, 2007).

Reid e colaboradores (2005) demonstraram que além de doenças crônicas, o estresse oxidativo pode também desempenhar um papel fundamental na hepatotoxicidade aguda de várias drogas. Estudos têm mostrado que durante o metabolismo do paracetamol ocorre a produção de ROS e conseqüente evolução do estresse oxidativo, induzindo peroxidação lipídica e injúrias no fígado (MANOV; HIRSH; IANCU, 2002; YOUSEF *et al.*, 2010).

3.3.1 Danos hepáticos por estresse oxidativo

O fígado é o principal órgão no corpo responsável pela manutenção de diversas funções metabólicas, bem como pelo metabolismo e detoxificação de drogas. O mesmo está sujeito a uma variedade de lesões, sendo uma das causas mais comuns a hepatotoxicidade induzida por drogas (BHAWNA; KUMAR, 2010).

Danos no fígado vêm sendo associados com necrose celular, aumento da peroxidação lipídica no tecido, redução do sistema de defesa antioxidante como, por exemplo, diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e depleção nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido. No soro, tem-se

elevação de marcadores bioquímicos, tais como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e lactato desidrogenase (LDH) (HURKADALE *et al.*, 2012; LIU; LU; PENG, 2011; SETTY *et al.*, 2007; YOUSEF *et al.*, 2010).

A lipoperoxidação é o processo de degradação oxidativa dos ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas celulares (SABIR *et al.*, 2012). Esse processo libera malondialdeído (MDA) como produto final (SHARMA *et al.*, 2011). A quantificação desse composto funciona como um marcador de dano oxidativo assim como permite uma estimativa da intensidade do processo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A peroxidação lipídica das membranas celulares é devastadora para a integridade funcional dessas estruturas e, se o dano for grave, a morte celular é inevitável (SENER; SEHIRLI; AYANOGLU-DULGER, 2003).

Enzimas desempenham papel central nos processos bioquímicos e fisiológicos. Todos esses processos são altamente regulados de forma a manter a homeostase. Qualquer alteração nesse sistema, quando não resolvida, poderá originar uma anomalia, e conseqüentemente patologias como, por exemplo, uma lesão no tecido hepático (SOETAN; AIYELAAGBE; OLAIYA, 2010).

Aminotransferases ou transaminases são enzimas importantes na regulação celular. Uma alteração na quantidade ou atividade das enzimas presentes em determinado órgão ou tecido pode ser indicativo de anormalidade (DUFOUR *et al.*, 2000; GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

A ALT ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) catalisa a reação de transferência de um grupo amina de L-alanina para o α -cetoglutarato, passando a piruvato e glutamato, respectivamente (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; SOETAN; AIYELAAGBE; OLAIYA, 2010). A ALT é um marcador específico de doenças hepáticas, pois se situa principalmente no citoplasma das células do parênquima no fígado (DUFOUR *et al.*, 2000; GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

A AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) catalisa a reação de transferência de um grupo amina do L-aspartato para o α -cetoglutarato, produzindo oxaloacetato e glutamato, respectivamente (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; SOETAN; AIYELAAGBE; OLAIYA, 2010). Essa enzima é encontrada nos hepatócitos, coração e músculos esqueléticos e em menor concentração, em outros órgãos como rim e cérebro (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). Nas células hepáticas, a AST está localizada tanto no citoplasma como na mitocôndria,

funcionando também como um marcador de doenças hepáticas (DUFOR *et al.*, 2000).

A ALP está presente em praticamente todos os tecidos. No fígado, é secretada pelos hepatócitos e pelas células da mucosa do trato biliar. Essa enzima também é encontrada nos ossos, rim, intestino delgado e placenta (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). A fosfatase alcalina pode ter sua concentração sérica aumentada nas obstruções biliares intra ou extras hepáticas e também na cirrose (DUFOR *et al.*, 2000; GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

A LDH está presente em vários tecidos como coração, hemácias, fígado, músculo esquelético, rim, cérebro e tecidos linfóides. Desse modo, a lactato desidrogenase pode ter sua concentração sérica aumentada em uma variedade de situações clínicas (SOETAN; AIYELAAGBE; OLAIYA, 2010).

3.3.2 Estresse oxidativo por paracetamol

O paracetamol ou acetaminofeno é um analgésico e antipirético considerado seguro em níveis terapêuticos, amplamente utilizado, especialmente na infância. Essa droga é metabolizada primeiramente pelo fígado e excretada pelos rins. Seu uso em excesso ou por tempo prolongado pode causar efeito hepatotóxico (COVER *et al.*, 2006.; GRYPLOTI *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos, é considerada a principal causa de insuficiência hepática aguda (PUGH *et al.*, 2009).

A toxicidade do paracetamol é relacionada ao seu metabolismo. Em doses terapêuticas, 60-90 % da droga são metabolizadas por conjugação (glicuronidação e sulfatação) para formar paracetamol-glicuronídeo e paracetamol-sulfato, que são solúveis em água e eliminados principalmente pela urina (BESSEMS; VERMEULEN, 2001; VALE, 2003). Enquanto, 5-10% são oxidados por enzimas oxidases de função mista (sistema de metabolização de drogas citocromo P450) a uma forma altamente reativa, N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), que é imediatamente conjugado com a glutathione e, posteriormente, excretado como cisteína e conjugados mercapturato. Apenas 1-4% de uma dose terapêutica de paracetamol são excretados inalterados na urina (DAHLIN *et al.*, 1984; VALE, 2003).

Em caso de sobredosagem, maiores quantidades de paracetamol são metabolizadas por oxidação por causa da saturação da via de conjugação. Como resultado, há um esgotamento das glutathionas hepáticas e o fígado torna-se incapaz

de desativar o metabólito tóxico NAPQI. Isso porque a desintoxicação do NAPQI é catalisada no fígado pela glutathiona reduzida (GSH) para formar um conjugado GSH-paracetamol (BESSEMS; VERMEULEN, 2001; VALE, 2003). Esta ligação resulta na redução de insuficiência hepática (PUGH *et al.*, 2009).

Então, quando a produção excede a capacidade de desintoxicação da GSH, NAPQI se liga covalentemente a várias proteínas da célula e forma conjugados (BESSEMS; VERMEULEN, 2001; DAHLIN *et al.*, 1984). Estes conjugados proteicos podem causar danos irreversíveis, como lesão hepática e necrose hepática celular por vários mecanismos (PUGH *et al.*, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Além disso, tem sido postulado que NAPQI pode levar a danos oxidativos de numerosos componentes celulares (MURUGESH *et al.*, 2005).

Assim, altas doses de paracetamol originam NAPQI, metabólito tóxico, que pode alquilar e oxidar GSH intracelular e os grupos tiol de proteínas, o que resulta na depleção de GSH e, posteriormente, aumento na peroxidação lipídica e danos ao fígado (LIU; LU; PENG, 2011; MALHI; GORES; LEMASTERS, 2006). O mecanismo geral de hepatotoxicidade induzida por drogas envolve possivelmente a formação de metabólito reativo, depleção de antioxidantes e alquilação de proteínas (AMIN; HAMZA, 2005; PUGH *et al.*, 2009).

Em 2009, o comitê consultivo da Food and Drug Administration (FDA) recomendou que novas restrições devem ser implementadas/impostas para proteger as pessoas dos efeitos potencialmente tóxicos do paracetamol (LIU; LU; PENG, 2011). Todos os fatos citados justificam a continuidade de pesquisas nessa área e desenvolvimento de medicamentos utilizados para tratar lesões no fígado causadas por paracetamol. Estudos têm demonstrado que algumas ervas possuem atividades benéficas no tratamento de distúrbios hepáticos (LEE *et al.*, 2007; LIU; LU; PENG, 2011). A ação protetora pode estar relacionada ao alto teor de flavonóides encontrados nessas ervas e comprovados pelas pesquisas (KHALID; SHEIKH; ANWAR, 2002; LIU; LU; PENG, 2011).

3.4 Defesa antioxidante

Para prevenir danos celulares, os organismos vivos desenvolveram sistemas de defesa. Esses mecanismos de defesa envolvem: prevenção, reparo, defesa física e sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (VALKO *et al.*, 2007).

Antioxidante pode ser definido como uma molécula que mesmo presente em baixas concentrações é capaz de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas (TALAULIKAR; MANYONDA, 2011).

Sistemas antioxidantes enzimáticos são representados por superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APx). Antioxidantes não enzimáticos incluem as vitaminas, os minerais, carotenoides, glutathione (GSH), compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos. Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre as atividades e os níveis intracelulares destes antioxidantes. Esse equilíbrio é essencial para a saúde e sobrevivência dos organismos (VALKO *et al.*, 2007).

Os antioxidantes conferem potencial terapêutico e são responsáveis por efeitos benéficos na prevenção de doenças humanas, tais como doenças cardiovasculares, gástricas, câncer e patologias hepáticas (GONZÁLEZ-GALLEGO; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓR, 2007). Em consequência, há um grande interesse em pesquisas de princípios antioxidantes, visando identificar potenciais fontes naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SABIR; ROCHA, 2008a).

3.4.1 Antioxidantes enzimáticos

SOD, GPx e CAT estão localizadas em células e fluidos corporais. Essas enzimas trabalham juntas para prevenir o dano oxidativo por limitação nos níveis de ROS (Figura 2) (DE HAAN *et al.*, 2003; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra ROS por catalisar a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (ZELKO I.N.; MARIANI T.J.; FOLZ R.J., 2002). A GPx, assim como a CAT e APx, decompõe H_2O_2 à água (H_2O) em diferentes compartimentos celulares (DE HAAN *et al.*, 2003; FINKEL; HOLBROOK, 2000; UZILDAY *et al.*, 2012).

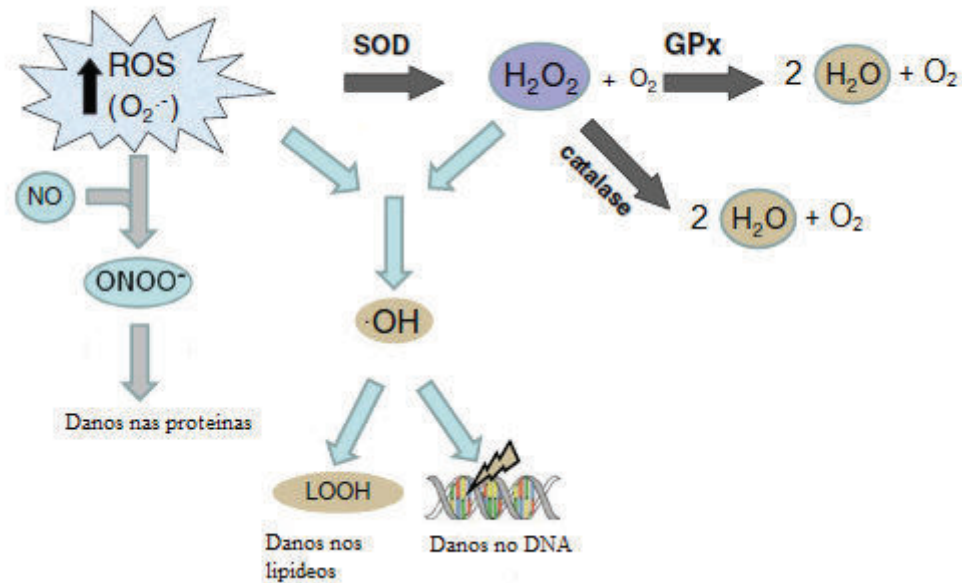


Figura 2: Mecanismos de defesa antioxidante. Fonte: ROSENFELDT *et al.* (2012) com modificações.

3.4.2 Antioxidantes não enzimáticos

Antioxidantes não enzimáticos (ex. vitaminas, carotenoides, GSH e polifenóis) podem ser sintetizados no próprio organismo ou obtidos da dieta. Esses estão presentes em concentração maiores que os enzimáticos e conferem proteção convertendo oxidantes em produtos finais não radicalares ou transferem os radicais para áreas em que os seus efeitos nocivos são menos prejudiciais (OLIVEIRA *et al.*, 2009; ROSENFELDT *et al.*, 2012).

Outros antioxidantes não enzimáticos também participam do sistema de defesa contra as ROS como a ubiquinona, ácido úrico, entre outros. A ubiquinona protege a estabilidade das membranas celulares e danos no DNA induzidos por radicais livres e também é capaz de reciclar e regenerar outros antioxidantes, tais como ácido ascórbico e α -tocoferol (ROSENFELDT *et al.*, 2012).

3.4.2.1 Vitamina C e E

As vitaminas C e E são os mais abundantes antioxidantes solúveis em água e lipídeos no corpo, respectivamente. As duas atuam neutralizando ROS e reduzindo o estresse oxidativo (TALAULIKAR; MANYONDA, 2011).

Nos tecidos vegetais, a vitamina C encontra-se amplamente distribuída e pode estar presente na forma reduzida e biologicamente ativa como ácido ascórbico (AA) ou na forma oxidada como ácido dehidroascórbico (DHA) que também apresenta função biológica (DAVEY *et al.*, 2000; DEUTSCH, 2000). A figura 3 representa a reação de oxidação do AA a DHA.

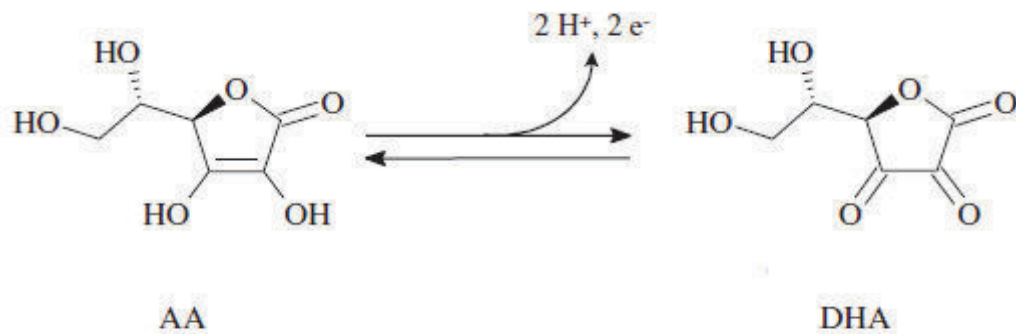


Figura 3: Oxidação do ácido ascórbico. Fonte: HERNÁNDEZ; LOBO; GONZÁLEZ (2006).

Como o organismo humano não consegue sintetizar ascorbato a dieta rica em vegetais e frutas é a principal fonte de vitamina C (HERNÁNDEZ; LOBO; GONZÁLEZ, 2006).

O principal papel da vitamina C é neutralizar e eliminar as ROS, uma vez que é hidrossolúvel, pode funcionar tanto dentro como fora das células. Essa vitamina tem efeito hepatoprotetor e protege o DNA das células de danos causados por radicais livres. Além disso, pode atuar na regulação das defesas antioxidantes endógenas (EL-GENDY *et al.*, 2010). AA também tem a capacidade de manter o α -tocoferol ligado à membrana, atuando como cofator na manutenção da atividade de enzimas, como substrato para biossíntese de tartarato e oxalato e desempenhando um papel na resistência ao estresse (DAVEY *et al.*, 2000).

A vitamina E é constituída por tocoferóis e tocotrienóis (Figura 4), sendo o α -tocoferol o mais ativo (ZINGG, 2007). Essa vitamina, constituinte solúvel em lipídeos, encontra-se no plasma e nas camadas duplas de lipídeos intracelulares, nas quais inibe a peroxidação lipídica e funciona como um estabilizador da membrana celular (BURKITT, 2001; DAYUAN *et al.*, 2001). Apresenta papel na redução da hepatotoxicidade induzida por paracetamol (SENER; SEHIRLI; AYANOGLU-DULGER, 2003).

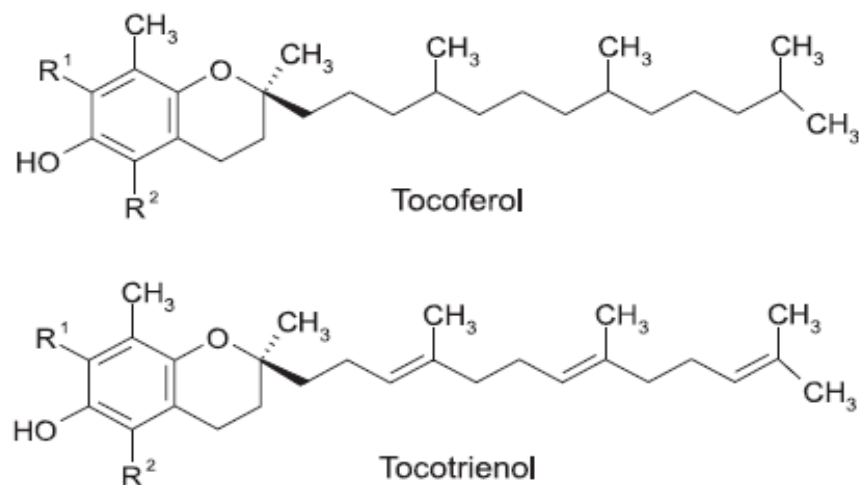


Figura 4: Estrutura química do tocoferol e tocotrienol. Fonte: CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO (2007).

3.4.2.2 Carotenoides

Carotenoides são compostos isoprenoides lipofílicos amplamente distribuídos na natureza, os principais incluem os hidrocarbonetos licopeno e β -caroteno, cujas estruturas estão representadas na figura 5. Grupo de antioxidantes que são sintetizados por todos os organismos fotossintéticos, em algumas bactérias não fotossintéticas e fungos. Organismos humanos não podem sintetizar carotenoides, mas podem obtê-los a partir da dieta (WALTER; STRACK, 2011).

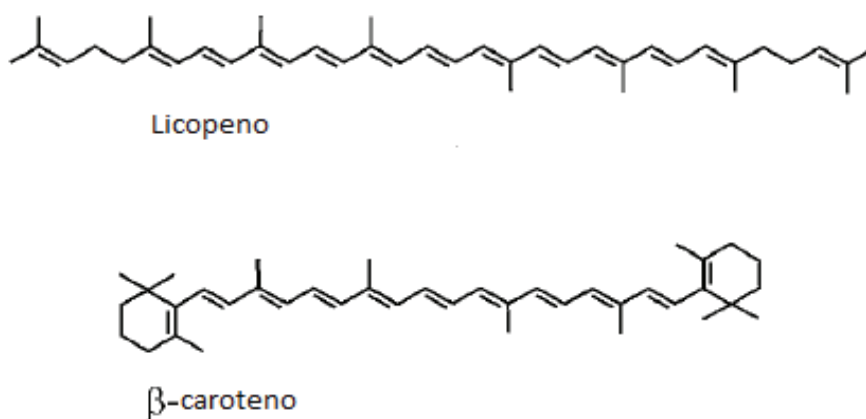


Figura 5: Estrutura química do licopeno e β -caroteno. Fonte: WALTER; STRACK (2011).

Esses pigmentos naturais são responsáveis por muitas das colorações amarela, laranja e vermelha nas frutas e vegetais (HANNOUFA; HOSSAIN, 2012). As funções e benefícios à saúde dos carotenoides incluem o seu papel geral como antioxidante. Em humanos, alguns exercem efeito na redução do risco de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e doenças relacionadas ao envelhecimento. O β -caroteno, precursor da vitamina A, atua permitindo a visão de cores, na prevenção da degeneração macular do olho e na regulação dos retinoides (WALTER; STRACK, 2011).

3.4.2.3 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida é uma das moléculas mais importantes na defesa celular contra compostos reativos e quimicamente tóxicos ou estresse oxidativo (SENER; SEHIRLI; AYANOGLU-DULGER, 2003). Essa é encontrada de forma abundante no citosol, núcleo e mitocôndria, sendo considerada o principal antioxidante solúvel nesses compartimentos celulares (VALKO *et al.*, 2007).

Entre os papéis principais da GSH contra o estresse oxidativo estão incluídos: cofator de várias enzimas desintoxicantes, por exemplo, glutathiona peroxidase (GPx); participação no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática; eliminação de forma direta dos radicais hidroxila e oxigênio *singlet* e capacidade de regenerar as vitaminas C e E (MASELLA *et al.*, 2005).

Diminuição nos níveis de GSH intracelular pode levar à sensibilização das células a certas drogas. Doses elevadas de paracetamol podem ocasionar a depleção de GSH e subsequente aumento da peroxidação lipídica e danos no fígado (LIU; LU; PENG, 2011; SENNER; SEHIRLI; AYANOGLU-DULGER, 2003).

3.4.2.4 Polifenóis

Polifenóis ou compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Quimicamente são compostos que possuem um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel benzeno. Baseados na estrutura são classificados em duas categorias: compostos flavonoides e não flavonoides. Os não flavonoides são divididos em ácidos fenólicos (taninos condensados, proantocianidinas, ácido

ferúlico, ácido cafeíco, ácido gálico), lignanas (pinoresinol) e estilbenos (resveratrol) (EBRAHIMI; SCHLUESENER, 2012; FRAGA *et al.*, 2010).

Os flavonoides representam a maior família entre os polifenóis, mais de 2000 já foram isolados e identificados (RAMASSAMY, 2006). Esses podem ser divididos em várias classes (Figura 6), tais como antocianinas (derivadas de antocianidinas, ex. cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina), flavonóis (miricetina, kaempferol, quercetina, rutina), flavanóis (catequina, epicatequina), flavanonas (butina, hesperetina, hesperidina, naringenina), flavonas (luteolina, apigenina) e isoflavonas (daidzeína, genisteína) (EBRAHIMI; SCHLUESENER, 2012).

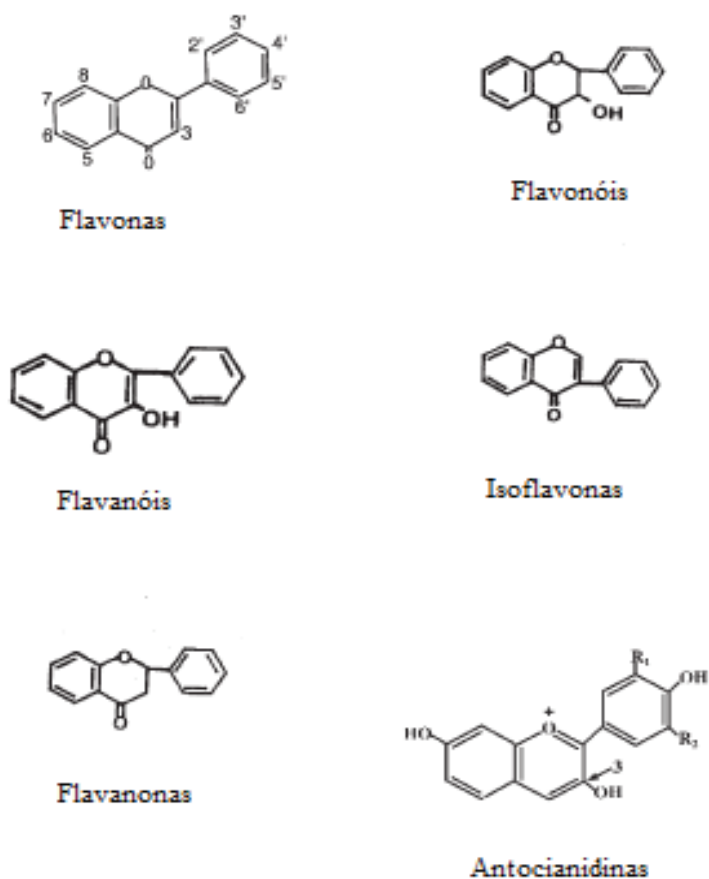


Figura 6: Principais classes de polifenóis. Fonte: RAMASSAMY (2006).

Em geral, os polifenóis são hidroxilados, metoxilados e/ou derivados glicosilados, sendo que o número, tipo e posição do açúcar podem variar. As propriedades físicas, químicas e biológicas, assim como o potencial antioxidante dos compostos fenólicos é dependente do número e arranjo dos grupos hidroxilas, do

grau de conjugação estrutural e do nível de glicosilação (MASELLA *et al.*, 2005; RAMASSAMY, 2006).

As ações benéficas dos polifenóis são principalmente atribuídas ao seu poder antioxidante, ou seja, à sua capacidade de neutralizar condições de estresse oxidativo, dependendo da sua estrutura química podem atuar na quebra de cadeias ou como sequestradores de radicais. Podem também ativar o sistema de defesa endógeno (CHOI *et al.*, 2012; MASELLA *et al.*, 2005).

Há um interesse crescente nos compostos fenólicos, devido a vários estudos que relacionam sua atividade antioxidante com a prevenção de certas doenças crônicas, como câncer (DI DOMENICO *et al.*, 2012), mal de Alzheimer (CHOI *et al.*, 2012), doenças cardiovasculares (LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008) e diabetes tipo 2 (RIZVI; ZAID, 2001). O seu efeito benéfico em alergias, asma, hipertensão também foi relatado (RÁMON, MIRANDA, VERGARA, 2011). Além disso, esses compostos possuem propriedades antibacteriana (BAYDAR *et al.*, 2006), antifúngica (JUNG *et al.*, 2005), antiviral (CHAVEZ *et al.*, 2006), imunomoduladora, anti-inflamatória (TERRA *et al.*, 2009) e hepatoprotetora, inclusive contra danos induzidos por paracetamol (LIU; LU; PENG, 2011; YOUSEF *et al.*, 2010).

4 MATERIAL

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini* L.) colhidas em outubro-novembro de 2011, localidade de Uberaba, município de Beberibe, no estado do Ceará. A identificação botânica da planta foi realizada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Botânica e Biologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, onde foi depositada, recebendo o "voucher" de número 53139.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos "swiss" machos pesando entre 30-35 g, provenientes de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Bioenergética, na Universidade Federal do Ceará, em caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (nº: 20/12) e os animais foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Reagentes

Todos os reagentes listados na metodologia foram de grau analítico.

5 MÉTODOS

5.1 Preparação do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*)

O extrato etanólico foi preparado das folhas da planta adulta no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As folhas foram trituradas e secas à temperatura ambiente, depois foram submetidas à extração exaustiva com hexano a frio durante sete dias. Para tanto, utilizaram-se aproximadamente 11 litros de hexano e posteriormente mesma quantidade de etanol. Foram realizadas duas extrações com cada solvente. A evaporação dos solventes foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, marca Fisatom – modelo 825 T, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 55°C, e posteriormente expondo-se à temperatura ambiente para eliminar resíduo de solvente, resultando então o extrato etanólico concentrado.

5.2 Caracterização fitoquímica do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*)

5.2.1 Preparo das amostras a partir do extrato para determinação dos fitoquímicos

A caracterização fitoquímica foi realizada seguindo a metodologia de Matos, 2009, com modificações. 0,2 g de extrato concentrado foram diluídos em 50 mL de álcool etílico. A solução foi dividida em porções de 4 mL colocadas em 4 tubos de ensaio numerados de 1 a 4. Duas porções de 10 mL foram colocadas em béqueres numerados de 5 e 6 e submetidas a banho-maria até secagem.

5.2.2. Determinação de fenóis e taninos

Para a avaliação da presença de fenóis, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico 1 N ao tubo 1 e o mesmo foi agitado. A mudança de coloração para azul ou vermelho indica a presença de fenóis. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos hidrolisáveis e verde, presença de taninos condensados.

5.2.3 Determinação de flavonoides

Para verificar a presença de flavonoides, o tubo 2 foi alcalinizado a pH 11. A observação de mudança de coloração, no meio alcalino (pH 11) para vermelho-laranja, indica possível presença de flavanonois, já para amarela, possível presença de flavonas, flavonois e xantonas.

5.2.4 Determinação de flavonois, flavanonas, flavanonois e xantonas

Para a detecção de flavonois, flavanonas, flavanonois e xantonas, foram adicionados 0,5 g de magnésio granulado e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado ao tubo 3. Após o término da reação, a visualização da mudança de coloração para vermelho indica presença de tais compostos.

5.2.5 Determinação de catequinas

Para verificar a presença de catequinas o tubo 4 foi acidulado pela adição de ácido clorídrico a pH 2 e aquecido em uma lamparina por 3 minutos. A mudança de coloração para pardo-amarelado determina a presença de catequinas.

5.2.6 Determinação de esteroides e triterpenoides

A presença ou ausência de esteroides e triterpenoides foi determinada da seguinte forma: o resíduo seco no béquer 5 foi extraído com 2 mL de clorofórmio (três vezes), formando uma solução clorofórmica que foi filtrada em um funil fechado com um fragmento de algodão, coberto com 0,1 g de sulfato de sódio anidro. Em seguida foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A mudança de coloração da solução de azul evanescente para verde permanente indica presença de esteroides livres, enquanto a mudança de coloração para parda indica presença de triterpenoides.

5.2.7 Determinação de saponinas

A presença ou ausência de saponinas foi determinada a partir do resíduo insolúvel em clorofórmio obtido do teste anterior, que foi dissolvido em água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. O líquido obtido da filtração foi agitado por 3 minutos e a formação de espuma persistente foi indicativo da presença de saponinas.

5.2.8 Determinação de alcaloides

A presença ou ausência de alcaloides foi determinada a partir do resíduo seco no béquer 6 que foi dissolvido em 5 mL de HCl a 5% e separada 1 porção de 1 mL em tubo de ensaio. Em seguida foi adicionada 1 gota de reativo de Dragendorff. A visualização de precipitado floculoso vermelho tijolo indica presença de alcaloides.

5.3 Estudo da atividade antioxidante total e dos antioxidantes não enzimáticos

5.3.1 Preparo dos extratos

O extrato utilizado para determinação da atividade antioxidante total (método ABTS e DPPH) e polifenóis totais foi obtido a partir de 2 g de EE concentrado, seguindo a metodologia de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Foram pesados 2 g de EE concentrado, em um béquer, adicionados 40 mL de metanol 50%, homogeneizados e deixados em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Então, submetido a centrifugação a 5.000 rpm durante 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e denominado sobrenadante 1. Ao precipitado da primeira extração, foram adicionados 40 mL de acetona 70 %, sendo homogeneizado e deixado em repouso por 60 minutos a temperatura ambiente. Foi feita uma nova centrifugação a 5.000 rpm durante 30 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (sobrenadante 2) e adicionado ao balão volumétrico contendo o sobrenadante 1. O volume final (balão) foi ajustado para 100 mL com água destilada.

5.3.2 Atividade antioxidante total

5.3.2.1 Método ABTS

A análise da atividade antioxidante total foi realizada pelo método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) conforme descrito por Miller *et al.* (1993) com modificações. Inicialmente, a partir do extrato obtido, foram preparadas três diferentes concentrações: 250, 500 e 1.000 ppm. Em tubos de ensaio, foram adicionados, em ambiente escuro, 30 µL de cada diluição do extrato e 3,0 mL da solução do radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico] (ABTS^{•+}) diluído em álcool etílico até obtenção de uma absorbância em comprimento de onda de 0,700 ± 0,01 a 734 nm. Essa solução do radical foi preparada a partir da solução estoque de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM, 16 horas antes da análise. A solução do antioxidante sintético 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox-Sigma 2000 µM), preparada em álcool etílico, foi utilizada como antioxidante padrão. A atividade antioxidante total foi calculada com base em uma curva padrão de doses decrescentes de Trolox. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm, 6 minutos após a adição da solução do radical ABTS^{•+} e os resultados expressos em µM Trolox/ g de extrato.

5.3.2.2 Método DPPH

Outro método utilizado para avaliar a atividade antioxidante total foi o método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com pequenas modificações. Esse método tem por base a redução do radical DPPH que apresenta um máximo de absorção a 515 nm. Inicialmente, a partir do extrato obtido, foram preparadas três diferentes concentrações: 250, 500 e 1.000 ppm. Em tubos de ensaio, em ambiente escuro, foram adicionados 0,1 mL de cada diluição do extrato e 3,9 mL do radical DPPH. O decréscimo na absorbância a 515 nm foi medido até sua estabilização. A atividade antioxidante total foi calculada com base em uma curva padrão de doses crescentes de DPPH, sendo expressa como a concentração de antioxidante requerida para reduzir a quantidade de radicais livres em 50% e os valores expressos como g de extrato/g DPPH.

5.3.3 Atividade dos antioxidantes não enzimáticos

5.3.3.1 Determinação de vitamina C

A vitamina C foi determinada de acordo com método de Strohecker e Henning (1967). Amostras de 3 g de extrato concentrado foram homogeneizadas com solução extratora (ácido oxálico 0,5%), sendo o volume completado até 100 mL. Depois, uma alíquota de 5 mL foi retirada e adicionada em Erlenmeyer (125 mL), o volume completado com água até 50 mL e a amostra foi titulada com solução padronizada de 2,6-diclorofenolindofenol 0,02%. O ponto de viragem foi detectado visualmente. Todas as análises foram feitas em duplicata e os resultados expressos em mg de vitamina C /100 g de amostra.

5.3.3.2 Determinação de antocianinas

O teor de antocianinas totais foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Amostras de 1 g de extrato concentrado foram homogeneizadas com 30 mL de solução de etanol-HCl (1,5 N) e transferidas para um balão volumétrico (50 mL), sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado para um béquer (50 mL) e em seguida, a absorbância foi medida a 535 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5N). Todas as análises foram feitas em duplicata e os resultados expressos em mg de antocianinas/100g de extrato, usando a fórmula:

Absorbância x fator de diluição/ (98,2)

5.3.3.3 Determinação de flavonoides amarelos

O teor de flavonoides amarelos foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Amostras de 1 g de extrato bruto foram homogeneizadas com 30 mL de solução de etanol-HCl (1,5 N) e transferidas para um balão volumétrico (50 mL), sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado para um béquer 50 mL e em seguida, a absorbância foi medida a 374 nm. O branco foi composto apenas da solução de

etanol-HCl (1,5N). Todas as análises foram feitas em duplicata e os resultados expressos em mg de flavonóides amarelos/100g de extrato, utilizando a fórmula:

Absorbância x fator de diluição/ (76,6)

5.3.3.4 Determinação de polifenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada conforme descrito por Obanda e Owuor (1997). Esse método envolve a redução do reagente Folin Ciocalteau pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 700 nm. Em tubos de eppendorf, foram adicionados, em ambiente escuro, 250 µL de extrato preparado no item 5.3.1, 250 µL da solução Folin-Ciocalteau, 500 µL da solução de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) a 20 %, 500 µL de água destilada e, em seguida, a mistura de reação foi homogeneizada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas em comprimento de onda de 700 nm. As concentrações de polifenóis solúveis totais foram calculadas com base em uma curva padrão de doses crescentes de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/ 100 g de extrato.

5.3.3.5 Determinação de carotenoides totais

Os carotenoides totais foram determinados pelo método de Lichtenthaler e Wellburn (1983). Amostra de extrato concentrado foi homogeneizada com acetona 80% em água. Em seguida, o extrato foi filtrado diretamente num balão volumétrico de 100 mL e depois o volume do balão foi completado com acetona 80%. As leituras foram realizadas em 646, 663 e 470 nm e os resultados expressos em mg/100 g de amostra, usando a fórmula:

Clorofila a: 12,21 (Abs 663) – 2,81 (Abs 643)

Clorofila b: 20,13 (Abs 646) – 5,03 (Abs 663)

Carotenoides totais: [1000 (Abs 470) – 3,27 (clorofila a) – 104 (clorofila b)] / 227

5.4 Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*)

5.4.1 Grupos experimentais

Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos do EE, os animais foram divididos em seis grupos (n=10) e submetidos aos seguintes tratamentos por 8 dias consecutivos:

- Grupo Controle: animais que receberam 200 µL de solução salina por via i.g.
- Grupo DMSO: animais que receberam 200 µL de DMSO 5% por via i.g.
- Grupo EE150: animais que receberam 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (150 mg/Kg) por via i.g .
- Grupo EE300: animais que receberam 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (300 mg/Kg) por via i.g .
- Grupo EE600: animais que receberam 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (600 mg/Kg) por via i.g .
- Grupo EE1200: animais que receberam 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (1200 mg/Kg) por via i.g .

O ensaio de toxicidade foi realizado com base no estudo de Sabir e Rocha (2008a) com modificações. Os animais receberam por via intra gástrica (i.g.) os tratamentos, por 8 dias consecutivos. Durante todo o período do tratamento foram observados sinais de toxicidade, como distintos parâmetros comportamentais e fisiológicos tais como frequências respiratória e cardíaca, diarreia, lacrimejamento, sialorréia, eriçamento de pelos, peso, mortalidade, avaliação macroscópica dos estômagos e determinação de parâmetros bioquímicos.

No oitavo dia, uma hora após a administração da última dose dos tratamentos, as amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital e o soro obtido para posteriores análises das atividades das enzimas ALT e AST. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Uma parte do fígado (0,4 g) foi colocada imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) e rapidamente armazenada a -80°C para análises posteriores da peroxidação lipídica.

Os estômagos foram também removidos, lavados com água destilada e utilizados para confecção das lâminas para avaliação das lesões.

5.4.2 Determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) no soro de camundongos

5.4.2.1 Coleta de soro

O sangue dos animais foi coletado individualmente e deixado em repouso durante 2 horas à temperatura ambiente para retração do coágulo. Após esse tempo, o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 8000 rpm, por dez minutos, para obtenção de um soro límpido, livre de hemácias, que foi então armazenado à -80° C para análises posteriores das atividades das enzimas ALT e AST.

5.4.2.2 Atividade das enzimas ALT e AST

Foi utilizado o método cinético para a determinação da atividade sérica das enzimas ALT e AST seguindo as recomendações do fabricante (Kit Labtest).

5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica no fígado de camundongos

A peroxidação lipídica foi medida por estimativa do malondialdeído (MDA) seguindo o método de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). O tecido (0,4 g) foi homogeneizado com 3,4 mL de tampão acetato pH 3,4 e centrifugado a 5000 rpm por 10 min, a 4°C. A 300 µL do sobrenadante foram adicionados 500 µL ácido tiobarbitúrico 0,8% e 200 µL de dodecil sulfato de sódio 8,1% e levados ao banho maria a 95-100°C por 2 h. Em seguida, a solução foi retirada e deixada à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/ g de tecido (nmol/g tecido).

5.4.4 Análise das lesões dos estômagos

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos removidos, lavados com água destilada e colocados em lâminas. Após preparação das lâminas, os danos dos estômagos foram avaliados visualmente.

5.5 Determinação do efeito protetor do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*) contra o estresse oxidativo

5.5.1 Preparação de Paracetamol

Paracetamol em comprimido (marca tylenol) foi macerado e dissolvido em água a 37°C seguindo metodologia de Olaleye e Rocha (2008). Foi utilizada dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg) como proposto por Girish *et al.* (2009a e 2009b).

5.5.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dez grupos (n=10):

- Grupo Controle: animais que receberam por via i.g. 200 µL de solução salina durante 7 dias consecutivos.
- Grupo DMSO: animais que receberam por via i.g. 200 µL de DMSO 5% durante 7 dias consecutivos.
- Grupo EE150: animais que receberam por via i.g. 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (150 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos.
- Grupo EE300: animais que receberam por via i.g. 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (300 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos.
- Grupo EE600: animais que receberam por via i.g. 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (600 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos.
- Grupo Paracetamol: animais que receberam por via i.g. 200 µL de solução salina durante 7 dias consecutivos e que foram submetidos à ingestão de dose aguda de paracetamol (500 mg/kg) por via i.g. no sétimo dia do tratamento.

- Grupo DMSO+P: animais que receberam por via i.g. 200 µL de DMSO 5% durante 7 dias consecutivos e que foram submetidos à ingestão de dose aguda de paracetamol (500 mg/kg) por via i.g. no sétimo dia do tratamento.
- Grupo EE150+P: animais que receberam por via i.g. 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (150 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos e que foram submetidos à ingestão de dose aguda de paracetamol (500 mg/kg) por via i.g. no sétimo dia do tratamento.
- Grupo EE300+P: animais que receberam por via i.g. 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (300 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos e que foram submetidos à ingestão de dose aguda de paracetamol (500 mg/kg) por via i.g. no sétimo dia do tratamento.
- Grupo EE600+P: animais que receberam por via i.g. 200 µL de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (600 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos e que foram submetidos à ingestão de dose aguda de paracetamol (500 mg/kg) por via i.g. no sétimo dia do tratamento.

O ensaio de proteção foi realizado com base no estudo de Ramanathan e Kittusamy (2011), com algumas modificações. Os animais receberam por via i.g. os tratamentos durante 7 dias consecutivos. Os grupos Paracetamol, DMSO+P, EE150+P, EE300+P e EE600+P receberam no sétimo dia, 1 hora após os devidos tratamentos, uma dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg) por via i.g. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital antes do início dos tratamentos e 24 horas após a ingestão do paracetamol e o soro foi obtido para posteriores análises das enzimas ALT, AST e ALP. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos: timo, baço, rim e fígado foram removidos, observados macroscopicamente e pesados. Os fígados foram colocados imediatamente em nitrogênio líquido (-196° C) e rapidamente armazenados a -80°C para análises posteriores da peroxidação lipídica, atividade da enzima superóxido dismutase e teores de glutathiona reduzida. Os estômagos foram removidos, lavados com água destilada e utilizados para confecção das lâminas para avaliação macroscópica das lesões.

5.5.3 Determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) no soro de camundongos

5.5.3.1 Coleta de soro

O sangue dos animais foi coletado individualmente e deixado em repouso durante 2 horas à temperatura ambiente para retração do coágulo. Após esse tempo, o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 8000 rpm, por dez minutos, para obtenção de um soro límpido, livre de hemácias, que foi então armazenado à -80° C para análises posteriores das atividades das enzimas ALT, AST, e ALP.

5.5.3.2 Atividade das enzimas ALT, AST e ALP

Foi utilizado o método cinético para a determinação da atividade sérica das enzimas ALT, AST e ALP, seguindo as recomendações do fabricante (Kit Labtest).

5.5.4 Determinação da peroxidação lipídica no fígado de camundongos

A peroxidação lipídica foi determinada por estimativa do malondialdeído (MDA) usando o teste do ácido tiobarbitúrico (AGAR *et al.*, 1999). O tecido foi homogeneizado em tampão KCl 10% (pH 7,4) para preparação do homogenato a 10%. Um volume de 250 µL do homogenato foi incubado em banho maria a 37°C por 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 400 µL de ácido perclórico 35% e as amostras centrifugadas a 14000 rpm por 10 min. A 600 µL do sobrenadante foram adicionados 200 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2% e levados ao banho maria a 95-100°C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi retirada e deixada à temperatura ambiente. Depois, transferiram-se 300 µL de cada tubo de eppendorf para os poços de uma placa (96 poços). As leituras foram realizadas em leitor de microplacas em comprimento de onda de 532 nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/ g de tecido.

5.5.5 Determinação de grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) no fígado de camundongos

A concentração de grupos sulfidrilas não proteicos foi medida pelo método espectrofotométrico de Sedlak e Lindsay (1968). O tecido foi homogeneizado com uma solução de EDTA 0,02 M gelada, para preparação do homogenato a 10%. Em seguida, foram adicionados a uma alíquota de 0,5 mL do homogenato, 0,4 mL de água destilada e 0,1 mL de ácido tricloroacético 50% e então as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Um volume de 0,5 mL foi então retirado do sobrenadante e adicionado 1 mL de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 25 µL de ácido ditionitrobenzólico (DTNB) 0,01 M. Após 5 minutos, 300 µL de cada tubo eppendorf foram transferidos para placas com 96 poços. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas a 412 nm. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de NP-SH/g de tecido.

5.5.6 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de camundongos

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método espectrofotométrico de Beauchamp e Fridovich (1971) com modificações. O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) para obtenção de um homogenato a 10% e centrifugado a 3600 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Numa câmara escura, em uma placa (96 poços) foram misturados em cada poço 5 µL da amostra (sobrenadante), 100 µL do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 100 nM e L-metionina 19,5 mM pH 7,8), 15 µL do nitro azul de tetrazólico (NBT) 750 µM e 30 µL de riboflavina 10 µM. Em seguida, a placa (96 poços) foi exposta à lâmpada fluorescente (20W) por 15 minutos. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%, por grama de proteína (U/g proteína). A concentração de proteína da amostra foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

5.5.6.1 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em placa (96 poços) foram adicionados em cada poço 10 µL de amostra (sobrenadante preparado no item anterior 5.5.6) e 100 µL de reagente de Bradford. Após 15 minutos, a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada através de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados expressos em mg de proteína/g de tecido.

5.5.7 Análise das lesões dos estômagos

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos removidos, lavados com água destilada e colocados em lâminas. Após preparação das lâminas, os danos dos estômagos foram avaliados visualmente.

5.6 Análise estatística

O GraphPad Prisma software (version 5.0.2) foi usado para a análise estatística dos dados. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. Para os resultados paramétricos, para comparar os dados entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Para os resultados não paramétricos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Perfil fitoquímico do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*)

A determinação qualitativa da composição fitoquímica do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (EE) revelou a presença de fenois, flavonas, flavonois, xantonas, taninos, esteroides e saponinas (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização fitoquímica do extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini*.

Constituintes fitoquímicos	
Fenois	+
Taninos condensados	+
Taninos hidrolisáveis	-
Flavonas, flavonois e xantonas	+
Flavanonois	-
Flavanonas	-
Catequinas	-
Esteroides	+
Triterpenoides	-
Saponinas	+
Alcaloides	-

(+) Presença e (-) Ausência.

6.2 Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*)

6.2.1 Determinação de antioxidantes não enzimáticos

A tabela 2 mostra os teores de compostos bioativos em extrato etanólico de folhas de azeitona da terra. O teor de vitamina C determinado foi de $34 \text{ mg} \pm 1,25/100 \text{ g}$ de extrato. O conteúdo de polifenóis extraíveis totais (PET) foi de 16.792 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) $\pm 79,19/100 \text{ g}$ de extrato. Os resultados obtidos para antocianinas, flavonoides amarelos e carotenoides totais foram $180,94 \text{ mg} \pm 2,67$; $257,28 \text{ mg} \pm 0,37$ e $14,76 \text{ mg} \pm 0,32/100 \text{ g}$ de extrato, respectivamente.

Tabela 2. Teor de compostos bioativos em extrato etanólico de folhas *Syzygium cumini*.

Compostos bioativos*	
Vitamina C (mg/100 g extrato)	$34,00 \pm 1,25$
Polifenóis extraíveis totais (mg GAE/ 100 g extrato)	$16.792 \pm 79,19$
Antocianinas (mg/100 g extrato)	$180,94 \pm 2,67$
Flavonoides amarelos (mg/100 g extrato)	$257,28 \pm 0,37$
Carotenoides totais (mg/100 g extrato)	$14,76 \pm 0,32$

*Média \pm desvio padrão de análise em duplicata.

6.2.2 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total, determinada pelos métodos ABTS e DPPH, foi de $2.148,88 \pm 140,26 \mu\text{M Trolox/ g}$ e $87,11 \pm 1,58 \text{ g de amostra/ g de DPPH}$, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini*.

Atividade Antioxidante*	
ABTS ($\mu\text{M Trolox/g}$)	2.148,88 \pm 140,26
DPPH (g amostra/g DPPH)	87,11 \pm 1,58

*Média \pm desvio padrão de análise em duplicata.

6.3 Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*)

Para avaliar a toxicidade, o extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (EE) foi administrado por oito dias consecutivos em camundongos por via oral nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg e distintos parâmetros comportamentais, fisiológicos e bioquímicos foram igualmente avaliados.

Como pode ser observado na tabela 4, EE não apresentou toxicidade com nenhuma das doses estudadas. Não houve morte, perda de peso e nem alterações comportamentais e fisiológicas, tais como frequências respiratória e cardíaca, diarréia, lacrimejamento, sialorréia e eriçamento de pelos.

Tabela 4. Avaliação da toxicidade do extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini*.

Grupos	Mortalidade	Peso (g)		Sintomas tóxicos
		Dia 0*	Dia 8*	
Controle	0/10	32,63 ± 3,21	33,9 ± 3,41	-
DMSO	0/10	32,59 ± 1,82	34,29 ± 1,89	-
EE 150	0/10	31,81 ± 2,46	33,01 ± 2,42	-
EE 300	0/10	31,92 ± 2,37	33,71 ± 2,88	-
EE 600	0/10	32,75 ± 1,66	33,75 ± 2,04	-
EE 1200	0/10	33,06 ± 1,36	33,1 ± 2,17	-

Controle (Grupo tratado com solução salina); DMSO (Grupo tratado com DMSO 5%); EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente). *Valores são dados como média ± desvio padrão (n=10). (-) ausência de sintomas tóxicos.

Para avaliar a hepatotoxicidade, as atividades das enzimas ALT (Figura 7) e AST (Figura 8) no soro dos camundongos e a peroxidação lipídica nos hepatócitos (Figura 9) foram determinadas. Os valores da atividade de ALT (média ± desvio padrão, n= 10) para o grupo controle e DMSO foram 77,39 ± 15,73 e 60,83 ± 18,65 U/L, respectivamente. Para os grupos tratados com EE nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg foram 92,74 ± 25,27; 92,57 ± 23,70; 83,31 ± 18,91 e 69,65 ± 36,86 U/L, respectivamente. Os dados da atividade de AST (média ± desvio padrão, n= 10) para o grupo controle e DMSO foram 44,61 ± 10,04 e 38,51 ± 17,08 U/L, respectivamente. Para os grupos tratados com EE nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg foram 43,89 ± 9,73; 49,00 ± 10,2; 47,40 ± 8,40 e 40,39 ± 12,19 U/L, respectivamente. Não foram observadas mudanças significativas ($p > 0,05$) nas atividades de ALT e AST nos grupos tratados com extrato (EE 150, EE 300, EE 600 e EE 1200) quando comparados com o grupo controle (Figuras 7 e 8).

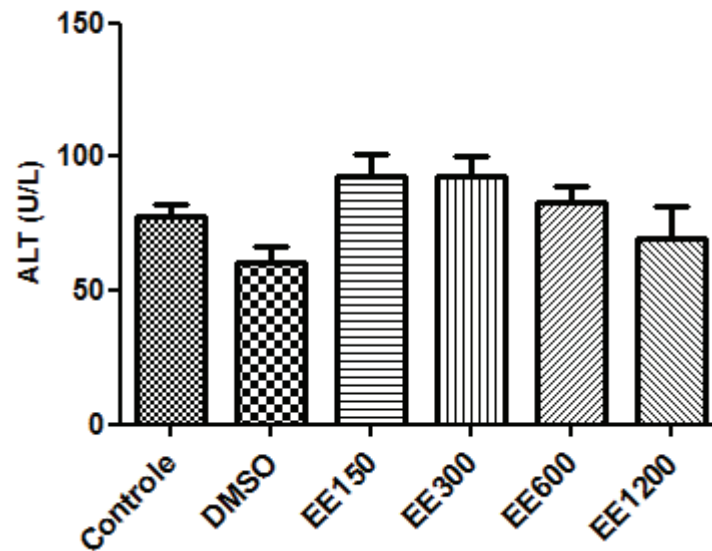


Figura 7: Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a atividade da alanina aminotransferase (ALT). A atividade da ALT foi determinada em soro de camundongos após diferentes tratamentos por 8 dias. O grupo controle corresponde aos animais que ingeriram apenas solução salina. O grupo DMSO corresponde aos animais que receberam DMSO a 5%. Os grupos EE 150, EE 300, EE 600 e EE 1200 correspondem aos animais que receberam extrato etanólico de folhas de azeitona da terra nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg, respectivamente.

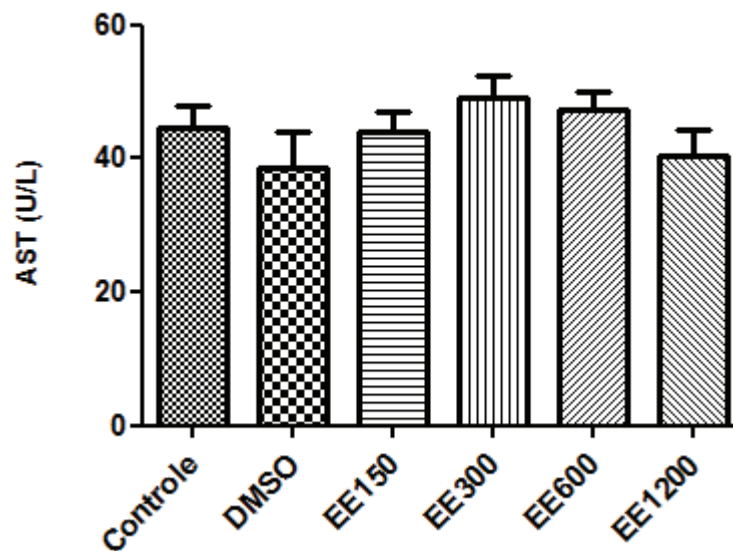


Figura 8: Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a atividade da aspartato aminotransferase (AST). A atividade da AST foi determinada em soro de camundongos após diferentes tratamentos por 8 dias. O grupo controle corresponde aos animais que ingeriram apenas solução salina. O grupo DMSO corresponde aos animais que receberam DMSO a 5%. Os grupos EE 150, EE 300, EE 600 e EE 1200 correspondem aos animais que receberam extrato etanólico de folhas de azeitona da terra nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg, respectivamente.

A figura 9 apresenta os resultados da lipoperoxidação nos hepatócitos. Não houve diferença significativa nos níveis de MDA entre os grupos tratados com extrato nas diferentes doses (EE 150, EE 300, EE 600 e EE 1200) e o grupo controle ($p > 0,05$). Os valores de MDA (média \pm desvio padrão, $n = 10$) para os grupos controle e DMSO foram $1,541 \pm 0,33$ e $1,514 \pm 0,39$ nmol/ g de tecido, respectivamente. Para os grupos tratados com EE nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg foram $1,346 \pm 0,33$; $1,603 \pm 0,39$; $1,644 \pm 0,28$ e $1,478 \pm 0,19$ nmol/ g de tecido, respectivamente.

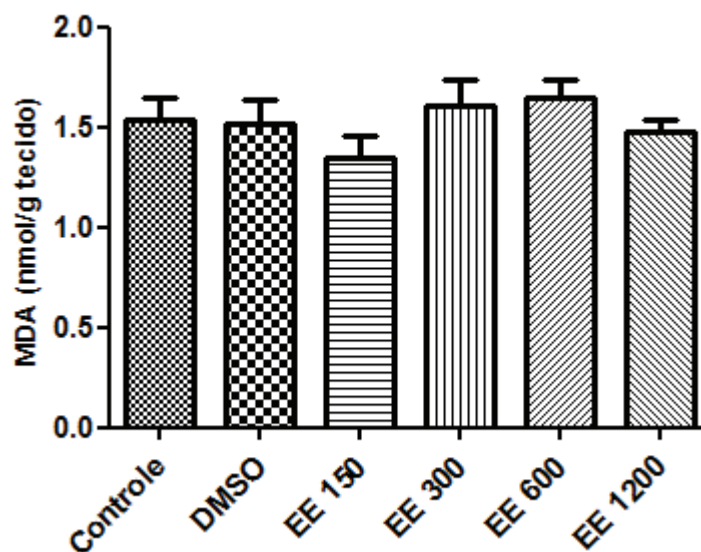


Figura 9: Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra sobre a peroxidação lipídica. A formação de malondialdeído (MDA) foi determinada em homogenatos de fígados de camundongos após diferentes tratamentos por 8 dias. O grupo controle corresponde aos animais que ingeriram apenas solução salina. O grupo DMSO corresponde aos animais que receberam DMSO a 5%. Os grupos EE 150, EE 300, EE 600 e EE 1200 correspondem aos animais que receberam extrato etanólico de folhas de azeitona da terra nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg, respectivamente.

Para verificar se o extrato etanólico de folhas de azeitona da terra nas doses de 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg estavam induzindo lesões gástricas, lâminas dos estômagos dos animais foram analisadas macroscopicamente (Figura 10). Os estômagos de animais tratados com EE não apresentaram lesões na mucosa gástrica, ou seja, não foram observadas visualmente lesões teciduais em nenhum estômago dos camundongos tratados com as diferentes doses de extrato quando comparados com aqueles do grupo controle.

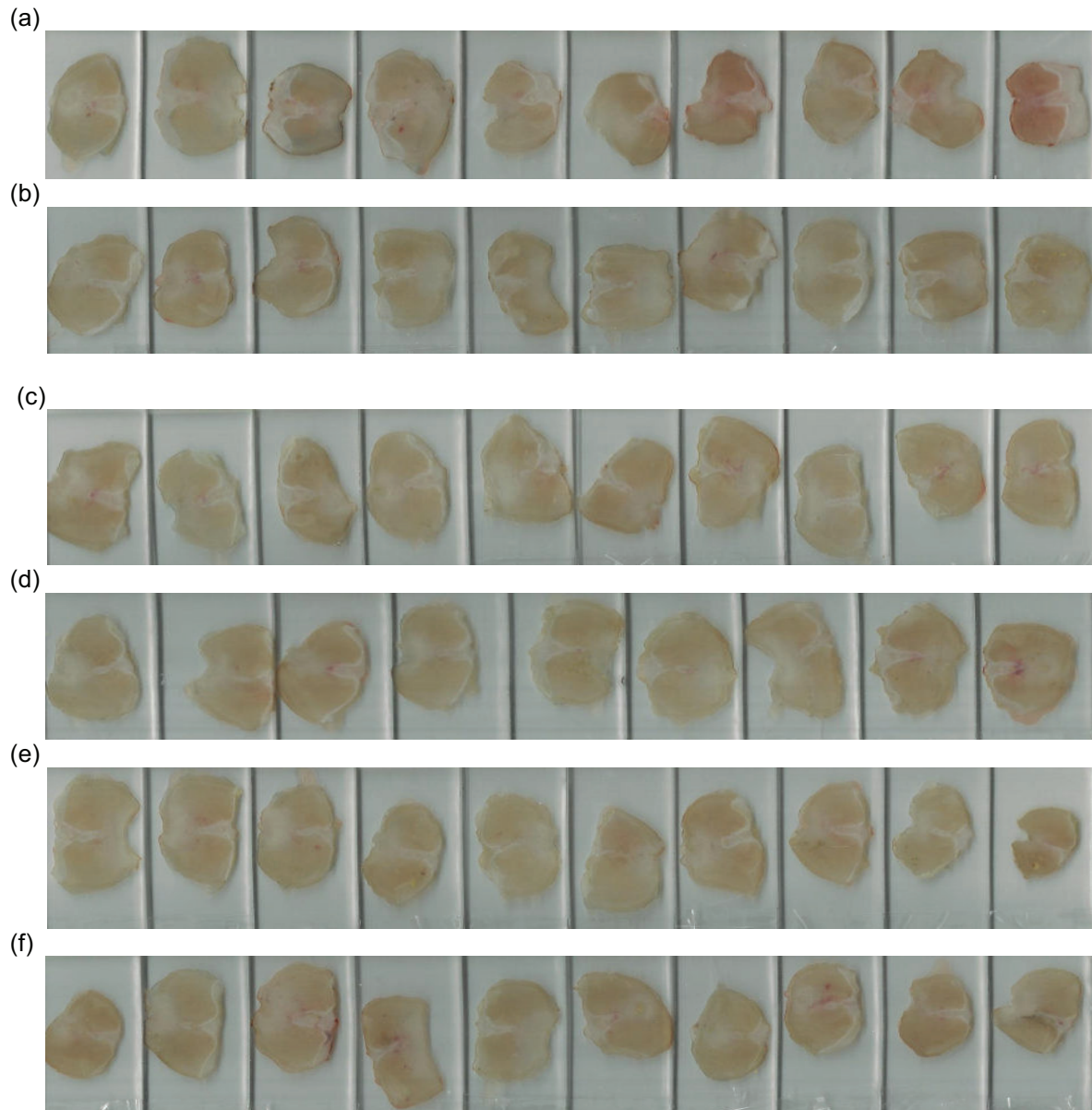


Figura 10: Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*) sobre a mucosa gástrica. Estômagos de animais que receberam (a) solução salina; (b) DMSO A 5%; (c), (d), (e) e (f): extrato etanólico de folhas de azeitona da terra nas doses 150, 300, 600 e 1200 mg/Kg, respectivamente.

6.4 Avaliação do efeito protetor do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*) contra estresse oxidativo induzido por paracetamol

Para avaliar o efeito protetor do extrato etanólico (EE) de folhas de azeitona da terra, os camundongos foram divididos em 10 grupos: controle, DMSO, EE150, EE300 e EE600 nos quais os animais receberam por via oral, durante 7 dias consecutivos, somente solução salina, DMSO e EE (150, 300 e 600 mg/Kg), respectivamente. Além dos grupos paracetamol, DMSO+P, EE150+P, EE300+P e

EE600+P nos quais os animais receberam por via oral, durante 7 dias consecutivos, solução salina, DMSO e EE (150, 300 e 600 mg/Kg), respectivamente e posteriormente receberam uma dose aguda, por via oral de paracetamol (500 mg/Kg). A tabela 5 apresenta os resultados referentes à mortalidade, peso dos animais e peso relativo dos órgãos (fígado, rim, baço e timo). Não houve redução no peso dos animais tratados ou não com EE (150, 300, 600 mg/Kg) e/ou paracetamol. Quanto ao peso relativo dos órgãos, não houve diferença significativa do peso de nenhum dos órgãos avaliados entre os diferentes grupos analisados ($p > 0,05$). Em relação à mortalidade, foram registradas mortes de animais nos grupos Paracetamol, DMSO+P, EE150+P, EE300+P. Não foi registrada morte no grupo EE600+P.

Tabela 5. Efeito da administração de diferentes doses de extrato etanólico de *Syzygium cumini* no peso do corpo e no peso relativo dos órgãos de animais submetidos a estresse por paracetamol.

Grupos	Mortalidade nº de mortes/ n	Peso (g) Dia 0*	Peso (g) Dia 7*	Peso relativo fígado*	Peso relativo rim*	Peso relativo baço*	Peso relativo timo*
Controle	0/10	33,88 ±	35,77 ±	0,04622 ±	0,007254	0,002764	0,0009142
		1,915	2,515	0,0026	± 0,0010	± 0,0005	± 0,0003
DMSO	0/10	32,14 ±	33,60 ±	0,04681 ±	0,008221	0,002313	0,0009925
		2,175	2,026	0,0033	± 0,0008	± 0,0002	± 0,0003
EE150	0/10	32,61 ±	34,79 ±	0,04387 ±	0,007436	0,002807	0,001047 ±
		2,512	2,897	0,0025	± 0,0006	± 0,0006	0,0002
EE300	0/10	32,59 ±	34,76 ±	0,04456 ±	0,007400	0,002708	0,001122 ±
		1,987	2,466	0,0031	± 0,0009	± 0,0005	0,0002
EE600	0/10	32,58 ±	34,44 ±	0,04427 ±	0,007313	0,002229	0,001130 ±
		1,835	1,819	0,0033	± 0,0007	± 0,0003	0,0002
Paracetamol	1/10	35,46 ±	36,56 ±	0,04751 ±	0,007745	0,002513	0,0008652
		2,324	1,909	0,0055	± 0,0008	± 0,0005	± 0,0003
DMSO+P	2/10	33,75 ±	35,70 ±	0,04480 ±	0,007193	0,002058	0,0007585
		2,348	2,806	0,0023	± 0,0008	± 0,0003	± 0,0002
EE150+P	1/10	31,50 ±	33,56 ±	0,04363 ±	0,007584	0,002413	0,001114 ±
		2,045	2,190	0,0045	± 0,0006	± 0,0007	0,0001
EE300+P	1/10	33,96 ±	35,97 ±	0,04283 ±	0,007242	0,002013	0,0009121
		1,264	1,408	0,0027	± 0,0006	± 0,0004	± 0,0002
EE600+P	0/10	30,95 ±	33,02 ±	0,04257 ±	0,007148	0,002170	0,0009886
		1,430	1,230	0,0021	± 0,0007	± 0,0004	± 0,0002

Controle (Grupo que recebeu solução salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol; DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol. EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). *Valores são dados como média ± desvio padrão (n=10).

A administração de paracetamol causou danos no fígado como foi evidenciado por alteração nos parâmetros bioquímicos do soro e do fígado de camundongos (Figuras 11-16). Por outro lado, o pré-tratamento com EE conferiu proteção contra danos induzidos por paracetamol em camundongos (Figuras 11-16).

Como apresentado na figura 11, os animais que receberam uma dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg) revelaram uma elevação significativa na atividade da ALT (55, 89% e 51,55%) no soro dos grupos paracetamol e DMSO+P comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, os animais que foram pré-tratados com EE mostraram atividades de ALT reduzidas quando se compara com o grupo paracetamol, os valores de redução para EE150+P, EE300+P e EE600+P foram 23,60%, 33,92%, e 56,94%, respectivamente. Essa diminuição foi considerada significativa no grupo EE600+P ($p < 0,05$). Os animais que foram tratados somente com extrato (grupos EE150, EE300 e EE600) apresentaram valores de atividade de ALT semelhantes ao do grupo controle ($p > 0,05$).

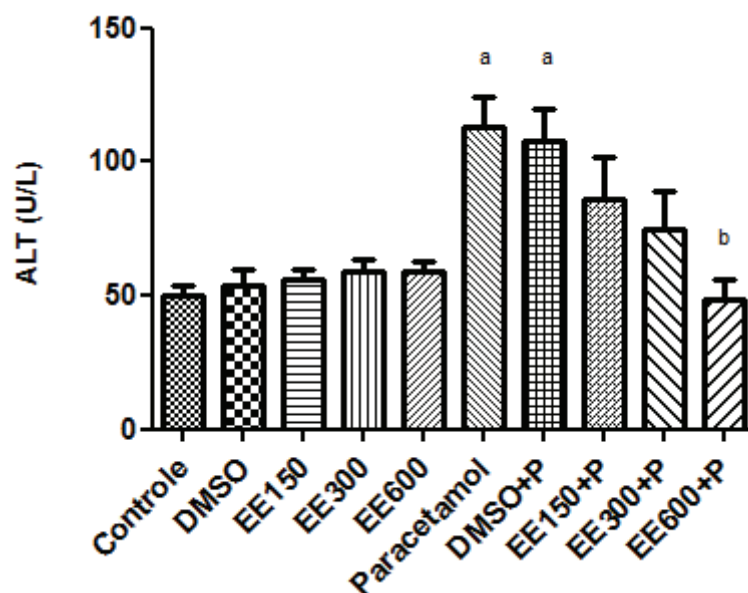


Figura 11. Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* na atividade da alanina aminotransferase (ALT) em soro de camundongos tratados com paracetamol. Controle (Grupo que recebeu salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol); DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol. EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). Dados são dados como média \pm desvio padrão ($n=10$). ^aGrupos que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,05$); ^b Grupos pré-tratados com DMSO 5% e extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) que diferem significativamente do grupo paracetamol ($p<0,05$).

A figura 12 apresenta o efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra na atividade da AST. Os resultados mostram que os animais tratados com uma dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg) apresentaram um aumento significativo na atividade da AST no soro dos grupos paracetamol (25,01%) e DMSO+P (25,28%) comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, foi observada uma redução nas atividades de AST nos animais pré-tratados com EE quando se compara com o grupo paracetamol, a diminuição foi de 10,04 %; 17,48% e 30,14% para os grupos EE150+P, EE300+P e EE600+P, respectivamente. Essa redução foi considerada significativa no grupo EE600+P ($p < 0,05$). Os animais que receberam apenas extrato (grupos EE150, EE300 e EE600) não diferiram significativamente do grupo controle ($p > 0,05$).

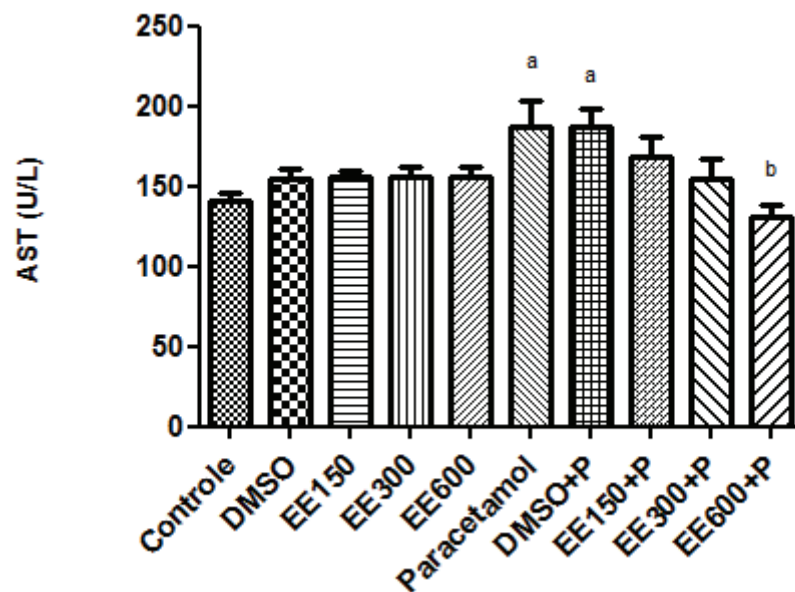


Figura 12. Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* na atividade da aspartato aminotransferase (AST) em soro de camundongos tratados com paracetamol. Controle (Grupo que recebeu salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol); DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol. EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). Dados são dados como média \pm desvio padrão ($n=10$). ^aGrupos que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,05$); ^b Grupos pré-tratados com DMSO 5% e extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) que diferem significativamente do grupo paracetamol ($p<0,05$).

Na figura 13, estão representados os resultados das atividades da fosfatase alcalina no soro de camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. As atividades da ALP foram elevadas nos animais submetidos a uma dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg), esse aumento foi de 27,94% e 26,58% nos animais dos grupos paracetamol e DMSO+P comparados com o grupo controle ($p < 0,05$), respectivamente. Enquanto que os animais que foram pré-tratados com EE apresentaram atividades de ALP reduzidas quando se compara com o grupo paracetamol, a redução para EE150+P, EE300+P e EE600+P foi de 4,32%; 32,68% e 32,68%, respectivamente. Essa diminuição foi considerada significativa nos grupos EE300+P e EE600+P ($p < 0,05$). Os animais que foram tratados somente com extrato (grupos EE150, EE300 e EE600) apresentaram atividades de ALP no soro similares à do grupo controle ($p > 0,05$).

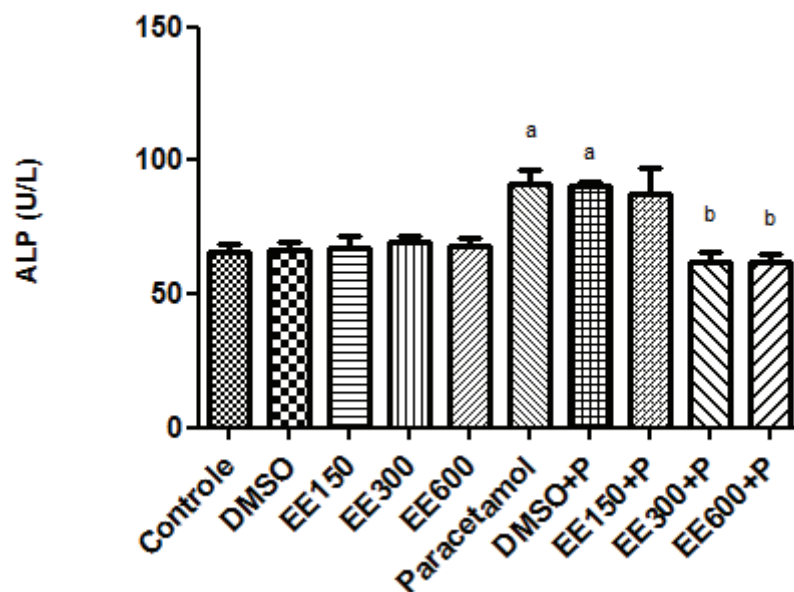


Figura 13. Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* na atividade da fosfatase alcalina (ALP) em soro de camundongos tratados com paracetamol. Controle (Grupo que recebeu salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol); DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol). EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). Dados são dados como média \pm desvio padrão ($n=10$). ^aGrupos que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,05$); ^b Grupos pré-tratados com DMSO 5% e extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) que diferem significativamente do grupo paracetamol ($p<0,05$).

A figura 14 apresenta os teores de MDA nos fígados de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. A concentração de MDA em fígados de camundongos submetidos ao estresse com paracetamol (500 mg/Kg) foi significativamente aumentada nos grupos paracetamol (37,68%) e DMSO+P (35,42%) quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, o pré-tratamento com EE (150, 300 e 600 mg/kg) preveniu uma elevação nos níveis de MDA induzida por paracetamol. A redução foi de 25,68%; 31,67% e 31,97% nos grupos EE150+P, EE300+P e EE600+P em comparação com o grupo paracetamol, respectivamente. Essa diminuição foi considerada significativa ($p < 0,05$) para todos os grupos pré-tratados com extrato (EE150+P, EE300+P e EE600+P). Os animais que foram tratados apenas com extrato (grupos EE150, EE300 e EE600) não diferiram significativamente do grupo controle ($p > 0,05$).

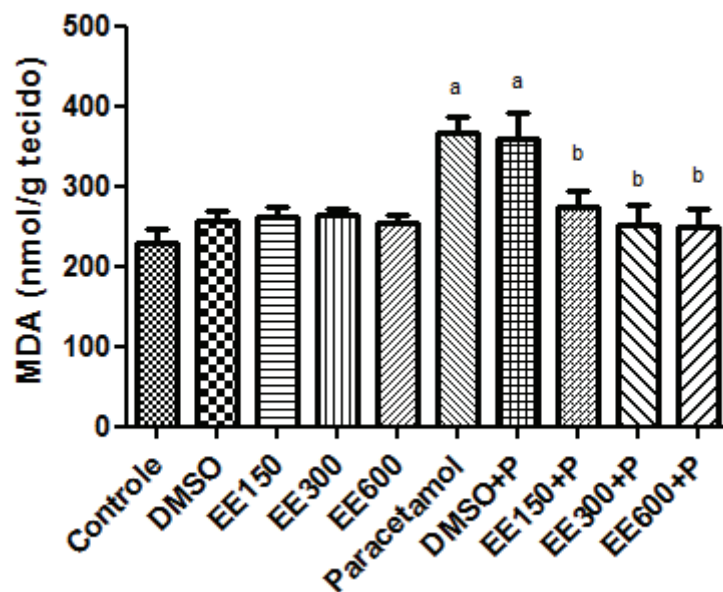


Figura 14. Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em fígado de camundongos tratados com paracetamol. Controle (Grupo que recebeu salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol); DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol). EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). Dados são dados como média \pm desvio padrão ($n=10$). ^aGrupos que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,05$); ^b Grupos pré-tratados com DMSO 5% e extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) que diferem significativamente do grupo paracetamol ($p<0,05$).

A variação nos níveis de grupos sulfidrilas (NP-SH) no fígado está representada na figura 15. Os níveis de NP-SH foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidos após a administração de paracetamol (500 mg/Kg) de 85,02% no grupo paracetamol e 90,56% no grupo DMSO+P, quando comparados com o grupo controle. Em contraste, a depleção de NP-SH induzida por paracetamol foi menor nos grupos tratados com EE (150, 300 e 600 mg/Kg). O aumento nos níveis de NP-SH foi de 46,71%, 56,74% e 63,61% nos grupos EE150+P, EE300+P e EE600+P quando comparados com o grupo paracetamol, respectivamente. Essa elevação foi considerada significativa nos grupos EE300+P e EE600+P ($p < 0,05$). Os animais que foram tratados somente com extrato (grupos EE150, EE300 e EE600) não diferiram significativamente do grupo controle ($p > 0,05$).

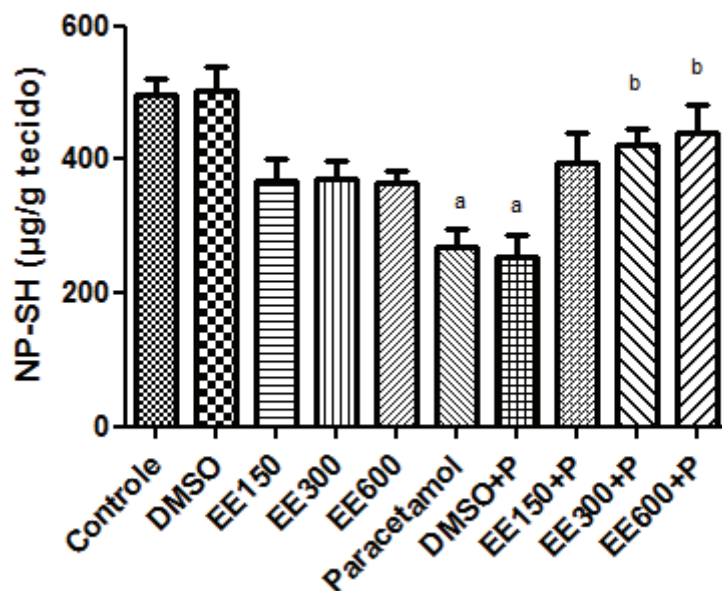


Figura 15. Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nos níveis de grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) em fígado de camundongos tratados com paracetamol. Controle (Grupo que recebeu salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol); DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol. EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). Dados são dados como média \pm desvio padrão ($n=10$). ^aGrupos que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,05$); ^b Grupos pré-tratados com DMSO 5% e extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) que diferem significativamente do grupo paracetamol ($p<0,05$).

O efeito do tratamento de EE sobre a atividade da SOD em camundongos submetidos a uma dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg) está representado na figura 16. A administração de paracetamol reduziu significativamente a atividade da SOD nos grupos paracetamol (68,19%) e DMSO+P (72,32%) em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$), respectivamente. O pré-tratamento com EE nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg elevou a atividade da SOD em torno de 60,03% (grupo EE150+P), 63,67% (grupo EE300+P) e 69,12% (grupo EE600+P) quando comparados com o grupo paracetamol. Esse aumento foi considerado significativo em todos os grupos pré-tratados com extrato (EE150+P, EE300+P e EE600+P) com $p < 0,05$. Os animais que foram tratados somente com extrato (grupos EE150, EE300 e EE600) apresentaram valores semelhantes ao do grupo controle ($p > 0,05$).

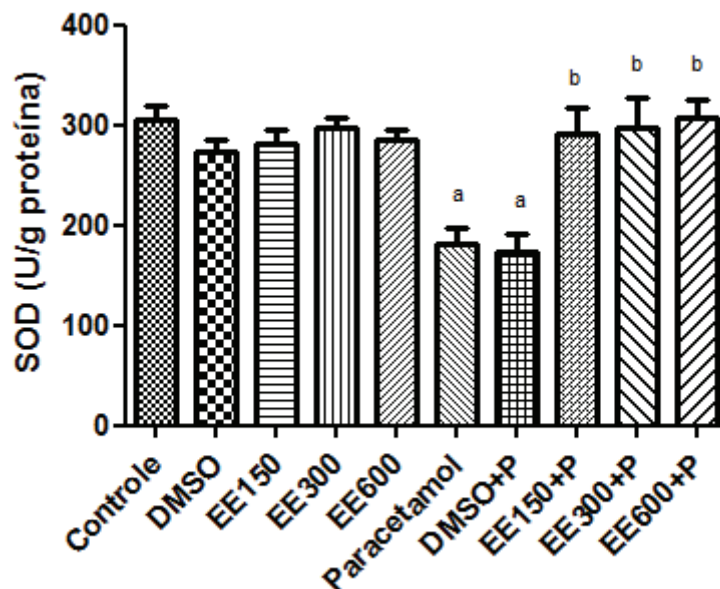
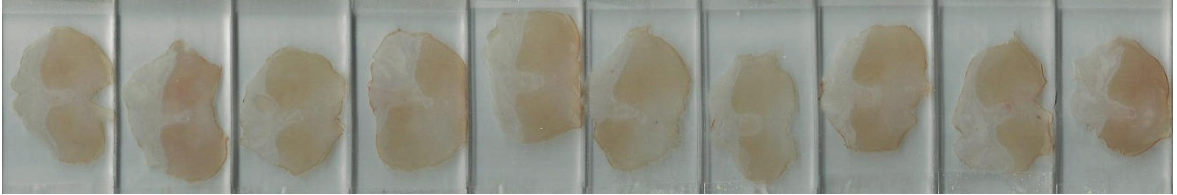


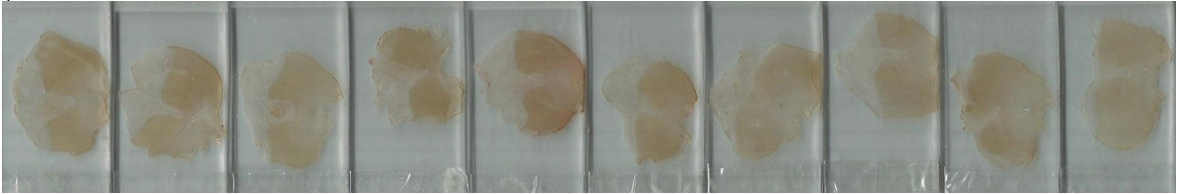
Figura 16. Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* na atividade da superóxido dismutase (SOD) em fígado de camundongos tratados com paracetamol. Controle (Grupo que recebeu salina); Paracetamol (Grupo que recebeu solução salina e uma dose aguda de paracetamol); DMSO (Grupo que recebeu DMSO a 5%); DMSO+P (Grupo que recebeu DMSO a 5% e uma dose aguda de paracetamol). EE 150, EE 300 e EE 600 (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente); EE150+P, EE300+P e EE600+P (Grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *Syzygium cumini* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg respectivamente e uma dose aguda de paracetamol). Dados são dados como média \pm desvio padrão ($n=10$). ^aGrupos que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,05$); ^b Grupos pré-tratados com DMSO 5% e extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) que diferem significativamente do grupo paracetamol ($p<0,05$).

Quanto aos estômagos, não foram observadas lesões na mucosa gástrica dos grupos tratados com paracetamol quando comparados com o grupo controle (Figura 17).

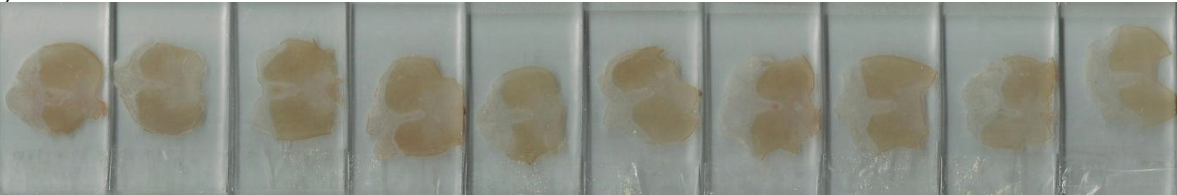
(a)



(b)



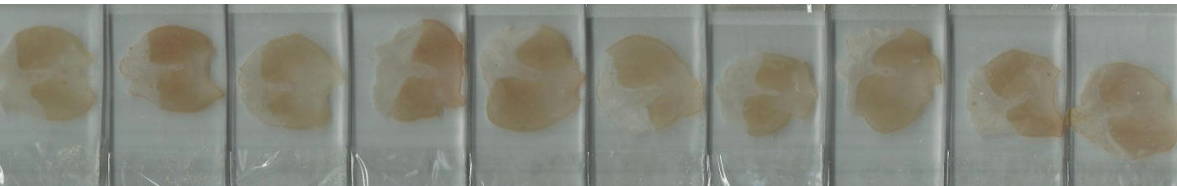
(c)



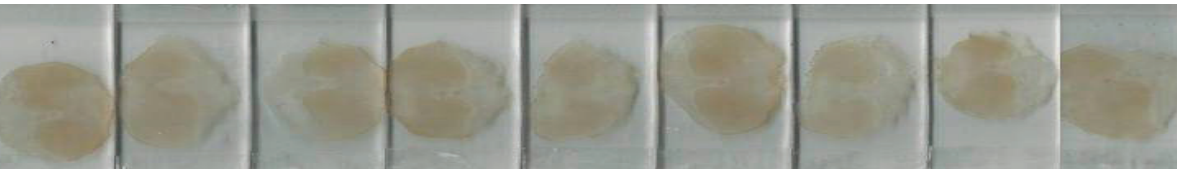
(d)



(e)



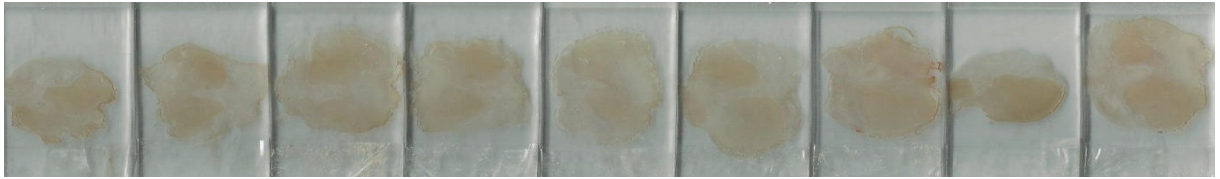
(f)



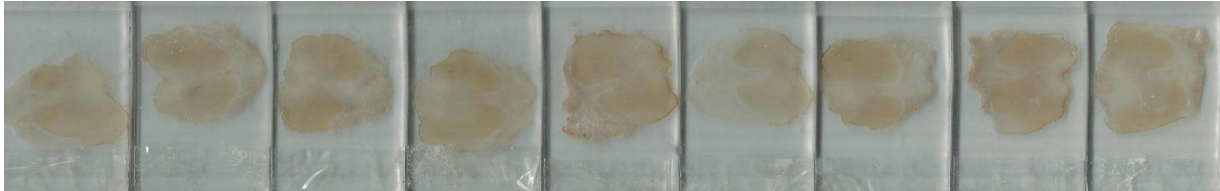
(g)



(h)



(i)



(j)



Figura 17: Efeito da administração de extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*) sobre a mucosa gástrica de camundongos tratados com paracetamol. Estômagos de animais que receberam (a) solução salina; (b) DMSO a 5%; (c), (d) e (e): extrato etanólico de folhas de azeitona da terra nas doses 150, 300 e 600 mg/Kg, respectivamente; (f) paracetamol; (g) DMSO a 5% + paracetamol; (h), (i) e (j): extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (doses 150, 300 e 600 mg/Kg) + paracetamol, respectivamente.

7 DISCUSSÃO

Extratos de plantas medicinais têm apresentado diversas atividades biológicas, dentre as quais podem ser citadas as propriedades terapêuticas no tratamento de desordens, principalmente no fígado (HURKADALE *et al.*, 2012; SETTY *et al.*, 2007; YOU *et al.*, 2010). A fim de determinar propriedades terapêuticas do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*), o mesmo foi testado quanto aos seus constituintes fitoquímicos, potencial antioxidante, bem como uma possível toxicidade quando administrado por via oral e em relação ao seu efeito hepatoprotetor contra danos induzidos por paracetamol.

Para determinação da composição fitoquímica, o EE foi testado seguindo a metodologia de Matos (2009). A partir de análises qualitativas, determinou-se a presença de fenois, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e saponinas no EE (Tabela 1). Esses resultados corroboram com os de Arun *et al.* (2011) que mostraram que os extratos aquoso, etanólico, acetônico e de acetato de etila de sementes de *Syzygium cumini* apresentavam diversos compostos, dentre os quais carboidratos, fitoesteróis, fenois, taninos e flavonoides. Foram determinados ainda os teores de vitamina C, polifenóis extraíveis totais (PET), antocianinas, flavonoides amarelos e carotenoides totais (Tabela 3). Dentre os fitoquímicos determinados no EE, os polifenóis extraíveis foram predominantes, representando 99,71%. Rufino *et al.* (2010) avaliando a fruta de *Syzygium cumini* encontrou teores menores de antocianinas (93,3 mg/100 g de fruto), flavonoides amarelos (70 mg/100 g de fruto) e carotenoides totais (0,51 mg/100 g de fruto) e maior teor de vitamina C (112 mg/100 g de fruto). Jeong *et al.* (2010) relataram em extrato etanólico de frutos e sementes de *Rubus occidentalis* 38 mg de ácido ascórbico/100 g extrato. Enquanto Faria, Marques e Mercadante (2011) encontraram em extrato de fruta de *Syzygium cumini* um valor menor que 0,01 mg de ácido ascórbico/ 100 g extrato. Sabir *et al.* (2012) mostraram um valor de PET (22.600 mg GAE/100 g extrato) para extrato etanólico de folhas de *Solidago microglossa* superior ao determinado para EE. Em contraste, Jeong *et al.* (2010) demonstraram um valor de PET em extrato etanólico da fruta de *Rubus occidentalis* (560 mg GAE/ 100 g de extrato) inferior ao desse estudo com azeitona da terra. Faria, Marques e Mercadante (2011) encontraram valores inferiores de PET (148,3 mg/100 g extrato) e carotenoides totais (0,089 mg/100 g extrato) para extrato de frutas de *Syzygium cumini*, quando comparados com os

valores encontrados para o extrato etanólico das folhas. Vale salientar que extratos de plantas e ervas que contêm diferentes classes de polifenóis são muito atrativos não só para a fitoterapia, mas também para a indústria de alimentos (SABIR; ROCHA, 2008b).

Para avaliar a atividade antioxidante total *in vitro*, foram utilizados os métodos ABTS e DPPH. O extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*) mostrou elevada atividade antioxidante tanto pelo ensaio do ABTS, quanto pelo DPPH (Tabela 3). A atividade antioxidante de EE pode ser atribuída aos compostos fitoquímicos presentes, provavelmente os polifenóis que foram encontrados em maior percentual (99,71%) entre os compostos analisados. BASMA *et al.* (2011) trabalhando com extrato de *Euphorbia hirta* L. correlacionou que 98,89% da atividade antioxidante foi resultante dos compostos fenólicos, mas não estando limitada somente a esses compostos.

Uma vez determinado a presença e os teores de compostos bioativos e a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra e que o mesmo apresentou elevado potencial na captura de radicais livres, seguiu-se para os ensaios *in vivo*, inicialmente avaliando-se a toxicidade de EE e em seguida o seu efeito hepatoprotetor contra estresse induzido por paracetamol.

A toxicidade do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra (*Syzygium cumini*) foi avaliada, uma vez que os produtos naturais nem sempre podem ser considerados seguros, havendo necessidade de testar possíveis efeitos tóxicos do consumo dos mesmos (YOU *et al.*, 2010). EE não apresentou toxicidade com nenhuma das doses estudadas (Tabela 4). Não houve morte, perda de peso e nem alterações comportamentais e fisiológicas, tais como frequências respiratória e cardíaca, diarreia, lacrimejamento, sialorréia e eriçamento de pelos. Portanto, EE mostrou-se seguro quando usado em doses de até 1200 mg/Kg. Quanto ao peso do corpo dos animais, não foi observada redução significativa durante os 8 dias de tratamento e observação (Tabela 4) para todos os grupos, exceto para o grupo dos animais tratados com EE na dose de 1200 mg/Kg, em que não houve redução, mas também não houve ganho de peso significativo durante os 8 dias de tratamento. Fukuda *et al.* (2011) mostraram que o tratamento com extrato quente de *Glycine max* até concentrações de 2% não causou alterações significativas no peso do corpo dos animais e peso relativo do fígado, baço e rim de camundongos machos tratados por 26 semanas. Dados semelhantes foram também encontrados por Sabir e Rocha

(2008a) que avaliaram a toxicidade de extrato aquoso de *Solanum fastigiatum* em camundongos, revelando que não houve morte ou nem redução significativa no peso do corpo dos animais durante todo o período de experimento. O ensaio de toxicidade mostrou que o tratamento com EE não elevou significativamente a atividade das enzimas séricas ALT e AST e nem induziu peroxidação lipídica (Figuras 7-9). Esses resultados indicam que o tratamento com EE nas diferentes doses não provocou danos hepáticos. Silva *et al.* (2012), avaliando a toxicidade de extrato hidroetanólico de folhas de *Syzygium cumini* em ratos e Sabir e Rocha (2008a), a toxicidade de extrato aquoso de *Solanum fastigiatum* em camundongos mostraram que não houve diferenças significativas na atividade das enzimas ALT e AST, resultados semelhantes aos determinados para EE. É importante salientar que a avaliação de parâmetros bioquímicos, tais como as atividades das enzimas ALT e AST são de extrema importância, pois refletem o estado geral do corpo do animal, além do estado específico dos órgãos, especialmente em relação às funções hepáticas (SILVA *et al.*, 2012). A elevação dessas enzimas no soro e dos níveis de MDA no fígado sugere danos hepáticos (KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2007; SENER; SEHIRLI; AYANOĞLU-DÜLGER, 2003). Além disso, não foram observadas lesões macroscópicas na mucosa gástrica de camundongos tratados com EE, mostrando que EE não causou alteração nos estômagos (Figura 10).

Outra etapa do trabalho consistiu em verificar o efeito protetor do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra em camundongos tratados com dose aguda paracetamol. A escolha do paracetamol como indutor de estresse oxidativo deve-se ao fato dele causar danos em múltiplos órgãos, principalmente no fígado (YOUSEF *et al.*, 2010). Há variação entre a hepatotoxicidade induzida por paracetamol nas diferentes espécies de animais, mas os camundongos estão entre as espécies mais suscetíveis e frequentemente são usados nos estudos (DAVIS *et al.*, 1974 *apud* LEE *et al.*, 2001). O efeito protetor foi verificado a partir de dosagens das atividades das enzimas séricas ALT, AST e ALP, bem como da SOD e dos níveis de NP-SH, além da peroxidação lipídica. Danos hepáticos induzidos por paracetamol têm sido marcados por um aumento nas atividades de ALT, AST e ALP no soro e plasma (YOUSEF *et al.*, 2010). Tratamento com paracetamol também está associado com a inibição das atividades das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT), bem como redução nos níveis de GSH e aumento da peroxidação lipídica no fígado e plasma (JAESCHKE; KNIGHT; BAJIT, 2003; LIU; LU; PENG, 2011; YOUSEF *et al.*, 2010).

Nesse trabalho não foram observadas redução no peso dos animais e nem alteração significativa no peso relativo dos órgãos dos animais tratados com EE e submetidos ou não a estresse por dose única de paracetamol (Tabela 5). Girish et al. (2009a) também trabalharam com indução da hepatotoxicidade por dose aguda de paracetamol (500 mg /Kg) em camundongos e observaram aumento significativo do peso absoluto do fígado do grupo tratado com paracetamol em comparação ao grupo controle.

A administração de paracetamol (500 mg/kg) causou danos no fígado como foi evidenciado por alteração nos parâmetros bioquímicos do soro e do fígado de camundongos (Figuras 11-16). Por outro lado, o pré-tratamento com EE revelou-se protetor contra danos induzidos por paracetamol em camundongos (Figuras 11-16). Os animais dos grupos paracetamol e DMSO+P apresentaram uma elevação significativa ($p < 0,05$), respectivamente, nas atividades de ALT (55,89% e 51,55%), AST (25,01% e 25,28%) e ALP (27,94% e 26,58%), quando comparados ao grupo controle (Figuras 11 a 13). O grupo EE600+P apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) tanto para a atividade de ALT de 56,94%, quanto para AST de 30,14%, quando comparado ao grupo paracetamol (Figuras 11 e 12). Os grupos tratados com EE nas doses de 300 e 600 mg/Kg apresentaram uma diminuição significativa na atividade de ALP de 32,68% para EE300+P ($p < 0,05$) e de 32,68% para EE600+P ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo paracetamol (Figura 13). Todas estas enzimas avaliadas funcionam como marcadores empregados no diagnóstico de doenças no fígado, normalmente presentes no citosol são liberadas na corrente sanguínea quando a membrana plasmática hepatocelular é danificada, podendo ser quantificadas para avaliar o tipo e a extensão da lesão hepática (SALLIE; TREDGER; WILLIAMS, 1991). Assim, o aumento da atividade desses marcadores indica um dano hepático (grupos paracetamol e DMSO+P) e a observação de que o pré-tratamento com EE reduziu a atividade das enzimas ALT, AST e ALP no soro de camundongos evidencia que EE conferiu proteção contra o estresse gerado por paracetamol e esse efeito mostrou-se dose dependente para as enzimas ALT e AST (Figuras 11-12). Essa proteção pode acontecer por meio da preservação da integridade da estrutura da membrana hepatocelular, bem como o reparo do dano no tecido do fígado induzido por paracetamol (PARI; MURUGAN, 2004). Olaleye et al. (2010) demonstraram um aumento na atividade das enzimas ALT, AST e ALP provocada pela ingestão de paracetamol e o efeito protetor do pré-tratamento com

extrato aquoso e etanólico de folhas de *Boerhaavia diffusa* capaz de reduzir a atividade dessas enzimas no soro. Já Moresco *et al.* (2007) mostraram que o pré-tratamento com extrato aquoso de folhas de *Syzygium cumini* foi capaz de reduzir a elevação da atividade das enzimas ALT e AST provocada pela administração de tetracloreto de carbono. Singh *et al.* (2011) relataram um aumento na atividade dos marcadores enzimáticos ALT, AST, ALP causado pela ingestão de paracetamol, bem como uma prevenção na elevação desses marcadores devido ao pré-tratamento com extrato metanólico de tubérculos *Amorphophallus campanulatus*.

A peroxidação lipídica tem sido estreitamente relacionada com danos aos tecidos provocados por paracetamol (SENER; SEHIRLI; AYANOĞLU-DÜLGER, 2003). A dose aguda de paracetamol (500 mg/Kg) elevou significativamente os níveis de MDA no fígado de camundongos nos grupos paracetamol e DMSO+P comparados com o grupo controle (Figura 14). Essa elevação nos níveis de MDA reflete a peroxidação lipídica e danos na membrana plasmática como consequência do estresse oxidativo, além de falhas no sistema de defesa antioxidante (EESHA *et al.*, 2011; GIRISH *et al.*, 2009a). O pré-tratamento com EE foi capaz de restabelecer os níveis de MDA similares ao do controle, protegendo os animais de todos os grupos pré-tratados com extrato (EE150+P, EE300+P e EE600+P) contra a peroxidação lipídica induzida por paracetamol (Figura 14). Esses resultados concordam com Eesha *et al.* (2011) que mostraram a elevação nos níveis de MDA nos fígados de ratos devido a toxicidade do paracetamol e ainda que o tratamento com extrato etanólico de *Terminalia paniculata* foi capaz de reduzir essa peroxidação lipídica. A atividade hepatoprotetora de EE contra o estresse por paracetamol pode ser atribuída aos fitoquímicos ativos, que previnem a peroxidação lipídica, aumentando as defesas antioxidantes, como foi sugerido por Girish *et al.* (2009a). Adicionalmente, Jain *et al.* (2008), trabalhando com outro modelo de hepatotoxicidade, evidenciaram efeito hepatoprotetor de um extrato aquoso e etanólico de folhas de *Momordica dioica*, através da inibição da peroxidação lipídica revelada pela diminuição dos níveis de MDA no fígado de ratos submetidos a estresse por tetracloreto de carbono. Esses autores sugeriram como possível mecanismo para proteção a atividade antioxidante e de captura dos radicais livres por flavonoides e compostos fenólicos presentes no extrato.

Ainda para avaliar os danos por paracetamol, os níveis dos grupos sulfidrilas não proteicos foram determinados. Um mecanismo básico do efeito tóxico do

paracetamol é a ligação covalente de NAPQI aos grupos sulfidrilas da glutathiona reduzida (principal fonte de grupos sulfidrilas nos hepatócitos) e várias proteínas e sua oxidação subsequente (BESSEMS; VERMEULEN, 2001; MLADENOVIC *et al.*, 2009). Uma redução do conteúdo de grupos sulfidrilas pode estar relacionada com o seu consumo adicional na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. A administração oral de uma dose de paracetamol (500 mg/Kg) provocou uma redução nos grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) no fígado de camundongos dos grupos paracetamol e DMSO+P em comparação com o grupo controle. Essa diminuição pode ser devido à ativação metabólica do paracetamol, mais especificamente a ligação do N-acetilbenzoquinona imina (NAPQI) com os grupos sulfidrilas da glutathiona que leva a um consumo do estoque de GSH no fígado (YOUSEF *et al.*, 2010). A produção de ROS induzida por NAPQI ou outros metabólitos do paracetamol pode ser responsável pelo consumo desses grupos sulfidrilas (MLADENOVIC *et al.*, 2009). Dois fatores importantes determinam a probabilidade de produção de lesão hepática por paracetamol: a quantidade de NAPQI produzido por citocromo P450 2E1 e a disponibilidade de glutathiona como um agente hepatoprotetor. A concentração intracelular de NAPQI e a dose de paracetamol ingerida estão diretamente associadas (MADDREY, 2005). Os resultados mostraram que o pré-tratamento com EE restaurou significativamente os níveis de NP-SH nos grupos EE300+P e EE600+P (Figura 15), essa elevação no conteúdo de GSH (grupos sulfidrilas não proteicos) no fígado de camundongos submetidos a estresse por paracetamol e pré-tratados com EE revela a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de azeitona da terra. O mesmo foi evidenciado por Jain *et al.* (2008) em seu trabalho com o extrato de *Momordica dioica*. Este resultado deve-se provavelmente à diminuição da bioativação do paracetamol por conta do pré-tratamento com EE, como sugerido por Lee *et al.* (2001), trabalhando com o extrato de *Platycodon grandiflorum*.

A toxicidade induzida por paracetamol envolve uma mudança no estado redox que leva a um estado de estresse oxidativo (YOUSEF *et al.*, 2010). O paracetamol pode perturbar o equilíbrio entre a produção de ROS e a proteção antioxidante no fígado (MLADENOVIC *et al.*, 2009). Os resultados evidenciaram que o paracetamol reduziu a atividade da enzima SOD, nos grupos paracetamol e DMSO+P (Figura 16). Contrariamente, o tratamento com EE em todas as doses de extrato (150, 300 e 600 mg/Kg) preveniu a redução da atividade da SOD nos hepatócitos dos grupos

EE150+P, EE300+P e EE600+P. Segundo Mladenovic *et al.* (2009), o decréscimo na atividade da SOD está associado com aumento da produção de ROS e pode ser atribuído ao consumo dessa enzima na desintoxicação de ROS. As enzimas antioxidantes podem ser inativadas por ROS, sendo a superóxido dismutase inibida especificamente por peróxido de hidrogênio (PIGEOLET *et al.*, 1990). Um dos parâmetros avaliados por Olaeye & Rocha (2008) para verificar o efeito hepatoprotetor de diversas plantas medicinais (*Kigelia africana*, *Calotropis procera*, *Hibiscus sabdariffa* e *Alchornea cordifolia*) contra o estresse por paracetamol foi a atividade da SOD. Esses autores sugerem que a proteção contra a diminuição da atividade da SOD pelo paracetamol pode ser mediada, pelo menos em parte, através da preservação de níveis normais das atividades antioxidantes, mecanismo que também pode ser responsável pela proteção conferida por EE. Há vários trabalhos que podem ser citados evidenciando o efeito do paracetamol em diminuir as atividades da SOD e os níveis de NP-SH, dentre os quais alguns serão citados. Mladenovic *et al.* (2009) mostraram uma diminuição nos níveis de NP-SH e uma redução na atividade da SOD de fígado de camundongos provocados pelo tratamento com paracetamol. Bem como Lee *et al.* (2001) evidenciaram uma diminuição nos níveis de GSH provocada pela administração de paracetamol sozinho e que o pré-tratamento com extrato aquoso de raiz de *Platycodon grandiflorum* protegeu essa depleção de GSH em camundongos. Ademais, Yousef *et al.* (2010) mostraram uma redução nos níveis de GSH e na atividade da SOD induzida por paracetamol em fígados de ratos, bem como o efeito hepatoprotetor do tratamento com curcumina e quercetina na prevenção da depleção de GSH e diminuição da atividade dessa enzima. Sabir e Rocha (2008a) mostraram uma diminuição na atividade da SOD provocado por paracetamol, assim como o efeito protetor do extrato de *Solanum fastigiatum* nessa atividade em camundongos.

Não foram verificadas lesões macroscópicas nos estômagos de animais tratados com paracetamol (Figura 17). Isso pode ser explicado pelo fato do paracetamol ser absorvido rapidamente no estômago e intestino delgado, mas seu metabolismo ocorrer majoritariamente no fígado (RAY *et al.*, 1996 *apud* OLALEYE *et al.*, 2010) e a toxicidade está diretamente relacionada com a produção de NAPQI a partir do metabolismo do paracetamol.

Portanto foi evidenciado elevado potencial antioxidante e hepatoprotetor do extrato etanólico de folhas de azeitona da terra *in vivo* prevenindo contra a

peroxidação lipídica e redução das defesas antioxidantes. Essas atividades antioxidante e hepatoprotetora podem ser relacionadas com a capacidade de EE de capturar os radicais livres, o que pode vir a ser relacionado com os antioxidantes presentes no extrato, principalmente os polifenóis.

8 CONCLUSÕES

O extrato etanólico de folhas de azeitona da terra apresentou em sua composição fitoquímica vitamina C, carotenoides e elevados teores de polifenóis. Esse extrato mostrou elevada atividade antioxidante *in vitro* e não apresentou toxicidade *in vivo*. Frente à hepatotoxicidade induzida por paracetamol, o extrato na dose de 600 mg/Kg apresentou maior atividade protetora em camundongos revelada pela diminuição das atividades das enzimas ALT, AST e ALP e da peroxidação lipídica, bem como a prevenção da depleção de NP-SH e da redução da atividade da enzima SOD.

REFERÊNCIAS

- AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat, **Neuroreport**, v. 10, p.1799-1801, 1999.
- AMIN, A.; HAMZA, A. A. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: A possible role of DNA fragmentation. **Toxicology**, v. 208, p. 367–375, 2005.
- ARUN, R.; PRAKASH, M. V. D.; ABRAHAM, S. K.; PREMKUMAR, K. Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, p. 329–333, 2011.
- ÁVILA-PEÑA, D.; PEÑA, N.; QUINTERO, L.; SUÁREZ-ROCA, H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 380–385, 2007.
- AWODELE, O.; AGBAJE, E.O.; ABIOLA, O.O.; AWODELE, D.F.; DOLAPO, D.C. Doctors' attitudes towards the use of herbal medicine in Lagos, Nigeria. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, p. 16–22, 2012.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 240-246, 2012.
- BALIGA, M.S.; BHAT, H.P.; BALIGA, B.R.V.; WILSON, R.; PALATTY, P.L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1776–1789, 2011.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N, DE, B. *In vitro* Study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.
- BASMA, A. A.; ZAKARIA, Z.; LATHA, L. Y.; SASIDHARAN, S. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, p. 386-390, 2011.
- BAYDAR, N.G.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; CETIN, S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 799–804, 2006.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276–287, 1971.
- BENHERLAL, P. S.; ARUMUGHAN, C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, p. 2560–2569, 2007.

BESSEMS, J.G.M.; VERMEULEN, N.P.E. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 31, p. 55–138, 2001.

BHAWNA, S.; KUMAR, S.U. Hepatoprotective activity of some indigenous plants. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, p. 568-572, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRITO, F.A.; L.A. LIMA, L.A; RAMOS, M.F.S.; NAKAMURA, M.J.; CAVALHER-MACHADO, S.C.; SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; SAMPAIO, A.L.F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 105-115, 2007.

BURKITT, M.J. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 394, p. 117–135, 2001.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America a Personal Review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CHATURVEDI, A.; KUMAR, M. M.; BHAWANI, G.; CHATURVEDI, H.; KUMAR, M.; GOEL, R. K. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.51, p.131–140, 2007.

CHÁVEZ, J.H.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; BARARDI, C.R.M.; PINTO, A.R.; SIMÕES, C.M.O.; ZANETTI, C.R. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v.116, p. 53–59, 2006.

CHOI, D.; LEE, Y.; HONG, J.T.; LEE, H.J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 87, p. 144– 153, 2012.

CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, S.Y.; KIM, D.H.; CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, p. 181-182, 2002.

COVER, C.; LIU, J.; FARHOOD, A.; MALLE, E.; WAALKES, M.P.; BAJT, M.L.; JAESCHKE, H. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during

acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, p. 98–107, 2006.

DAHLIN, D.C.; MIWA, G.T.; LU, A.Y.H.; NELSON, S.D. N-acetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome-P450-mediated oxidation product of acetaminophen. **Procl. Natl. Acad. Sci USA**, v. 81, p. 1327-1331, 1984.

DAS, S.; SARMA, G. Study Of The Hepatoprotective Activity Of The Ethanolic Extract Of The Pulp Of Eugenia Jambolana (Jamun) In Albino Rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 3, p.1466-1474, 2009.

DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 825-860, 2000.

DAYUAN, L.; SALDEEN, T.; ROMEO F.; MEHTA J.L. Different isoforms of tocopherols enhance nitric oxide synthase phosphorylation and inhibit human platelet aggregation and lipid peroxidation: implications in therapy with vitamin E. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 6, p. 155–161, 2001.

DE HAAN, J.B., CRACK, P.J., FLENTJAR, N., IANNELLO, R.C., HERTZOG, P.J., KOLA, I. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. **Redox Report**, v. 8, p. 69–79, 2003.

DEUTSCH, J.C. Dehydroascorbic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 299–307, 2000.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 655–673, 2000.

DI DOMENICO, F.; FOPPOLI, C.; COCCIA, R.; PERLUIGI, M. Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 737–747, 2012.

DJIPA, C. D; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307–313, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DUFOUR D.R.; LOTT, J.A.; NOLTE, F.S.; GRETCH D.R.; KOFF, R.S.; SEEFF, L.B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 2027-2049, 2000.

EBRAHIMI, A.; SCHLUESENER, H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. **Ageing Research Reviews**, v. 11, p. 329-345, 2012.

EESHA, B.R.; MOHANBABU, A.V.; MEENA, K.K.; SARATH, B.; VIJAY, M.; LALIT, M.; RAJPUT, R. Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 466-469, 2011.

EL-GENDY, K.S.; ALY, N.M.; MAHMOUD, F.H.; KENAWY, A.; EL-SEBAE, A.K.H. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 215-221, 2010.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v.126, p.1571-1578, 2011.

FINKEL, T., HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um modelo Multidisciplinar. **Revista Eletrônica Multiciência**, v. 7, p. 32, 2006.

FRAGA, C.G.; GALLEANO, M.G.; VERSTRAETEN, S.V.; OTEIZA, P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 435–445, 2010.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p.181-207, 1982.

FUKUDA, I.; TSUTSUI, M.; YOSHIDA, T.; TODA, T.; TSUDA, T.; ASHIDA, H. Oral toxicological studies of black soybean (*Glycine max*) hull extract: acute studies in rats and mice, and chronic studies in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 49, p. 3272–3278, 2011.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v.172, p. 367-679, 2005.

GIRISH, C.; KONER, B. C.; JAYANTHI, S.; RAO, K. R.; RAJESH, B.; PRADHAN, S. C. Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 735–745, 2009a.

GIRISH, C.; KONER, B. C.; JAYANTHI, S.; RAO, K. R.; RAJESH, B.; PRADHAN, S. C. Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, p. 569-578, 2009b.

- GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M.L. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22, p. 287-93, 2007.
- GRYPIOTI, A.D.; THEOCHARIS, S.E.; DEMOPOULOS, C.A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; BASAYIANNIS, A.C.; MYKONIATIS, M.G. Effect of platelet-activating factor (PAF) receptor antagonist (BN52021) on acetaminophen-induced acute liver injury and regeneration in rats. **Liver International**, v.26, p.97–105, 2006.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.231-255, 2004.
- HANNOUFA, A.; HOSSAIN, Z. Regulation of carotenoid accumulation in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 198–202, 2012.
- HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, p. 654–664, 2006.
- HURKADALE, P.J.; SHELAR, P.A.; PALLED, S.G.; MANDAVKAR, Y.D.; KHEDKAR, A.S. Hepatoprotective activity of *Amorphophallus paeoniifolius* tubers against paracetamol-induced liver damage in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S238-S242, 2012.
- JAESCHKE, H; KNIGHT, T.R.; BAJIT, M.L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Letters**, v.144, p. 279–288, 2003.
- JAGETIA, G.C.; SHETTY, P.C.; VIDYASAGAR, M. S. Inhibition of Radiation-Induced DNA Damage by Jamun, *Syzygium cumini*, in the Cultured Splenocytes of Mice Exposed to Different Doses of γ -Radiation. **Integrative Cancer Therapies**, v.11, p. 141 –153, 2012.
- JAIN, A.; SONI, M.; DEB, L.; JAIN, A.; ROUT, S. P.; GUPTA, V. B.; KRISHNA, K. L. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 115, p. 61–66, 2008.
- JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 53, p. S26–S36, 2003.
- JEONG, J.-H.; JUNG, H.; LEE, S.-R.; LEE, H.-J.; HWANG, K. T.; KIM, T.-Y. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. **Food Chemistry**, v. 123, p. 338–344, 2010.

JUNG, H.J.; HWANG, I.A.; SUNG, W.S.; KANG, H.; KANG, B.S.; SEU, Y.B.; LEE, D.G. Fungicidal Effect of Resveratrol on Human Infectious Fungi. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 557-560, 2005.

KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; MAY, M.E.; GHARBI, N.; KAMOUN, A.; EL-FAZAA, S. Resveratrol, a red wine polyphenols, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **Life Sciences**, v. 80, p. 1033–1039, 2007.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, p. 550-557, 2006.

KHALID, H. J.; SHEIKH, A. S.; ANWAR, H. G. Protective effect of rutin on paracetamol and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 557–563, 2002.

LAKSHMI, S.V.V.; PADMAJA, G.; KUPPUSAMY, P.; KUTALA, V.K. Oxidative stress in cardiovascular disease. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.46, p. 421-440, 2009.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.1390-1393, 1997.

LEE, K. J.; YOU, H. J.; PARK, S. J.; KIM, Y. S.; CHUNG, Y. C.; JEONG, T. C.; JEONG, H. G. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice. **Cancer letters**, v. 174, p. 73–81, 2001.

LEE, T. Y.; CHANG, H. H.; CHEN, J. H.; HSUEH, M. L.; KUO, J. J. Herb medicine Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates hepatic fibrosis in bile duct ligation rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 318–324, 2007.

LEIFERT, W.R.; ABEYWARDENA, M.Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, v. 28, p. 729–737, 2008.

LI, L.; ADAMS, L. S.; CHEN, S.; KILLIAN, C.; AHMED, A.; SEERAM, N. P. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.826–831, 2009.

LICHTENTHALER, H.K., WELLBURN, A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.

LIMA, L.A.; SIANI, A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RIEHL, C. A. S. Correlation of Antiinflammatory Activity with Phenolic Content in

the Leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (myrtaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 860-864, 2007.

LIU, D.; SHI, J.; IBARRA, A. C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and b-carotene mixtures on the DPPH free radical. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1344–1349, 2008.

LIU, Y.; LU, B.; PENG, J. Hepatoprotective activity of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in mice treated by paracetamol. **Food Chemistry**, v. 125, p. 719–725, 2011.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v.35, p. 371-376, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADDREY, W. C. Drug-induced hepatotoxicity. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 39, p. S83–89, 2005.

MAHMOUD, I.I.; MARZOUK, M.A.S.; MAHARRAM, F.A.; EL-GINDI, M.R., HASSAN, A.M.K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1239–1244, 2001.

MALHI, H.; GORES, G. J.; LEMASTERS, J. J. Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? **Hepatology**, v. 43, p. S31–S44, 2006.

MANOV, I.; HIRSH, M.; IANCU, T.C. Acetaminophen hepatotoxicity and mechanisms of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 53: p. 489–500, 2002.

MARTÍNEZ, J. A. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 62, p. 303–306, 2006.

MASELLA, R.; BENEDETTO, R.D.; VARÍ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577–586, 2005.

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

MATOS, F.J.A. **Plantas da Medicina Popular do Nordeste**, Fortaleza: UFC, 1999.

- MENDES, J. F. R. **Biomarcadores do estado nutricional de ferro e estresse oxidativo em adultos**. 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407–412, 1993.
- MLADENOVIĆ, D.; RADOSAVLJEVIĆ, T.; NINKOVIĆ, M.; VUCEVIĆ, D.; JESIĆ-VUKIĆEVIĆ, R.; TODOROVIĆ, V. Liver antioxidant capacity in the early phase of acute paracetamol-induced liver injury in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 47, p. 866-870, 2009.
- MORESCO, R. N.; SPEROTTO, R.L.; BERNARDI, A.S.; CARDOSO, R.F.; GOMES, P. Effect of the Aqueous Extract of *Syzygium cumini* on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 793–795, 2007.
- MURUGAN, S.; DEVI, P.U.; PARAMESWARI, N.K.; MANI, K.R. Antimicrobial activity of *Syzygium jambos* against selected human pathogens. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 44-47, 2011.
- MURUGANANDAN, S.; SRIVASTAVA, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S.K., LAL, J.; RAVIPRAKASH, V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v.72, p. 369–375, 2001.
- MURUGESH, K.S.; YELIGAR, V.C.; MAITI, B.C.; MAITY, T.K. Hepatoprotective and antioxidant role of *Berberis tinctoria* leaves on paracetamol induced hepatic damage in rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 4, p. 64–69, 2005.
- NIKAM, S.; NIKAM, P.; AHALEY, S.K.; SONTAKKE, A.V. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 24, p. 98-101, 2009.
- OBANDA, M.; OWUOR, P.O. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 74, p. 209-215, 1997.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.
- OLALEYE, M. T.; AKINMOLADUN, A. C.; OGUNBOYE, A. A; AKINDAHUNSI, A. A. Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extracts of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 48(8-9), p. 2200–2205, 2010.
- OLALEYE, M. T.; ROCHA, J. B. T. Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 59, p.319–327, 2008.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOURLAT, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, G.F.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA FILHO, A.A.; MARTINS, C.H.G.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A. Antimicrobial Activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) Leaves Extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 381-384, 2007.

PARI, L.; MURUGAN, P. Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity. **Pharmacological research**, v. 49, p. 481–486, 2004.

PARMAR, J.; SHARMA, P.; VERMA, P.; SHARMA, P.; GOYAL, P.K. Chemopreventive Action of *Syzygium cumini* on DMBA-induced Skin Papillomagenesis in Mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 261-265, 2010.

PIGEOLET, E.; CORBISIER, P.; HOUBION, A.; LAMBERT, D.; MICHIELS, C.; RAES, M.; ZACGARY, M.D.; REMACLE, J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mechanisms of Ageing Development**, v. 51, p. 283–297, 1990.

PRINCE, P. S.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic *Syzygium cumini* seeds in alloxan induced diabetic albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p. 209–213, 2004.

PUGH, A. J.; BARVE, A. J.; FALKNER, K.; PATEL, M.; MCCLAIN, C. J. Drug-induced hepatotoxicity or drug-induced liver injury. **Clinics in Liver Disease**, v. 13, p. 277–294, 2009.

RAMANATHAN, A.; KITTUSAMY, R. Antihepatotoxic effect of isolated chitin from *Rhizopus oryzae* against paracetamol-induced hepatotoxicity. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 64-67, 2011.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 545, p. 51–64, 2006.

RAMIREZ, R. O.; ROA JR., C. C. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in Sprague–Dawley rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 29, p. 253–261, 2003.

RÁMON, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 410–424, 2011.

- REID, A. B.; KURTEN, R. C.; MCCULLOUGH, S. S.; BROCK, R. W.; HINSON, J. A. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, p. 509–516, 2005.
- RIZVI, S.I.; ZAID, M.A. Intracellular Reduced Glutathione Content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: Effect of insulin and (-) epicatechin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, p. 483-488, 2001.
- ROSENFELDT, F.; WILSON, M.; LEE G.; KURE, C. , OU, R.; BRAUN, L.; HAAN, J. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**, 2012.
- RUAN, Z.P.; ZHANG, L.L.; LIN, Y.M. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves. **Molecules**,v. 13, p. 2545-2556, 2008.
- RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.
- SABIR, S.M.; AHMAD, S.D.; HAMID, A.; KHAN, M.Q.; ATHAYDE; M.L.; SANTOS, D.B.; BOLIGON, A.A.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 131, p.741–747, 2012.
- SABIR, S.M.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 226–232, 2008a.
- SABIR, S.M.; ROCHA, J.B.T. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, v. 111, p. 845–851, 2008b.
- SAGRAWAT, H.; MANN, A. S.; KHARYA, M. D. Pharmacological potential of *Eugenia jambolana*: A review. **Pharmacognosy Magazine**, v. 2, p. 96–105, 2006.
- SALLIE, R.; TREDGER, J.M.; WILLIAMS, R. Drugs and the liver. Part 1: Testing liver function. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 12, p. 251-259, 1991.
- SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p. 721-738, 2001.
- SCHMIDT, B.; RIBNICK, D.M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, S3-S9, 2008.

SCHOENFELDER T.; WARMLIN C.Z.; MANFREDINI, M.S.; PAVEI, L.L.; RÉUS, J.V.; TRISTÃO, T.C.; FERNANDES, M.S.; COSTA-CAMPOS, L. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae, in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 222-227, 2010.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; DE, B. Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context. **Journal of Herbal Medicine**, v. 1, p. 67-75, 2011.

SENER, G.; SEHIRLI, A.O.; AYANOGLU-DULGER, G. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. **Journal of Pineal Research**, v. 35, p. 61–68, 2003.

SETTY, S.R.; QUERESHI, A.A.; SWAMY, A.H.M.V.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; GOUDA, A.V. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 451–454, 2007.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 2376–2383, 2008.

SHARMA, N.; SINGH, N. K.; SINGH, O. P.; PANDEY, V.; VERMA, P. K. Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, p. 479-484, 2011.

SILVA, S.N.; ABREU, I.C.; SILVA, G.F.C.; RIBEIRO, R.M.; LOPES, A.S.; CARTÁGENES, M.S.S.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, C.R.; BORGES, M.O.R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 102-108, 2012.

SINGH, S. K.; RAJASEKAR, N.; RAJ, N. A. V.; PARAMAGURU, R. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Amorphophallus campanulatus* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p. 202-205, 2011.

SOETAN, K. O.; AIYELAAGBE, O. O.; OLAIYA, C. O. A review of the biochemical, biotechnological and other applications of enzymes. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 382-393, 2010.

STICKEL, F.; SCHUPPAN, D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, p. 293–304, 2007.

STROHECKER, R., HENNING, H.M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**, Madrid, Ed. Paz Montalvo, 1967.

SWAMI, S.B; THAKOR, N.S.J.; PATIL, M.M.; HALDANKAR, P.M. Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1100-1117, 2012.

TALAULIKAR, V.S.; MANYONDA, I.T. Vitamin C as an antioxidant supplement in women's health: a myth in need of urgent burial. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, p. 10–13, 2011.

TERMAN, A.; GUSTAFSSON, B.; BRUNK, U. T. Autophagy, organelles and ageing. **Journal of Pathology**, v. 211, p. 134–143, 2007.

TERRA, X.; MONTAGUT, G.; BUSTOS, M.; LLOPIZ, N.; ARDÈVOL, A.; BLADÉ, C.; FERNÁNDEZ-LARREA, J.; PUJADAS, G.; SALVADÓ, J.; AROLA, L.; BLAY, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 210–218, 2009.

TRAUSTADÓTTIR, T.; DAVIES, S. S.; STOCK, A. A.; SU, Y.; HEWARD, C.B.; ROBERTS II, L.J.; HARMAN, S.M. Tart Cherry Juice Decreases Oxidative Stress in Healthy Older Men and Women. **The Journal of Nutrition**, v.139, p. 1896-1900, 2009.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 65-74, 2009.

UZILDAY, B.; TURKAN, I.; SEKMEN, A.H.; OZGUR, R.; KARAKAYA, H.C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**, v. 182, p. 59–70, 2012.

VALE, A. Paracetamol (Acetaminophen). **Medicine**, v.31, p. 67-68, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 1-40, 2006.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v.105, p. 619–627, 2007.

VIDYA, S.; RAMESH, A.; ALEKHYA, N.; IOHITHA, I. Antiulcer activity of *Eugenia jambolana* leaves against ethanol induced gastric ulcer in albino rats. **International Journal of Pharmaceutical Research & Development**, v. 3, p. 106-112, 2011.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WALTER, M.H.; STRACK, D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 663–692, 2011.

YAMAMOTO, T.; TOMIZAWA, K.; FUJIKAWA, M.; SATO, Y.; YAMADA, H.; HORII, I. Evaluation of human hepatocyte chimeric mice as a model for toxicological investigation using panomic approaches – effect of acetaminophen on the expression profiles of proteins and endogenous metabolites in liver, plasma and urine. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 32, p. 205–215, 2007.

YOU, Y.; YOO, S.; YOON, H.; PARK, J.; LEE, Y.; KIM, S.; OH, K.; LEE, J.; CHO, H.; G, JUN, W. In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1632–1637, 2010.

YOUSEF, M.I.; OMAR, S.A.M.; EL-GUENDI, M.I.; ABDELMEGID, L.A. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3246–3261, 2010.

ZELKO I.N.; MARIANI T.J.; FOLZ R.J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 337–49, 2002.

ZHANG, J.; WIDER, B.; SHANG, H.; LI, X.; ERNST, E. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 20, p. 100-106, 2012.

ZINGG, J.M. Vitamin E: An overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 400–422, 2007.