

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
***Hancornia speciosa* GOMES**

Uilson Pereira dos Santos

Doctor Scientiae

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2017

UILSON PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
Hancornia speciosa GOMES**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**Dourados
Mato Grosso do Sul - BRASIL
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237c Santos, Uilson Pereira Dos
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA Hancornia speciosa
GOMES [recurso eletrônico] / Uilson Pereira Dos Santos. -- 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Edson Lucas dos Santos.
Coorientadores: Claudio André Barbosa de Lira, Maria Letícia Miranda Fernandes
Estevinho.
Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2017.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Mangabeira. 2. Estresse oxidativo. 3. Antimicrobiano. 4. Apoptose. 5. Diabetes. I.
Santos, Edson Lucas Dos. II. Lira, Claudio André Barbosa De. III. Estevinho, Maria Letícia
Miranda Fernandes. IV. Título.

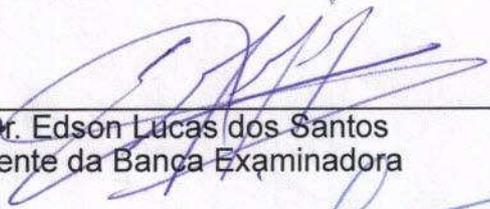
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

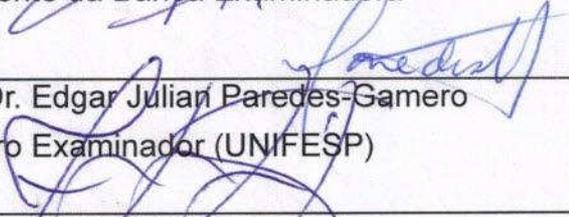


Termo de Aprovação

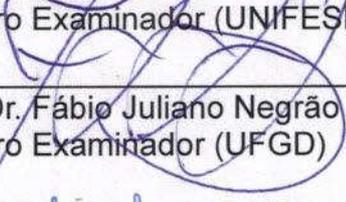
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: "**Caracterização Química e Atividades Biológicas da *Hancornia speciosa* GOMES**", de autoria de **Uilson Pereira dos Santos**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.



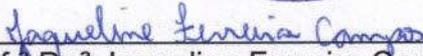
Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Presidente da Banca Examinadora



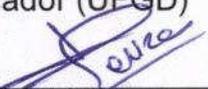
Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero
Membro Examinador (UNIFESP)



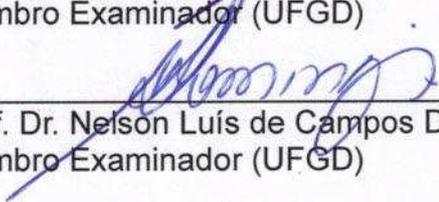
Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
Membro Examinador (UFGD)



Prof.ª Dr.ª Jaqueline Ferreira Campos
Membro Examinador (UFGD)



Prof.ª Dr.ª Kely de Picoli Souza
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 29 de setembro de 2017.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Altívio** e **Salvina** pela vida, amor, incentivo, apoio e exemplo.*

*A minha esposa, **Luana** pelo amor, compreensão, paciência e apoio incondicional em todos os momentos.*

*Aos meus filhos, **Isadora** e **Afonso** pelo amor, alegria e carinho.*

*A toda a **família**, pelo constante apoio emocional, amizade, carinho e por ser um grupo maravilhoso, que serve de estrutura e segurança para alcançar novos desafios.*

AGRADECIMENTOS

*Ao professor Dr. **Edson Lucas dos Santos**, pela oportunidade de aprendizado, por tornar possível a realização de parte desse curso de doutoramento no exterior, pela dedicação, paciência e orientação deste trabalho. Além disso, pelo exemplo de perseverança, determinação e garra, mostrando caminhos, dando apoio, exigindo sempre o melhor e tornando-se um grande amigo;*

*A professora Dra. **Maria Letícia M. F. Estevinho** pelo acolhimento, amizade, orientação e pela possibilidade de trabalhar junto a ela no departamento de Biotecnologia e Biologia do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal;*

*À professora Dr^a **Kely de Picoli Souza**, pelos ensinamentos, auxílio e orientação;*

*Professores Dr. **Nelson Luís de Campos Domingues**, Dr. **Fábio Juliano Negrão**, Dr^a **Jaqueline Ferreira Campos** e Dr^a **Ana Paula de A. Boleti** por aceitar o convite em fazer parte da banca examinadora e contribuir para a defesa deste trabalho;*

*A **Deus**, pai e protetor, por iluminar o meu caminho e pelo fortalecimento principalmente nos momentos difíceis, porém necessários para a nossa jornada;*

À Rede Pró-Centro-Oeste de Pós-graduação, Pesquisa e Inovação, a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nas quais realizei este trabalho de doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade;

A todos os amigos do Grupo de Estudos em Bioprospecção e Biotecnologia Aplicados ao Metabolismo (GEBBAM) e demais pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT e Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil – CNPq pela bolsa de Doutorado Sandwich no exterior concedida.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - (A) Árvore de <i>Hancornia speciosa</i> e (B) detalhe das folhas e fruto.....	10
TABELA 1 - Mecanismo de ação e atividades biológicas da <i>H. speciosa</i>	14
FIGURA 2 - Estrutura básica dos flavonoides.....	15
FIGURA 3 - Passos iniciais durante a biossíntese de ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides em plantas.....	16
FIGURA 4 - Etapas biossintéticas para geração de subfamílias de flavonoides Estrutura da naringenina mostra os números de átomos da estrutura e apigenina mostra a denominação dos anéis.....	17
FIGURA 5 - Estrutura química da quercetina, B) moléculas pertencentes à família dos flavonols e suas estruturas químicas e C) estrutura química dos flavonols principais.....	19
FIGURA 6 - Estrutura química da quercetin-3-glicosídeo (isoquercetina), B) quercetin-3,4'-diglicosídeo (quercetina) e C) quercetin-3-rutinosídeo (rutina).....	19
FIGURA 7 - Estrutura da quercetina e alguns dos seus principais metabólitos.....	21
FIGURA 8 - Resumo das vias de absorção e metabolismo de compostos fenólicos e derivados provenientes da dieta em humanos.....	23
FIGURA 9 - Mecanismos gerais de resistência aos antimicrobianos.....	31
FIGURA 10 - Mecanismos de resistência antifúngica aos azoles desenvolvidos em espécies de <i>Candida</i>	37
TABELA 2 - Agentes mutagênicos empregados neste estudo e mecanismos de ação.....	39
FIGURA 11 - Mecanismo básico de ação dos antimutagênicos.....	41
TABELA 3 - Exemplos de antioxidantes com atividade antimutagênica e mecanismos de ação.....	42
FIGURA 12 - Visão geral das duas principais vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca.....	46
FIGURA 13 - Via intrínseca da apoptose.....	48
FIGURA 14 - Via extrínseca da apoptose.....	50
FIGURA 15 - Necrose regulada ou necroptose.....	51
FIGURA 16 - Indução e alongamento na morte celular autofágica.....	53

FIGURA 17 - Maturação na morte celular autofágica.....	54
FIGURA 18 - Enzimas lisossomais e ativação de sinalização pró-apoptótica.....	55
FIGURA 19 - Principais vias de sinalização celular ativada por ácido hialurônico e derivados.....	57
FIGURA 20 - Enzimas - Relação entre o tamanho dos conjuntos A β oligômeros e os seus efeitos tóxicos.....	60
FIGURA 21 - Representação esquemática das múltiplas relações entre AChE e proteínas envolvidas na patogênese da doença de Alzheimer A β e P-Tau.....	62
FIGURA 22 - Resumo do modelo fisiopatológico clássico dos gânglios basais nos estados saudáveis (A) e parkinsoniana (B).....	64
FIGURA 23 - Geração de catecol quinonas citotóxicas e outras espécies reativas de oxigênio durante ação enzimática de tirosinase.....	66
FIGURA 24 - Principais órgãos-alvo e ações de agentes antihiperlipidêmiantes administrados por via oral em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.....	69
FIGURA 25 - Papel fisiológico da lipase pancreática na absorção de lipídios.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2`-Azo-bis-(2-amidinopropano)
ABC	Transportador cassete ligador de Adenosina trifosfato (ATP)
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Aceto acetato
ADA	American diabetes association
AFB1	Aflatoxina B1
AGI	inibidor α -glucosidase
AHO	Anti-hiperglicemiantes orais
AIDS	Síndrome da imundeficiência adquirida
AIF	Fator indutor de apoptose
ampC	Betalactamase classe C
ANR	Antocianidina redutase
ANS	Sintase antocianina
Apaf-1	Fator ativador de apoptose 1
APP	Proteína precursora amiloide
ATCC	American Type Culture Collection
Atgs	Proteínas relacionadas com autofagia
ATP	Trifosfato de adenosina
AZS	Azida Sódica
BChE	Butirilcolinesterase
Bcl-2	Genes ou proteínas de células B de linfoma
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
C4H	Cinamato-4-hidroxilase

Ca ⁺⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CCK	Colecistoquinina
CD44	Antígeno receptor de transmembrana tipo 1
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona-sintase
4CL	4-coumaroyl-CoA ligase
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DA	Doença de Alzheimer
DAPK	Proteína quinase associada a morte
DCC	Carcinoma colorretal deletado
DFR	Di-hidroflavonol redutase
DISCO	Complexo sinalizador indutor de morte
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
E64	Inibidor de catepsinas Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) b.
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EEHS	Extrato etanólico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
EGC	Epigallocatequina
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio

ERG 3	Gene 3 de biossíntese do esgosterol
ERG11	Gene 11 de biossíntese do esgosterol
ERG11p	Enzima alvo 14 α -demetilase
ESA	Escola superior agrarian
ESBL	Betalactamase de espectro estendido
ESCRT	Complexo de triagem endossomal necessária para o transporte
ESI/IT/MS Trap	Electrospray e espectrometria de massas com analisador tipo "Íon Trap"
F3H	Flavanona-3-hidroxilase
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
Fas	Proteína Fas
FasL	Ligante de Fas
Fasr	Receptor de Fas
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
Fe ³⁺	Ferro
FFA	Ácidos graxos livres
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNS	Flavona sintase
GC/FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama
GC/MS	Cromatografia gasosa com detector de massas
GLP	Peptídeo semelhante ao glucagon
GP	Globo pálido
GPX	Glutaciona peroxidase
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase
GSH	Glutaciona reduzida

HARE	Receptor ácido hialurônico por endocitose
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOO•	Radicais hidroperoxil
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector diodo
HtrA2/Omi	Proteína 2 requerente de alta temperatura
5-HT-2C	Receptor de serotonina
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50 %
IFS	Isoflavona sintase
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
IL-12	Interleucina-12
IMC	Índice de massa corporal
IV	Infravermelho
JC-1	5.5',6.6'-tetrachloro-1.1',3.3' iodeto tetraethylbenzimidazolylcarbo cyanine
KPC	Carbapenemase
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a um espectro de massas
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPS	Lipopolissacarídeos
LYVE-1	Receptor endotelial de vasos linfáticos 1
MBC	Concentração bactericida mínima
MDA	Malondialdeído
MFC	Concentração fungicida mínima
MFS	Superfamília dos principais facilitadores
MIC	Concentração inibitória mínima
MOMP	Permeabilização de membrana mitocondrial

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
mTOR	Proteína alvo da rapamicina
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
MyD88	Gene de resposta primária da diferenciação celular mieloide
NAC	Inibidor de espécies reativas de oxigênio N-acetyl-L-cysteine
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NB	Caldo nutriente
NEC-1	Necrostatin-1 (inibidor de necrose)
NF- κ B	Fator nuclear Kappa beta
•NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH-oxidase
4-NO	4-Nitroquinoline-1-oxide
O ₂ -	Radical superóxido
•OH	Hidroxila
Omp	Proteínas de membrana externa chamada de porinas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXM	Oxintomodulina
PAL	Liase fenil amônia
PBP2a	Proteína de ligação a penicilina 2a
PCA	Plate counter Agar
PDA	Potato dextrose Agar
PI	Iodeto de propídio
PGE2	Prostaglandina E2
PP2A	Proteína fosfatase 2 ^a
Proteína Tau	Proteína estabilizadora de microtúbulos
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados

p185HER2	Tirosino-quinase do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
RE	Retículo endoplasmático
RHAMM	Receptor de motilidade mediado por ácido hialurônico
RIP	Receptor de interação com proteína
ROO•	Radicais peroxil
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S9	Sistema de ativação microsomal: fração microsomal de homogeneizado de fígado de ratos
SFAs	Ácidos graxos saturados
Smad	Proteína que regula o fator de transformação do crescimento (TGF- β)
SNAREs	Receptor de proteínas de ligação ao fator solúvel sensível a N-etilmaleimida
SOD	Superóxido dismutase
SULT	Sulfotransferase
TAR43	Proteína TAR 43 de ligação ao DNA
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
THP-1	Células mononucleares humanas
TLR	Receptor Toll-like
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRADD	Domínio de morte associado ao TNFR
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF
TRAILR	Receptor TRAIL
TTC	2.3.5-trifenil-2H-tetrazolium
TZD	Tiazolidinediona

UFC	Unidades formadoras de colônia
UGT	Uridina 5`-difosfoglicuronosiltransferase
UNC5A-D	Receptor de netrina-1
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV	Ultra violeta
UVRAG	Proteína associada ao gene de resistência a radiação UV
VPs	Proteína de triagem vacuolar
YPD	Peptona dextrose para leveduras
Z-VAD-FMK	Inibidor pan-caspase Z-Val-Ala-Asp (O – methyl) – fluoromethyl ketone

RESUMO

Santos, Uilson Pereira Dos, Dr., Universidade Federal da Grande Dourados, setembro de 2017. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA *Hancornia speciosa* GOMES.** Orientador: Edson Lucas dos Santos. Co-Orientador: Claudio André Barbosa de Lira e Maria Letícia M. F. Estevinho. *Hancornia speciosa* Gomes é uma árvore frutífera, popularmente conhecida como mangabeira e amplamente distribuída pelo Brasil. As folhas desta planta são utilizadas na medicina popular para diferentes aplicações medicinais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização físico-química, identificar os antioxidantes lipofílicos, ácidos graxos e compostos fenólicos, determinar a qualidade e segurança microbiológica das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, bem como, avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antimutagênica e de inibição de enzimas relacionadas com doenças neurodegenerativas, inflamação, obesidade e diabetes do extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* (EEHS). Análises químicas foram realizadas por colorimetria, cromatografia gás-líquido com detecção por ionização de chama (GC-FID) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS). Foram determinados o número total de colônias de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras. A quantificação dos coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada com o kit SimPlates, e esporos de *Clostridium* sulfito-redutor, utilizando-se o método Sulfite-Agar de polimixina-sufadiazina. A pesquisa de *Salmonella* spp. foi efetuada pelo 1-2 Test. Dentre as atividades biológicas do EEHS avaliadas, a antimicrobiana foi determinada pelas concentrações inibitória mínima, bactericida e fungicida mínima e por zona de inibição do crescimento. Células leucêmicas Kasumi-1 foram utilizadas para avaliar a ação citotóxica e os mecanismos envolvidos na morte celular. A atividade antioxidante foi investigada pelo método de inibição da hemólise oxidativa induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) em eritrócitos humanos. A atividade antimutagênica foi determinada pelo teste de Ames e as atividades de inibição das enzimas acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, tirosinase, hialuronidase, lipase, α -amilase e α -glicosidase foram avaliadas e comparadas a controles comerciais. Em conjunto, os resultados garantem a qualidade, segurança microbiológica e demonstram presença de carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados e compostos fenólicos nas folhas de *H. speciosa*, bem como as atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antimutagênica, antiobesidade e anti-hiperglicemiante do EEHS. **Palavras-chave:** Mangabeira; estresse oxidativo; antimicrobiano; apoptose; diabetes.

ABSTRACT

Santos, Uilson Pereira Dos, Dr., Federal University of Grande Dourados, September 2017. **CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Hancornia speciosa* GOMES**. Advisor: Edson Lucas dos Santos. Co-Advisor: Claudio André Barbosa de Lira and Maria Letícia M. F. Estevinho. *Hancornia speciosa* Gomes is a fruit tree, popularly known as mangabeira and widely distributed throughout Brazil. The leaves of this plant are used in folk medicine for different medicinal applications. Thus, the objective of this study was to perform the physicochemical characterization, to identify the lipophilic antioxidants, fatty acids and phenolic compounds, to determine the microbiological quality and safety of the leaves of *Hancornia speciosa* Gomes, as well as to evaluate the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, antimutagenic activities and inhibition of enzymes related to neurodegenerative diseases, inflammation, obesity and diabetes of the ethanolic extract of the *H. speciosa* (EEHS) leaves. Chemical analyzes were performed by colorimetry, gas-liquid chromatography with flame ionization detection (GC-FID) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC / MS). The total number of colonies of aerobic mesophiles, molds and yeasts were determined. The quantification of total coliforms and *Escherichia coli* was carried out using the SimPlates kit, and sulfide-reducing *Clostridium* spores, using the Sulfite-Agar method of polymyxin-sulfadiazine. The *Salmonella* spp. was performed by the 1-2 Test. Among the biological activities of the EEHS evaluated, the antimicrobial was determined by minimum inhibitory concentration, minimal bactericide and fungicide and by zone of inhibition of growth. Kasumi-1 leukemic cells were used to evaluate the cytotoxic action and mechanisms involved in cell death. The antioxidant activity was investigated by the method of inhibiting oxidative hemolysis induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) in human erythrocytes. The antimutagenic activity was determined by the Ames test and the activities of the inhibition of the enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase, hyaluronidase, lipase, α -amylase and α -glycosidase were evaluated and compared to commercial controls. Together, the results guarantee the quality, microbiological safety and demonstrate the presence of carotenoids, polyunsaturated fatty acids and phenolic compounds in the leaves of *H. speciosa*, as well as antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, antimutagenic, antiobesity and antihyperglycaemic activities of the EEHS. **Keywords:** Mangabeira; oxidative stress; antimicrobial; apoptosis; diabetes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	4
2.2 PLANTAS MEDICINAIS.....	7
2.2.1 <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	9
2.2.1.1 <i>Descrição botânica</i>	10
2.2.1.2 <i>Habitat e distribuição geográfica</i>	11
2.2.1.3 <i>Constituintes químicos</i>	12
2.2.1.4 <i>Atividades biológicas da H. speciosa</i>	14
2.2.2 Flavonoides	15
2.2.2.1 <i>Diversidade estrutural</i>	15
2.2.2.2 <i>Quercetina</i>	18
<u>2.2.2.2.1 Fontes dietéticas</u>	19
<u>2.2.2.2.2 Absorção e metabolismo</u>	20
<u>2.2.2.2.3 Biodisponibilidade</u>	21
2.2.2.3 <i>Catequinas</i>	22
2.3 MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA.....	24
2.3.1 Bactérias	25
2.3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.3.1.2 <i>Klebsiela pneumoniae</i>	26
2.3.1.3 <i>Proteus mirabilis</i>	27
<u>2.3.1.1.1 Resistência bacteriana</u>	28
2.3.2 Fungos	32
2.3.2.1 <i>Candida spp</i>	33
2.3.2.2 <i>Microsporium canis</i>	34
<u>2.3.2.2.1 Resistência antifúngica aos azoles</u>	35
2.4. MUTAGÊNESE.....	37
2.5. CÂNCER.....	43
2.5.1 Definições de morte celular	45
2.5.1.1 <i>Apoptose</i>	45
<u>2.5.1.1.1 Apoptose intrínseca</u>	46

2.5.1.1.2 Apoptose extrínseca.....	48
2.5.1.2 Necrose regulada.....	50
2.5.1.3 Morte celular autofágica.....	52
2.6 INFLAMAÇÃO.....	55
2.7 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	58
2.7.1 Doença de Alzheimer.....	58
2.7.2 Doença de Parkinson.....	63
2.8 DIABETES.....	67
2.9 OBESIDADE.....	70
3 OBJETIVOS.....	75
3.1 OBJETIVO GERAL.....	75
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
ANEXOS.....	76
ARTIGO 1: ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC PROPERTIES AS WELL AS THE PHENOLIC CONTENT OF THE EXTRACT FROM <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	77
ARTIGO 2: PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, MICROBIOLOGICAL QUALITY AND SAFETY, AND PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	96
CONCLUSÃO GERAL.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

Soluções inovadoras são consideradas decisivas para a manutenção da biodiversidade, tal conclusão foi declarada pela Assembleia Geral das Nações Unidas em 2012, ano Internacional da Biodiversidade (CDB, 2012). O Brasil ocupa uma função de destaque, tendo em vista que é detentor de 13 % de todas as espécies da biodiversidade mundial (Lewinsohn e Prado, 2006). Entretanto, esse potencial necessita de mais investigação científica e exploração comercial sustentável. A bioprospecção apresenta-se como alternativa na busca sistemática de recursos da biodiversidade com potencial econômico e vem sendo desenvolvida em vários setores e atividades, incluindo biotecnologia, indústria farmacêutica e cosmética, nutrição e saúde, entre outros (IPEA, 2011).

O bioma Cerrado do Brasil abrange quase 2 milhões de km², representa aproximadamente 22 % do território nacional (Oliveira e Marquis, 2002) e detém grande diversidade de plantas medicinais frequentemente utilizadas na medicina tradicional. Muitas destas plantas já foram investigadas em estudos bioprospectivos, sendo comprovadas cientificamente suas propriedades antioxidante (Casagrande *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2016; Espindola *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016), antimicrobiana (Moraes *et al.*, 2008), antidiabética (Pereira *et al.*, 2015), antiobesidade (Araldi *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, 2016), anti-inflamatória (da Silva *et al.*, 2014a), citotóxica (da Silva *et al.*, 2014b; Campos *et al.*, 2017), antimutagênica (Santana *et al.*, 2016), dentre outras.

As plantas medicinais são utilizadas para fins terapêuticos em diferentes culturas ao redor do mundo, apesar de ainda ser pouco discutida, a qualidade sanitária deste material é de grande relevância para se alcançar os resultados farmacológicos esperados. O material vegetal destinado para fins medicinais deve apresentar níveis de contaminação microbiana aceitável e ausência de deterioração ou micro-organismos patogênicos (Dias *et al.*, 2012). Estes são critérios básicos que devem ser avaliados e seguidos para se obter amostras vegetais com qualidade, segurança e eficácia terapêutica (WHO, 2007; Ghisleni *et al.*, 2016).

Dentre as plantas utilizadas na medicina tradicional, a *Hancornia speciosa* Gomes (*H. speciosa*) é uma árvore frutífera, conhecida popularmente como “mangabeira” e tem suas folhas comercializadas para uso na forma de chá (Santos *et al.* 2016). Pertencente à família Apocynaceae, esta espécie é nativa do Brasil e além de estar presente no Cerrado, também é encontrada nos biomas Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica.

As folhas de *H. speciosa* são descritas por suas atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica (Santos *et al.*, 2016), anti-inflamatória (Endringer *et al.*, 2009; Geller *et al.*, 2015), cicatrizante (Geller *et al.*, 2015), vasodilatadora (Ferreira *et al.*, 2007ab), antihipertensiva (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016), antidiabética (Pereira *et al.*, 2015) e inibidora da enzima acetilcolinesterase (Penido *et al.*, 2017).

Estudos fitoquímicos previamente descritos, com extratos das folhas de *H. speciosa*, demonstraram composição química complexa. Dentre os constituintes químicos identificados e relacionados às suas atividades biológicas, incluem o L-(+)-bornesitol, ácido quínico, ácido clorogênico e flavonoides derivados do Kaempferol quercetina, isoquercetina, rutina e catequina (Endringer *et al.*, 2007; Endringer *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016). Recentemente, Bastos *et al.* (2017), identificaram outros compostos fenólicos, tais como, ácido cafeico, isômeros de ácido protocatecúico, epicatequina, isômeros de quercetina, procianidinas tipo B e C, isômeros de ácido coumaroylquínico, florizina, floretina, eriodictiol, luteolina e apigenina. Os extratos naturais e derivados fenólicos com potencial farmacológico podem servir como estratégia de tratamento seguro, natural e com menor custo quando comparados às drogas sintéticas (Birari e Bhutani, 2007; Slanc *et al.*, 2009; de la Garza *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2016).

As plantas são fontes de compostos biologicamente ativos, utilizadas por aproximadamente 80 % da população mundial, principalmente na forma de chás ou na forma de medicamentos industrializados (WHO, 2006). Além disso, os produtos naturais ou derivados desempenham função altamente significativa no processo de desenvolvimento e descoberta de novos compostos ou fármacos (Newman e Cragg, 2016). Nas últimas três décadas, os fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais vêm se destacando, tendo em vista

que, 60 % dos fármacos que estão disponíveis para tratamento de infecções bacterianas, 51 % para câncer, 50 % para doença de Alzheimer, 8 % para Parkinson, 27 % para inflamação, 16 % para obesidade e 57 % para diabetes, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (Newman e Cragg, 2016).

Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização físico-química, identificar os antioxidantes lipofílicos, metil ésteres de ácidos graxos e compostos fenólicos, demonstrar a qualidade e segurança microbiológica das folhas de *H. speciosa*, bem como, avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antimutagênica e inibição de enzimas relacionadas com doenças neurodegenerativas, inflamação, obesidade e diabetes do extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* (EEHS) e flavonoides.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Atualmente, existe uma crescente busca por produtos naturais com propriedades terapêuticas, como a ação antioxidante, que além de combater a ação nociva dos radicais livres (Sofi *et al.*, 2016), apresentam baixa toxicidade em comparação com antioxidantes sintéticos amplamente empregados nos alimentos, produtos cosméticos e farmacêuticos (Djeridane *et al.*, 2006; Wannan *et al.*, 2010).

O termo radical livre refere-se a molécula que possui elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992). O elétron cria um campo magnético que o leva à instabilidade e meia vida curta e extremamente reativa, com potencialidade capaz de oxidar compostos orgânicos e inorgânicos, como proteínas, lipídios, carboidratos, organelas citoplasmáticas e material genético (Halliwell e Gutteridge, 2000; Birben *et al.*, 2012). Os radicais livres são produzidos pelos organismos vivos como resultado do metabolismo celular. Em condições fisiológicas são produzidos em concentrações baixas a moderadas, entretanto, em concentrações elevadas produzem efeitos adversos (Birben *et al.*, 2012).

Espécies reativas incluem radicais de oxigênio e nitrogênio, e certas espécies não-radicalares que podem ser convertidas facilmente a radical livre. O termo “reativo” não é sempre apropriado, uma vez que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-) e óxido nítrico ($\cdot NO$) reagem diretamente com poucas moléculas no corpo humano, enquanto o radical hidroxila ($\cdot OH$) pode reagir com qualquer molécula. Sendo assim, os radicais mais importantes do ponto de vista biológico são aqueles derivados do oxigênio (Ehrenbrink *et al.*, 2006).

As 3 espécies reativas de oxigênio (ERO) resultantes de reações do metabolismo celular com maior significância fisiológica incluem o O_2^- , H_2O_2 e $\cdot OH$ (Lambeth, 2004; Birben *et al.*, 2012). O primeiro radical produzido pela adição de um elétron ao oxigênio molecular é o O_2^- . Esse radical é produzido principalmente nas mitocôndrias, entretanto, enzimas nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH-oxidase) ou xantina oxidase também o produzem (Halliwell e Gutteridge, 1984; Birden *et al.*, 2012). Apesar de ser um precursor para as demais espécies reativas, o O_2^- reage com ferro e enxofre, transportadores de elétrons em cadeias respiratórias de bactérias e mitocôndrias (Lambeth, 2004). A conversão de O_2^- em H_2O_2 ocorre pela ação da enzima superóxido dismutase (Halliwell e Gutteridge, 1984; El-Bahr, 2013).

O H_2O_2 é produzido pela xantina oxidase, NADPH-oxidase, aminoácido oxidase e em peroxisomos durante a utilização do oxigênio molecular em reações metabólicas (Birden *et al.*, 2012). O H_2O_2 é potente oxidante e mais reativo quando comparado ao O_2^- , embora os seus alvos sejam limitados a metionina e resíduos de cisteína em enzimas (Lee *et al.*, 1998). A enzima que promove a redução do H_2O_2 em água é a catalase (Cheeseman e Slater, 1993). Entretanto, através da reação de Fenton, o ferro (Fe^{3+}) pode catalisar a produção de $\cdot OH$ na presença de H_2O_2 (Muñoz *et al.*, 2012). Os radicais $\cdot OH$ são altamente reativos, reagem e produzem danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e ácido desoxirribonucléico (DNA) (Lambeth, 2004). Além disso, através da remoção de um elétron de ácidos graxos poliinsaturados, o radical $\cdot OH$ inicia a peroxidação lipídica (Birden *et al.*, 2012).

Os radicais livres derivados do oxigênio que desempenham importante função na peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados são os radicais peroxil ($ROO\cdot$) e hidropoxil ($HOO\cdot$). Além desses radicais já mencionados, o ácido hipocloroso, oxigênio singlet e ozônio promovem oxidação proteica e reagem fortemente com ligações duplas de ácidos graxos insaturados (Lambeth, 2004). O equilíbrio redox, caracterizado pela produção regulada de ERO, é essencial para o funcionamento celular, entretanto, quando há uma produção desregulada, ocasiona o estresse oxidativo, que desencadeia o processo de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos no DNA (Halliwell e Gutteridge, 1984).

A produção irregular de ERO pode desencadear a peroxidação lipídica por reações em cadeia em que ocorre a remoção de hidrogênios reativos presentes no lipídeo. Os radicais formados reagem com oxigênio e novas reações em cadeia transformam ácidos graxos poliinsaturados em hidroperóxidos lipídicos. Os hidroperóxidos lipídicos são muito instáveis e

facilmente ocorre a decomposição em produtos secundários, dentre eles, o Malondialdeído (MDA) e isoprostanos (Birden *et al.*, 2012). Como consequência, a peroxidação lipídica exerce seus efeitos tóxicos alterando a integridade das membranas, desencadeando um rearranjo na estrutura da membrana que favorece a oxidação das estruturas celulares (Gaschler e Stockwell, 2017).

Em conjunto, a peroxidação lipídica e outras condições de estresse oxidativo podem atuar como mediadores importantes em muitas condições patológicas, incluindo inflamação (Milenković *et al.*, 2016), câncer (Zuo *et al.*, 2016), diabetes (Kim e Park, 2016), obesidade (Razzaghy-Azar *et al.*, 2016), doenças neurodegenerativas (Hasegawa, 2010; Bou Khalil *et al.*, 2016), oculares, renais, morte celular (Gaschler e Stockwell, 2017), entre outras.

A proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas com o uso de antioxidantes é de grande interesse em saúde (Zawia *et al.*, 2009). Agente antioxidante é considerado um mecanismo primário de defesa contra a peroxidação lipídica descontrolada e outros danos oxidativos (Gaschler e Stockwell, 2017). Essas substâncias são capazes de prevenir ou diminuir as reações que levam à oxidação de macromoléculas e estruturas celulares (Fraga e Oteiza, 2002). Pode-se incluir como defesas antioxidantes, as substâncias que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies reativas, as proteínas que diminuem a disponibilidade de agentes pró-oxidantes, sequestradores de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Para prevenir o dano causado pelas ERO e ERN, o sistema biológico desenvolveu sistemas de defesa antioxidante, que incluem antioxidantes enzimáticos, tendo como principais a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (Yu *et al.*, 2015). Dentre os antioxidantes não enzimáticos, estão presentes as vitaminas (Vitamina C e E), β -caroteno, ácido úrico, glutathione reduzida (GSH) e compostos fenólicos, entre outros (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003; Birben *et al.*, 2012).

Os antioxidantes são conhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo diferentes biomoléculas (Shahidi, 1997).

Suas atividades têm sido propostas para desempenhar várias atividades farmacológicas (Lee *et al.*, 2004; Belou *et al.*, 2012; Yamanaka *et al.*, 2012).

Antioxidantes também vêm sendo utilizados em alimentos com a finalidade de prevenir e ou retardar a deterioração oxidativa. Dentre os antioxidantes mais comumente utilizados estão os naturais, principalmente os tocoferóis e o ácido ascórbico. Dentre os compostos fenólicos sintéticos, destaca-se o Butilhidroxi- anisol (BHA), o Butil-hidroxi-tolueno (BHT) e Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (Nakatani *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996). Os antioxidantes sintéticos são efetivos e estáveis, contudo, seu uso como aditivo tem sido limitado pelo risco de causarem efeitos tóxicos e câncer (Botterweck *et al.*, 2000). Sendo assim, existe grande interesse na busca de novos antioxidantes, principalmente de fontes naturais (Rechner *et al.*, 2002).

Dentre os antioxidantes naturais, os compostos fenólicos são de ocorrência natural no reino vegetal. Eles são encontrados em folhas, frutos, cascas e madeira e podem acumular-se em grandes quantidades em órgãos ou tecidos da planta (Haslam, 1989). Os compostos fenólicos são considerados substâncias vegetais secundárias, sem envolvimento em vias metabólicas responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento (Tsuchiya *et al.*, 2015). Organismos que sintetizam esses compostos o fazem principalmente para atrair insetos polinizadores e dispersores de sementes e em resposta à condições estressantes, tais como o dano oxidativo, ataque por patógenos e insetos, radiação Ultra Violeta (UV) e lesões (Gottlieb, 1989; Field e Lettinga, 1992; Cowan, 1999; Agatti *et al.*, 2013).

Além disso, os compostos fenólicos são considerados mais abundantes na dieta humana, quando comparados a vitamina C, vitamina E e carotenoides (Scalbert *et al.*, 2005).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico acontece desde a antiguidade até os dias atuais (WHO, 2002; Tsobou *et al.*, 2016). Apesar do efeito terapêutico comprovado, o aumento no consumo de produtos naturais tem-se apresentado como um problema de saúde pública, uma vez

que, há a possibilidade de aquisição de produtos com baixa qualidade, necessitando de validação da segurança e eficiência do produto ou matéria-prima (Ghisleni *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as plantas são fontes permanentes de compostos biologicamente ativos, utilizadas principalmente na forma de chás ou como medicamentos industrializados (WHO, 2006). Há estimativas de que 80 % da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais para assistência primária à saúde (Hostettmann e Marston, 2002; WHO, 2002).

O desenvolvimento de ferramentas metodológicas disponíveis atualmente para estudo, dentre elas, as cromatografia e espectrometria, assim como, a introdução de bioensaios, permitiu o avanço nas pesquisas com plantas medicinais, resultando em maior interesse no desenvolvimento de produtos farmacêuticos provenientes de fontes naturais (Koehn e Carter, 2005; Saklani e Kutty, 2008). Neste contexto, a quantidade de novas drogas desenvolvidas com base em produtos naturais durante o período de 1981 à 2014, enfatiza que tais produtos ou estruturas de produtos naturais continuam a desempenhar relevância significativa no processo de desenvolvimento e descoberta de novos compostos ou drogas (Newman e Cragg, 2016).

As plantas medicinais apresentam elevada diversidade química, dentre os principais constituintes químicos descritos como responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes, os derivados fenólicos e flavonoides se destacam por desempenharem tal atividade (Li *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015). Estes compostos estão naturalmente presentes em várias espécies de plantas e são descritos por apresentar benefícios a saúde humana (Uysal e Aktumsek, 2015).

Neste sentido, por suas ações na saúde humana, os compostos fenólicos tem sido objeto de pesquisa, uma vez que, a identificação e quantificação dessas substâncias revelam informações a respeito da atividade antioxidante, qualidade do alimento ou produto e dos potenciais benefícios à saúde (Shay *et al.*, 2015).

Existem diferentes classes de compostos fenólicos presentes em vegetais, dentre eles incluem principalmente, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, curcuminóides, cumarinas, lignanas e quinonas (Tsuchiya *et al.*, 2015).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides despertam elevado interesse do ponto de vista científico e terapêutico (Marín *et al.*, 2014). De origem vegetal, os flavonoides apresentam atividade antioxidante por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo a remoção de ERO, inibição da peroxidação lipídica, quelação de íons de ferro e cobre e inibição de enzimas envolvidas na geração de ERO (Murota e Terao, 2003). Essa habilidade dos flavonoides e outros derivados fenólicos na redução de radicais livres oxidantes é realizada pela doação de hidrogênios (Shahidi, 1997). Além disso, esses compostos tem a capacidade de modular a atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (Yu *et al.*, 2015).

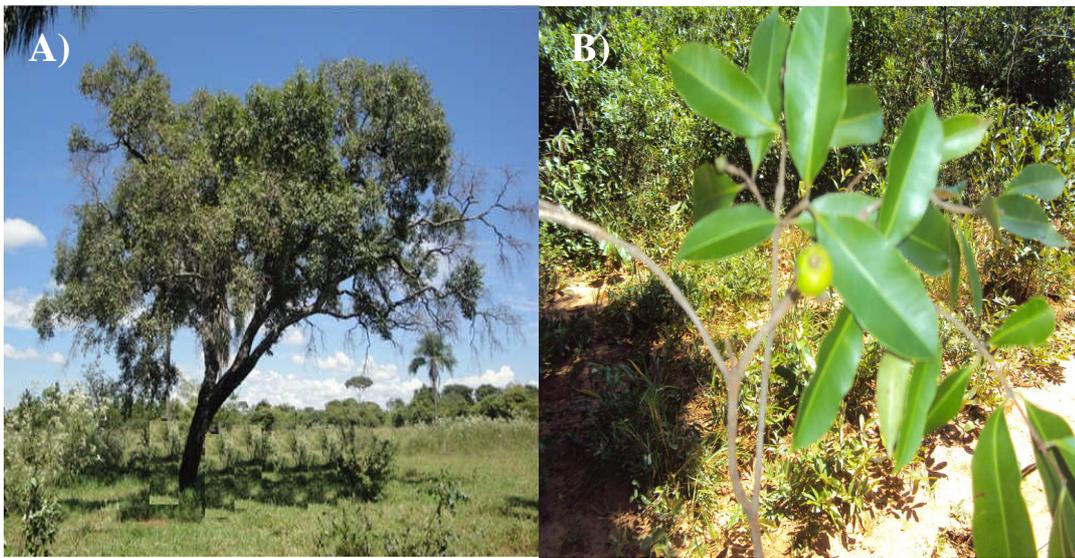
Tais compostos têm sido estudados intensamente em plantas medicinais em função da elevada prevalência de estresse oxidativo observada com o envelhecimento e em amplas situações de doença, incluindo doenças neurodegenerativas, inflamatórias, câncer, diabetes, obesidade, entre outras (Hasegawa *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012; Shay *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2016; de lima *et al.*, 2016).

2.2.1 *Hancornia speciosa* Gomes

Dentre as espécies de plantas medicinais encontrada no Cerrado brasileiro, *H. speciosa* (Apocynaceae) é conhecida popularmente como mangabeira, árvore frutífera (FIG. 1) e que tem suas raízes descritas por apresentarem atividades antihipertensivas e cicatrizante de feridas (Hirschmann e Arias, 1990), as cascas apresentam ação antidiabética, antiobesidade, antimicrobiana e gastroprotetora (Grandi *et al.*, 1989; Rodrigues e Carvalho, 2001; Moraes *et al.*, 2008) e o látex atua como anti-inflamatório (Marinho *et al.*, 2011). Já as folhas de *H. speciosa*, são descritas por suas atividades anti-inflamatória (Endringer *et al.*, 2009; Geller *et al.*, 2015), cicatrizante (Geller *et al.*, 2015), vasodilatadora (Ferreira *et al.*, 2007ab), antihipertensiva (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016), antidiabética (Pereira *et al.*, 2015), no tratamento de dismenorreia (Rizzo *et al.*, 1990) e inibidora da enzima acetilcolinesterase (Penido *et al.*, 2017).

Além disso, seus frutos constituem-se importante matéria prima para a indústria de sucos e sorvetes do Nordeste, sendo uma das dez espécies selecionadas como de altíssima prioridade pelo programa Plantas do Futuro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Banco Mundial, Fundo de Desenvolvimento Global, Ministério do Meio Ambiente e Probio, com o mais elevado potencial de uso imediato entre as árvores frutíferas nativas da região nordeste (Ferreira *et al.*, 2005).

FIGURA 1 - (A) Árvore de *Hancornia speciosa* e (B) folhas e fruto.



Fonte: Santos (2012).

2.2.1.1 Descrição botânica

No gênero *Hancornia*, a *H. speciosa* foi descrita por Gomes em 1812 (Lederman, 2000), sendo seu nome popular mangaba ou mangabeira, de origem indígena (mã gawa) e significa “coisa boa de comer”. Seus frutos maduros são muito apreciados para consumo *in natura* ou para o preparo de doces, sucos e sorvetes (Lederman *et al.*, 2000). *H. speciosa* tem se destacado pelo seu potencial econômico e tem despertado interesse crescente, de consumidores e setores ligados à indústria e comércio. Compreende seis variedades botânicas: *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *maximiliani*, *H. speciosa* var. *cuyabensis*, *H. speciosa* var. *lundii*, *H. speciosa* var. *gardneri* e *H. speciosa* var. *pubescens* (Monachino, 1945).

A mangabeira apresenta de 2 a 10 metros de altura, podendo chegar, raramente, até os 15 metros, com caules ramificados separados e bem formados. Copa ampla, às vezes mais larga do que alta, os caules pendentes, abundantes, com folhagens reduzidas. Troncos geralmente tortuosos, inclinados ou ligeiramente retos até 30 cm de diâmetro. Os ramos jovens são de coloração violácea, lisos até um ano de idade, meio angulosos, curtos, com poucas folhas, floríferos no ápice. Caule rugoso e áspero, com duas a três bifurcações na altura média de 40 a 50 cm da base (Villachica *et al.*, 1996; Lederman *et al.*, 2000). Apresentam folhas com limbo de forma lanceolada do tipo oblongo-lanceolado, com ápice ligeiramente agudo. As nervuras das folhas apresentam-se de forma penivênia do tipo obliquivênia, sendo a margem do limbo lisa (Sousa *et al.*, 2007).

A flor da mangabeira é hermafrodita gêmea ou trigêmea no ápice dos caules, branca, campanulada e aromática (Aguilar Filho *et al.*, 1998). O fruto é do tipo baga, com a forma elipsóide ou arredondada, atingindo até 6,5 cm de comprimento, mas com diferentes tamanhos na mesma planta; apresenta exocarpo exibindo coloração que varia de verde-clara a amarelada, com estrias amareladas ou avermelhadas, produzindo um suco viscoso na casca; a polpa é de cor branca, de gosto acidulada a doce, suave, carnosa e viscosa, de aroma perfumado e saborosa (Manica, 2002). Da casca é extraído um látex que é utilizado como matéria-prima para a produção de borracha, porém, com qualidade inferior ao da seringueira (Lorenzi, 1998). A produção de borracha, utilizando o látex da mangabeira juntamente com estireno-butadieno em reação de copolimerização, também foi desenvolvida (Firestone, 1948).

2.2.1.2 Hábitat e distribuição geográfica

A mangabeira é nativa de várias regiões e ecossistemas do Brasil, estando presente na Costa Atlântica desde o Amapá e o Pará, nos tabuleiros costeiros e nas baixadas litorâneas do Nordeste até o Espírito Santo. Também está presente em toda a região de Cerrado do Brasil Central até o Pantanal, ocorrendo também em países vizinhos como Paraguai, Bolívia, Peru e Venezuela (Lederman *et al.*, 2000). A ampla distribuição por quase todo

território brasileiro comprova a eficiência reprodutiva natural e a capacidade de adaptação da espécie a diversos ambientes, vegetando e produzindo normalmente (Pereira *et al.*, 2006).

Segundo Lorenzi (1998), o maior aproveitamento alimentar dos frutos da mangabeira são nas áreas de tabuleiros costeiros, baixadas litorâneas e Cerrado (Lorenzi, 1998). Entretanto, vem ocorrendo drástica redução de sua vegetação nativa, principalmente na costa e baixadas litorâneas nordestinas e no Cerrado do Brasil Central devido à implantação de monoculturas de coqueirais, canaviais, pastagens e especulação imobiliária (Lederman e Bezerra, 2003).

2.2.1.3 Constituintes químicos

Trabalhos iniciais de avaliação da composição química do látex da *H. speciosa* por Nogueira *et al.* (2004) utilizando a cromatografia gasosa com detector de massas (GC/MS) demonstraram mistura de triterpenos α -amirina, α - β -amirina e lupeol na forma livre e 3- β -acilado com ácidos graxos de cadeia longa. Outro estudo com GC/MS e cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC/FID) identificaram a presença de inúmeros compostos voláteis nos frutos, que resultaram na identificação de 33 compostos nos frutos verdes, predominando teor maior de monoterpenos oxigenados, destacando o linalol, α -terpineol e o geraniol, em concentrações menores, ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas (Sampaio e Nogueira (2006). Nos frutos maduros foram identificadas quantidades maiores de ésteres, alcoóis, aldeídos, cetonas e quantidade bastante reduzida de monoterpenos oxigenados. Nos frutos com estágio médio de maturação, foram encontradas todas as classes de compostos anteriormente descritos, contudo, em proporções intermediárias de concentração (Sampaio e Nogueira, 2006).

Assumpção *et al.* (2014), identificou nos frutos de *H. speciosa* por GC/MS, a presença de 83,72 % de compostos voláteis, sendo 68,11 % de ésteres. Dentre os constituintes, as classes e compostos identificados em ordem decrescente de prevalência foram ésteres (Ethyl butanoate, Isopentyl acetate, 4-isopentyl acetate, 3-methyl-2-butenyl acetate, Ethyl hexanoate e

Methyl 1,2-dimethyltetradecanoate), aldeídos (Hexanal, 2-hexenal e Bicyclo [2.2.0] hexane-1-carbaldeído), álcoois (3-methyl-2-butenol e 2-propyldecanol), hidrocarbonetos (Dimethylundecane e 3,3-dimethylhexane) e cetona (3-methoxy-3-methyl-2-butanone).

Recentemente, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector diodo (HPLC-DAD) e cromatografia líquida acoplada a um espectro de massas (LC-MS), foram identificados rutina e ácido clorogênico no extrato aquoso dos frutos (Torres-Rego *et al.*, 2016). Rodrigues *et al.* (2007), em análise com ionização por Electrospray e espectrometria de massas com analisador tipo “Íon Trap” (ESI/IT/MS) no modo íon negativo e padrões de referência, identificaram a presença de catequinas (epicatequinas) e ácido clorogênico no infuso das cascas. Outro estudo com as cascas da planta, conduzido por Moraes *et al.* (2008), utilizando método de coinjeção com as amostras de extrato hidroetanólico e infusão, também identificaram a presença de ácido clorogênico e catequina.

Outra análise de compostos voláteis, contudo, realizado com as folhas, encontrou teor variado de monoterpenos oxigenados e dentre os compostos majoritários, estão o geraniol, α -terpineol e linalol (Santos *et al.*, 2006). Ainda com as folhas, estudos espectrométricos por UV, infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C com extrato etanólico das folhas resultou na identificação dos ciclitóis, L-bornesitol, ácido quinico, ácido-5-O-cafeoil-quinico; os ácidos cinâmicos, ácido clorogênico e cis- e trans-4-hidroxi-cinâmico; os flavonóides, kaempferol-3-O-rutinoside, rutina e quercetina; e os ésteres, lupeol, α -amirina; e um 3β -O-éster de ácido graxo do lupeol (Endringer *et al.*, 2007). Nos extratos hexânico das folhas de *H. speciosa*, utilizando a técnica de RMN de ^1H e de ^{13}C , foi descrito a presença de uma combinação de hidrocarbonetos, de álcoois de cadeia longa e dos triterpenos, lupeol, α -amirina e β -amirina. Além desses, descreve a presença de obtusalina, eritrodíol, β -sitosterol, uma combinação de ésteres 3β -acilados de lupeol, α -amirina e β -amirina. Neste mesmo estudo, com o extrato etanólico das folhas, apresentou uma mistura de rutina e ácido cloroquínico (Barros *et al.*, 2008).

Recentemente Pereira *et al.*, (2015) identificaram no extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* e fração diclorometano por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) por ionização em Electrospray e espectrometria de massas ESI-LC-MS a presença de ácido quínico, ácido clorogênico, rutina e bornesitol e kaempferol, triterpenos lupeol e α -/ β -amirin, óxido cis-trans-linalol, α -terpinol e geraniol e na fração diclorometano, identificaram lupeol e a presença de monoterpenos.

2.2.1.4 Atividades biológicas da *H. speciosa*

As atividades biológicas e mecanismo de ação da *H. speciosa* e compostos isolados podem ser visualizados abaixo na (TABELA 1).

TABELA 1 – Atividades biológicas e mecanismo de ação da *H. speciosa*.

Extrato ou composto	Atividade biológica	Mecanismo de ação	Referência
Extrato etanólico das folhas	Antihipertensiva <i>In vitro</i>	Inibição da ECA	Serra <i>et al.</i> (2005)
Extrato etanólico das folhas	Antihipertensiva <i>In vitro</i>	Vasodilatação	Ferreira <i>et al.</i> (2007)
Rutina e L-(+)-bornesitol	Antihipertensiva <i>In vitro</i>	Inibição da ECA	Endringer <i>et al.</i> (2007)
Extrato etanólico e infusão da raiz	Antimicrobiano e antiúlcera <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Bactericida para <i>H. pylori</i> e aumento da secreção de muco estomacal	Moraes <i>et al.</i> (2008)
Rutina, L-(+)-bornesitol e ácido quínico	Anti-inflamatória <i>In vitro</i>	Inibição do NF-KB	Endringer <i>et al.</i> (2009)
Extrato etanólico das folhas	Anti-inflamatória <i>In vitro</i>	Inibição do NF-KB e Inibição da COX-1	Endringer <i>et al.</i> (2010)
L-(+)-bornesitol	Anti-inflamatória	Inibição seletiva da COX-2	Endringer <i>et al.</i> (2010)
Látex	Anti-inflamatória	Inibição de PGE ₂ , IL-6, TNF- α e óxido nítrico	Marinho <i>et al.</i> (2011)
Extrato etanólico das folhas	Antidiabética <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Inibição da α -glicosidase, aumento do consumo de glicose em adipócitos e redução da glicemia	Pereira <i>et al.</i> (2015)

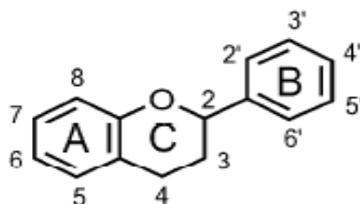
Rutina, L-(+)-bornesitol e ácido quínico	Anti-inflamatória <i>In vitro</i>	Inibição de TNF- α	Geller <i>et al.</i> (2015)
Extrato etanólico das folhas, L-(+)-bornesitol e ácido quínico	Cicatrizante <i>In vitro</i>	Migração e proliferação de fibroblastos	Geller <i>et al.</i> (2015)
Extrato etanólico das folhas	Antihipertensiva <i>In vivo</i>	Aumento de óxido nítrico	Silva <i>et al.</i> (2016)
Extrato aquoso dos frutos, rutina e ácido clorogênico	Anti-inflamatória <i>In vivo</i>	Redução de IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α	Torres-Rego <i>et al.</i> (2016)
Extrato etanólico da casca	Antialzheimer	Inibição da AChE	Penido <i>et al.</i> (2017)

Enzima conversora da angiotensina (ECA), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), Fator de necrose tumoral KB (NF- κ B), ciclo-oxigenase 1 (COX-1), ciclo-oxigenase 2 (COX 2), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e acetilcolinesterase (AChE).

2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são moléculas que consistem de vários grupos de compostos chamados de flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianidinas e flavan-3-ols (Marín *et al.*, 2014). São metabólitos secundários mais frequentes em plantas medicinais e apresenta estrutura básica formada por 3 anéis A, B e C, sendo um anel cromano (C) anexado aos 2 anéis aromáticos (A e B) representados na (FIG. 2) (Tsuchiya, 2015).

FIGURA 2 - Estrutura química básica dos flavonoides.



Fonte: Tsuchiya (2015).

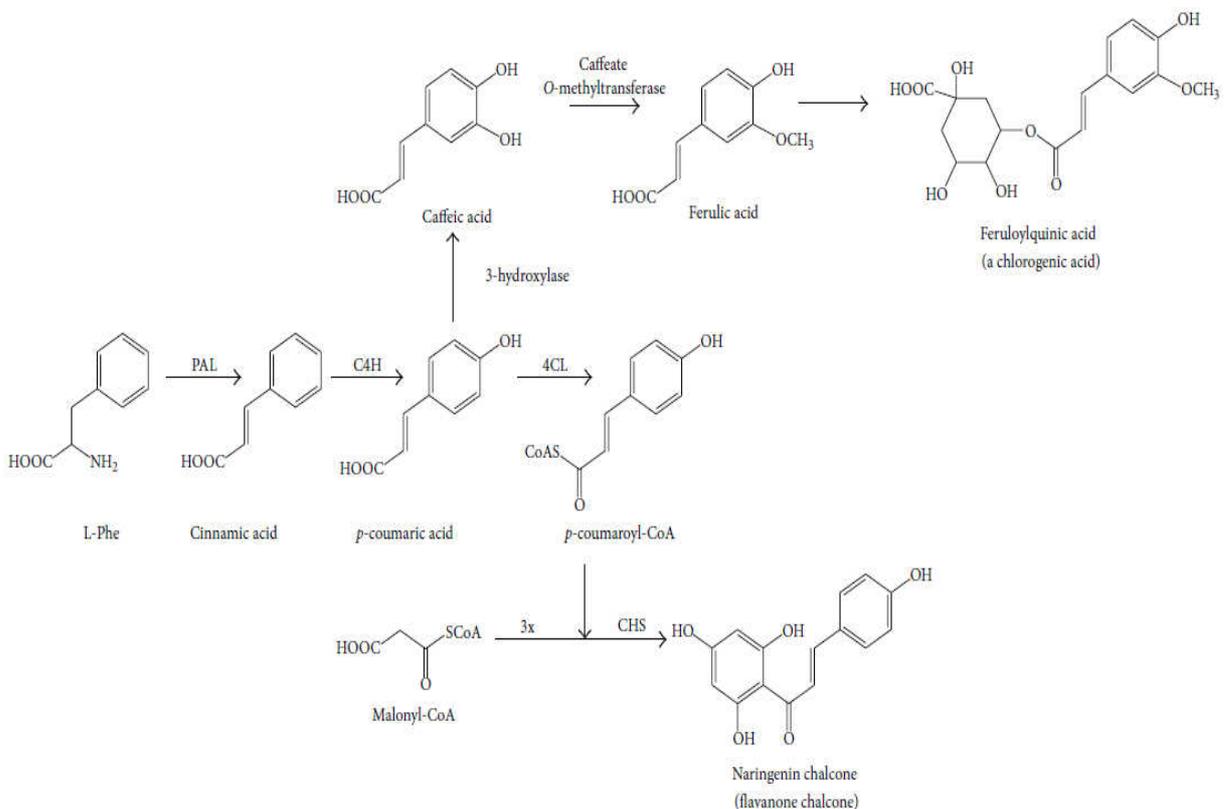
2.2.2.1 Diversidade estrutural

Flavonoides são produzidos nos cloroplastos para defesa contra o dano oxidativo gerado durante a fotossíntese (Agati *et al.*, 2013), em órgãos

sexuais para proteção da radiação UV (Mori *et al.*, 2005) e na raiz para atrair bactérias e fungos simbiotes (Sugiyama *et al.*, 2007) ou para a defesa contra vírus, bactérias, fungos e herbívoros (Gottlieb, 1989).

Todos os compostos fenólicos e flavonoides derivam a partir da L-fenilalanina, isso acontece após diversas transformações que ocorrem na via de fenilpropanóides, que convertem L-fenilalanina (L-Phe) em ácido cinâmico (por liase fenil amônia (PAL)), depois em ácido p-cumárico (por cinamato-4-hidroxilase (C4H)) e sua transformação em p-coumaroyl-CoA (por 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL)). Ambos p-coumaroyl-CoA redutase e ácido p-cumárico constroem blocos para flavonoides e ácidos hidroxicinâmico, respectivamente (Vogt, 2010). Na biossíntese de flavonoide, uma molécula de p-coumaroyl-CoA e três moléculas de malonil-CoA são utilizadas pela chalcona-sintase (CHS) com finalidade de gerar chalcona naringenina, uma chalcona bicíclica que pode ser visualizado na (FIG. 3) (Gottlieb, 1989).

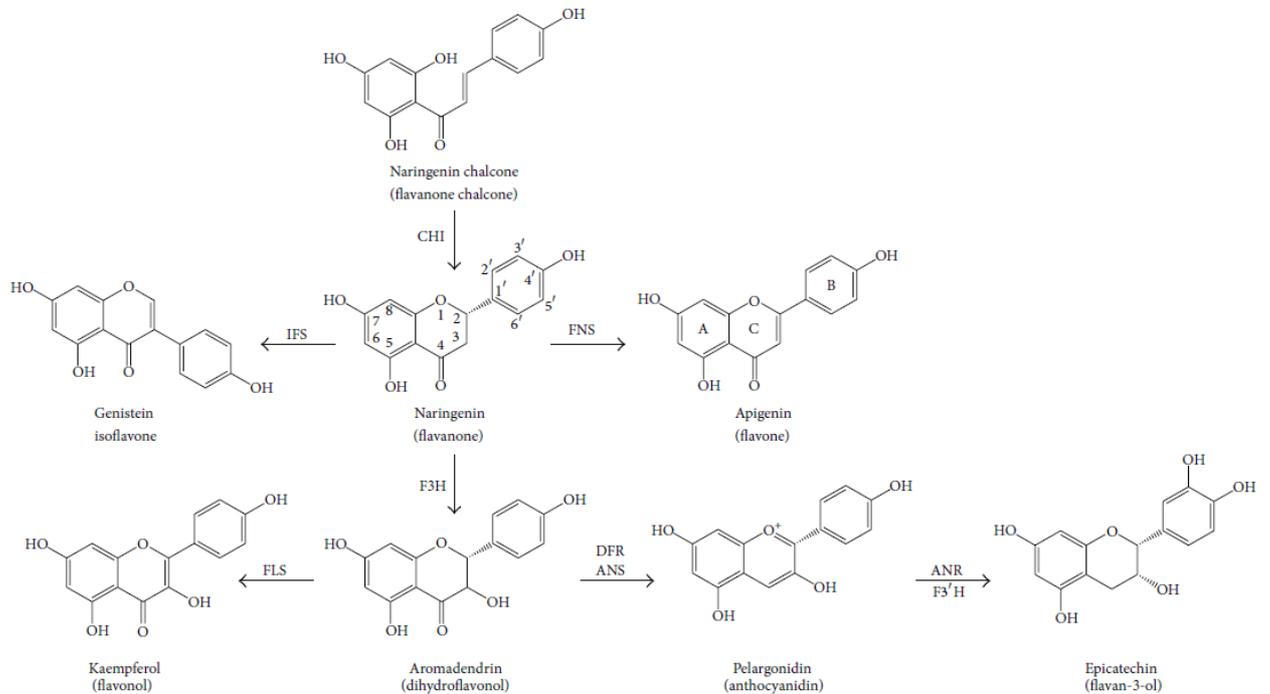
FIGURA 3 - Passos iniciais durante a biossíntese de ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides em plantas.



Fonte: Marín *et al.* (2014).

As chalconas são substratos para chalcona isomerase (CHI), que realiza o fechamento do anel B destes compostos, tornando flavanonas (como Naringenina de frutas cítricas). Todas as subfamílias de flavonoides derivam dessas flavanonas com 15 carbonos. Outras enzimas fenilpropanóicas irão gerar os demais produtos finais (Gottlieb, 1989). Flavona sintase (FNS) dá origem as flavonas (como apigenina do aipo) e isoflavona sintase (IFS) origina as isoflavonas (como a genisteína da soja). Flavanona-3-hidroxilase (F3H) irá gerar dihidroflavonols (como aromadendrina de pinheiros). Flavonois sintase (FLS) gera flavonois (como a quercetina da cebola ou kaempferol de alcaparras). A di-hidroflavonol redutase (DFR) e sintase antocianina (ANS) geram antocianidinas (como pelargonidina de diversas flores vermelhas). Antocianidina redutase (ANR) gera flavan-3-ols (epicatequina de cacau) e pode ser visualizado na (FIG. 4) (Marin *et al.*, 2014).

FIGURA 4 - Etapas biossintéticas para geração de subfamílias de flavonóides. Estrutura da naringenina mostra os números de átomos da estrutura e apigenina mostra a denominação dos anéis.



Fonte: Marín *et al.* (2014).

Os flavonoides são normalmente presentes e armazenados nos tecidos vegetais sob a forma de diversos derivados, principalmente açúcar O-conjugados na posição do carbono 2 (chalconas), no carbono 3 (flavonois, antocianidinas e flavan-3-ols), ou no carbono 7 (flavanonas, flavonas e isoflavonas). Os açúcares mais comumente ligados são a glicose, galactose, ramnose, xilose, rutinose, arabinopiranosose e arabinofuranose (Crozier *et al.*, 2009). Estas alterações (e outras como metilação e ligação galato) adicionam estabilidade estrutural extra para os flavonoides durante o armazenamento em vacúolos e cloroplastos (Marinova *et al.*, 2007; Pourcel *et al.*, 2010; Raab *et al.*, 2010).

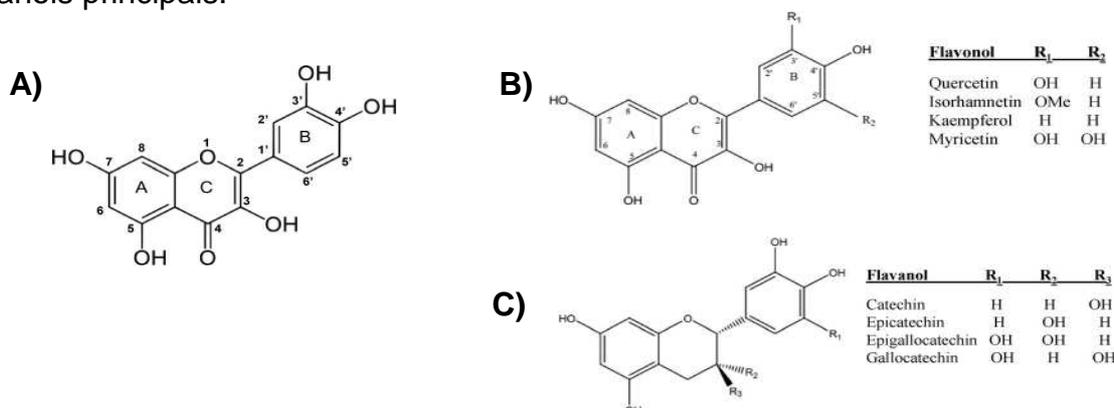
Quando a planta, fruta, ou semente é coletada, os flavonoides normalmente têm boa estabilidade no estado conjugado, mantendo altas concentrações em alimentos e bebidas. Todas essas modificações estruturais e de ligação aos açúcares vão determinar sua absorção e biodisponibilidade (Lewandowska *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Quercetina

Os glicosídeos da quercetina foram identificados no EEHS e utilizados neste estudo. Além disso, dentre os flavonoides, os glicosídeos da quercetina são considerados os mais abundantes (Arabbi *et al.*, 2004). O nome quercetina deriva do latim *Quercetum* e tem sido usado desde 1857 (D'Andrea, 2015).

Este flavonoide remove inibidores de efluxo do hormônio vegetal auxina, envolvido na fase embrionária e desenvolvimento da planta (Fischer *et al.*, 1997). A quercetina é uma representante da família dos flavonois, compostos que apresentam o esqueleto de 3-hydroxyflavone (FIG. 5 A). Flavonois (com um "o") (FIG. 5 B) não devem ser confundidos com flavanois (com um "a") (FIG. 5 C), outra subclasse de flavonoides contendo o esqueleto 2-fenil-3,4-di-hidro-2H-cromen-3-ol (Proantocianidinas/taninos condensados) (D'Andrea, 2015).

FIGURA 5 - A) Estrutura química da quercetina, B) moléculas pertencentes à família dos flavonols e suas estruturas químicas e C) estrutura química dos flavanols principais.

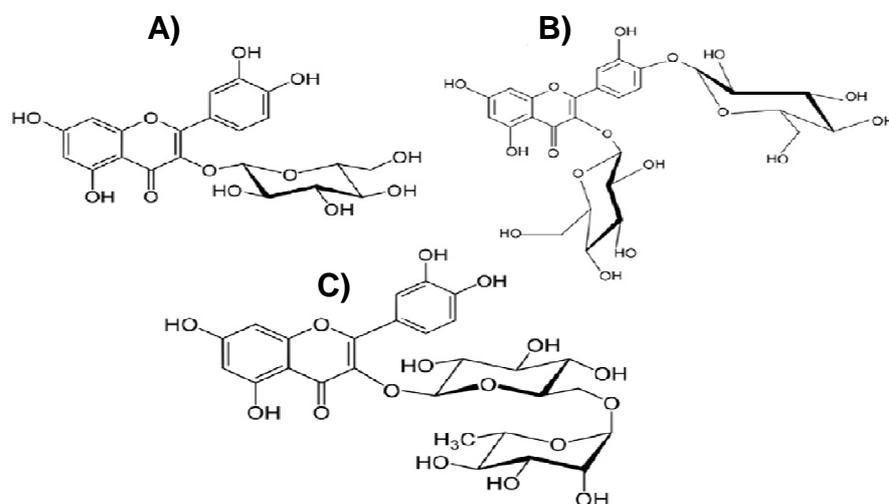


Fonte: D'Andrea (2015).

2.2.2.2.1 Fontes dietéticas

Dentre os flavonoides presentes na dieta, quercetina é o mais comum, presentes em muitos alimentos, incluindo legumes, tubérculos, frutas, ervas, especiarias, bem como nas bebidas chá e vinho, principalmente na forma de glicosídeos, ou seja, ligada ou conjugada a um ou dois resíduos de glicose (quercetina glicosídeo) ou rutinose (quercetina rutinosídeo) (FIG. 6) (Brown, 1980). Dessa forma, menos quantidades de quercetina na forma aglicona estão presentes na dieta (D'Andrea, 2015).

FIGURA 6 – A) Estrutura química da quercetin-3-glicosídeo (isoquercetina), B) quercetin-3,4'-diglicosídeo (quercetina) e C) quercetin-3-rutinosídeo (rutina).



Fonte: D'Andrea (2015).

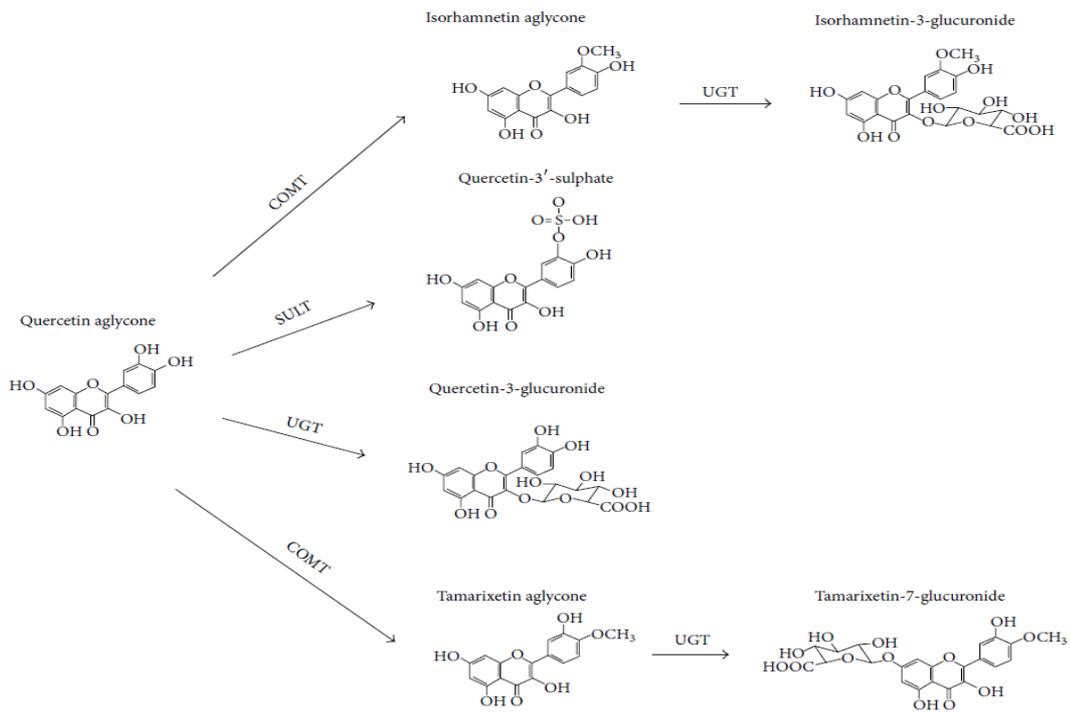
A concentração de quercetina na forma aglicona em muitos alimentos são influenciados pelo tipo de cultivo, de forma orgânica apresentam concentrações maiores do que no cultivo convencional (Mitchell *et al.*, 2007). A presença de quercetina na forma aglicona em uma dieta tipicamente ocidental é naturalmente mais frequente e elevada (3500 ppm) em vegetais e frutas, incluindo cebola, pimentão, mirtilo, maçã, cereja e uva (Marín *et al.*, 2014).

2.2.2.2 Absorção e Metabolismo

Os derivados quercetina na forma glicosilada não são facilmente absorvidos no trato digestivo, e a maior parte da absorção ocorre após a transformação para forma aglicona (Appleton *et al.*, 2010; Orfali *et al.*, 2016). Os flavonoides na forma aglicona podem ser absorvidos mais facilmente pelas células epiteliais do intestino grosso devido a sua lipofilicidade, o que facilita a passagem pela camada fosfolipídica da membrana celular (Murota e Terao, 2003).

Após a ingestão, os derivados quercetina glicosilados são primeiramente hidrolisados por glicosidases no intestino delgado ou da microbiota no cólon intestinal em quercetina aglicona (Fase I; modificação) (Tamura *et al.*, 1980; Guo e Bruno, 2015). Sequencialmente, quercetina aglicona sofre biotransformações com envolvimento da UGT (uridina 5'-difosfoglicuronosiltransferase), SULT (sulfotransferase) e COMT (catecol-O-metiltransferase), gerando diversos metabólitos por glucorinidação, fosfatação, metilação, entre outras (fase II: conjugação) que são apresentados na (FIG. 7) (Guo e Bruno, 2015).

Figura 7 - Estrutura da quercetina e alguns dos seus principais metabólitos.



Fonte: Costa *et al.* (2016).

Na fase II, os metabólitos de quercetina são secretados para a circulação portal e linfática, sendo evidenciada maior concentração plasmática no sistema porta e linfa de quercetina aglicona conjugada (Arts *et al.*, 2004; Murota *et al.*, 2013). Estudos em animais têm mostrado que a quercetina se distribui para vários órgãos, especialmente no pulmão, rim, cólon, fígado e em menor quantidade para o cérebro (de Boer *et al.*, 2005). Na fase de eliminação (III), o efluxo de metabólitos da fase II também acontece no intestino delgado e pela excreção biliar (Arts *et al.*, 2004).

2.2.2.2.3 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade é definida como a razão entre a quantidade de uma substância ingerida por via oral e a quantidade que é absorvida e disponível para atividade enzimática ou de armazenamento (Jackson, 1997). Os fatores que mais influenciam a absorção de quercetina, primeiramente está

relacionada a natureza do açúcar ligado e segundo, depende da solubilidade após adição ou conjugação com aditivos (D'Andrea, 2015).

Neste contexto, o primeiro estudo farmacocinético da quercetina em humanos sugeriu uma biodisponibilidade do flavonoide após uma dose oral foi muita baixa, aproximadamente 2 % (Gugler *et al.*, 1975). Entretanto, mais recentemente, utilizando quercetina aglicona marcada com agente radioativo, verificou uma biodisponibilidade plasmática absoluta para o flavonoide de 44,8 % em humanos (Walle *et al.*, 2001). Além disso, para obter uma relevante concentração plasmática em humanos, a dose ingerida deve ser de aproximadamente 50 mg equivalentes de quercetina aglicona, quantidade superior a ingerida normalmente em uma dieta (6-18 mg/dia) (Hertog *et al.*, 1993; Sampson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010). Para potencial aplicação clínica da quercetina, a meia vida plasmática do flavonoide e seus metabólitos estão estabelecidos entre 11 a 28 h (Manach *et al.*, 2005; Boots *et al.*, 2008).

2.2.2.3 Catequinas

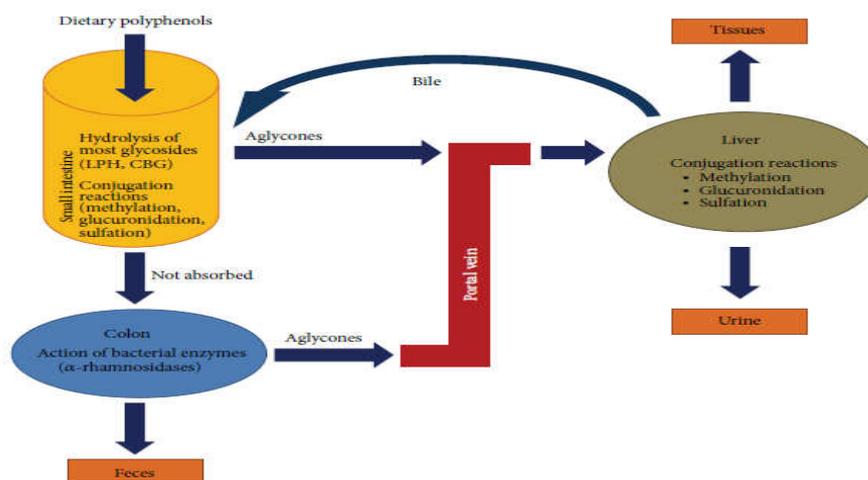
Outro flavonoide identificado no EEHS e também utilizado neste estudo é a catequina. Os flavan-3-óis, abundantes no chá verde, cacau, banana, romã, dentre outras (Marín *et al.*, 2014), tais como (+) catequina e (-) epicatequina, não são glicosilados, entretanto, podem estar associados a ésteres de ácido gálico. Estes compostos são absorvidos nos enterócitos sem qualquer desconjugação ou hidrólise (Nakagawa *et al.*, 1997). Os flavonoides como catequina e epicatequina são os constituintes monoméricos dos taninos condensados (Marín *et al.*, 2014). Proantocianidinas são polímeros constituídos de duas ou três unidades de flavan-3-óis, sendo as catequinas, exemplo de unidade mais simples. As proantocianidinas apresentam elevado peso molecular, sendo que, os oligômeros maiores que trímeros são improváveis de serem absorvidos no intestino delgado na sua forma nativa, assim, são metabolizados no cólon e transformados para formas aglicona e galato (Deprez *et al.*, 2001; Marín *et al.*, 2014).

A meia vida plasmática desses compostos é estimada entre 3 a 4 horas (Lee *et al.*, 2002), sendo a biodisponibilidade das catequinas influenciada por

diversos fatores, dentre eles, incluem a degradação oxidativa, instabilidade gastrointestinal, baixa permeabilidade e transformações metabólicas (Bansal *et al.*, 2013). Neste sentido, diversos estudos foram conduzidos na tentativa de melhorar a biodisponibilidade das catequinas (Lee *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2004; Batchelder *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014), assim como, existem tentativas de desenvolvimentos de análogos das catequinas com melhor potencial de uso terapêutico (Bansal *et al.*, 2013).

Compostos fenólicos apresentam semelhanças do ponto de vista farmacocinético, sendo apresentadas de forma resumida, as vias de absorção e metabolismo desses compostos na (FIG. 8).

FIGURA 8 - Resumo das vias de absorção e metabolismo de compostos fenólicos e derivados provenientes da dieta em humanos.



Fonte: Marín *et al.* (2014)

Portanto, extratos naturais e derivados fenólicos com potencial farmacológico antimicrobiano, antioxidante, citotóxico (Santos *et al.*, 2016), anti-inflamatório (Endringer *et al.*, 2009; Geller *et al.*, 2015), de inibição da enzima acetilcolinesterase (Penido *et al.*, 2017), antiobesidade (Araldi *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, 2016), antidiabético (Pereira *et al.*, 2015), entre outras, podem servir como estratégia de tratamento alternativo seguro e com menor custo quando comparados às drogas sintéticas (Birari e Bhutani, 2007; Slanc *et al.*, 2009; de la Garza *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2016).

2.3 MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Extratos da casca de *H. speciosa* apresentaram efeito antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) e *Helicobacter pylori* (Gram-negativo) (Moraes *et al.*, 2008). Amin *et al.* (2015) demonstraram que o flavonoide quercetina, também presente nos extratos de *H. speciosa*, apresenta ação contra micro-organismos de importância médica, incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), nome designado a cepa que apresenta resistência as penicilinas e considerada um grande problema em hospitais e comunidades do mundo inteiro (Diekema *et al.*, 2001).

A descoberta e o desenvolvimento do antibiótico penicilina no início do século passado trouxe esperança para a ciência médica. Entretanto, não muito tempo após a sua introdução, foi verificado o fenômeno da resistência ao antibiótico em bactérias antes suscetíveis a sua ação (Chandra *et al.*, 2017). O uso indiscriminado e irracional de antibióticos criou um desafio sem precedentes, o desenvolvimento da resistência aos antibióticos é globalmente preocupante, principalmente em quatro patógenos, MRSA, *Klebsiela pneumoniae* resistente a múltiplas drogas e produtoras de carbapenemases, *salmonella* não tifoide e *Micobacterium tuberculosis* resistente a múltiplas drogas e extremamente resistente às drogas (Prestinaci *et al.*, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou maior resistência antimicrobiana entre os micro-organismos presentes em infecções do trato respiratório, diarreia, meningite, sífilis, gonorréia e tuberculose (WHO, 2014). Entretanto, infecções em ambientes hospitalares por micro-organismos resistentes têm evoluído para endocardite infecciosa, artrite séptica, osteomielite, sepse e choque séptico, tornando o tratamento mais desafiador, dispendioso e com maior mortalidade (Van Hal *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2015). A sepse é uma disfunção do organismo com risco de vida para o paciente em resposta a uma infecção generalizada (Greenhalgh, 2017). As bactérias são os micro-organismos que mais tem apresentado resistência, porém, infecções fúngicas sistêmicas ocasionadas por diversas espécies de *Candida*, são de difícil diagnóstico, de tratamento limitado e com altas taxas de mortalidade,

uma vez que, o número de antifúngicos disponíveis no mercado é bem reduzido (Cannon *et al.*, 2009).

Infecções hospitalares são muitas vezes associadas a ventilação artificial, uso de cateter de acesso venoso central e procedimentos que podem acarretar em maior morbidade e mortalidade (Prestinaci *et al.*, 2015). Segundo Marra (2016), é necessária a introdução de medidas de prevenção para estas infecções, principalmente em unidades de terapia intensiva, bem como em diferentes unidades hospitalares. Tais medidas preventivas são extremamente importantes, tendo em vista que, caso haja falha na terapia convencional, haverá aumento nas altas taxas de morbidade e mortalidade, e maiores custos, principalmente quando antimicrobianos novos e mais caros são adicionados na prática clínica (Prestinaci *et al.*, 2015).

2.3.1 Bactérias

2.3.1.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positivo que apresenta capacidade de promover principalmente infecções de pele e tecidos moles, pneumonia e infecções sanguíneas (Chessa *et al.*, 2015). Dentre a espécie, cepas de MRSA emergiram durante a década de 1960 e se espalhou nos anos seguintes em associação com o aumento do número de pacientes idosos e imunocomprometidos (WHO, 2014). Esse micro-organismo pode causar infecções graves, incluindo pneumonia, infecções do sítio cirúrgico, bacteremia e sepse. Infecções hospitalares por MRSA estão associadas ao uso de dispositivos médicos, dentre eles, cateteres de acesso venoso central e hemodiálise (Prestinaci *et al.*, 2015).

As infecções por MRSA requerem tratamento com antibacterianos de segunda linha, como a vancomicina e teicoplanina, entretanto, é mais caro, e por ser injetáveis necessita de monitoramento cuidadoso para prevenção de efeitos secundários adversos (WHO, 2014). Novas opções de tratamento das infecções por MRSA, como o linezolid e daptomicina, também são caros e não desprovidos de efeitos colaterais (WHO, 2014; Prestinaci *et al.*, 2015). Estudos

epidemiológicos realizados pelo National Nosocomial Infections Surveillance afirma que 59,5 % das infecções hospitalares em unidades de cuidado intensivo são provocadas pelo MRSA (NNIS, 2004). Globalmente, as proporções de infecções pelo MRSA ultrapassam os 20 % nas regiões da OMS, sendo que em alguns países, ultrapassam os 80 % (WHO, 2014). No Brasil, infecções ocasionadas por MRSA também são frequentes quando comparados a estirpe sem resistência, sendo em unidades de cuidados intensivos, entre 40 a 80 % das infecções (Anvisa, 2016).

2.3.1.2 *Klebsiela pneumoniae*

Klebsiela pneumoniae é um bacilo Gram-negativo classicamente descrito por causar pneumonia adquirida na comunidade e que apresenta altas taxas de mortalidade quando associada a pacientes com alcoolismo crônico ou imunodeprimido. Entretanto, além de pneumonia, podem ocasionar infecções do trato urinário, bacteremia, abscesso hepático, meningite e endoftalmite (Eisenstein e Zaleznik, 2000; Landman *et al.*, 2007). Além disso, segundo Chelazzi *et al.* (2015), 65,2 % das bactérias que promovem infecções em unidades de terapia intensiva são Gram-negativo, dentre elas, destaca-se a *Klebsiela pneumoniae*, responsável por 30 % das infecções.

A resistência mediada por beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) inativa todas as penicilinas, cefalosporinas (incluindo de terceira geração) e aztreonam. Estudos recentes apresentam uma prevalência de *Klebsiela pneumoniae* produtor de ESBL de 38,9 % na Europa, 8,8 % nos Estados Unidos da América e 21,5 % na região da Ásia-Pacífico (Delgado-Valverde *et al.*, 2013). A OMS relatou que a resistência de cefalosporinas de terceira geração para esse micro-organismo foi superior a 30 % em todo o mundo e superior a 60 % em alguns países (WHO, 2014). Além disso, em 1996 foi identificado a primeira *Klebsiela pneumoniae* resistente a múltiplas drogas e produtoras de carbapenemases (KPC), enzima com capacidade de hidrolisar todos os beta-lactâmicos, incluindo o carbapenem (Prestinaci *et al.*, 2015).

Neste sentido, poucas opções terapêuticas permanecem viáveis para tratamento de infecções causadas por KPC, dentre elas, a colistina, antibiótico

antigo e muito tóxico. Entretanto, de 178 infecções por KPC em um hospital na Itália, 43 % apresentaram resistência a colistina. Diante dessa constatação, a necessidade de prevenção e controle de infecções por estes patógenos quase que intratáveis são altamente necessárias (Monaco *et al.*, 2014; Prestinaci *et al.*, 2015).

2.3.1.3 *Proteus mirabilis*

A bactéria do gênero *Proteus* é um bacilo Gram-negativo de crescimento rápido e foi descrita pela primeira vez por Gustav Hauser em 1885. Essa bactéria apresenta recursos excepcionais que podem ser explorados para uso em biorremediação de ambientes, uma vez que, podem utilizar metais pesados e produtos tóxicos como fonte de energia e nutrição (Drzewiecka, 2016).

Entretanto, *Proteus mirabilis*, micro-organismo que faz parte da flora normal do intestino humano, promove bacteriúria assintomática e infecções sintomáticas do trato urinário, particularmente em pacientes hospitalizados utilizando cateter urinário, idosos, diabéticos e com anormalidades estruturais do trato urinário (Stickler, 2014). Estudo realizado na América do Norte, acompanhando 3.000 casos de infecção do trato urinário, verificou uma prevalência de infecção por *Proteus mirabilis* de 4 % (Karlowsky *et al.*, 2011). Entretanto, tais infecções por *Proteus mirabilis* podem evoluir para bacteremia e sepse (Schaffer e Pearson, 2015).

A infecção do trato urinário é o tipo mais frequente ocasionada por essa estirpe de micro-organismo, entretanto, infecção no trato respiratório, olho, ouvido, nariz, pele, garganta, queimaduras e feridas, meningoencefalite neonatal, empiema, osteomielite e raramente artrite séptica podem ser observadas (Schaffer e Pearson, 2015; Sbiti *et al.*, 2017).

A formação de biofilme, condição que confere maior resistência do *Proteus mirabilis* a ação do sistema imune do hospedeiro e aos antibióticos é ocasionada pela capacidade de motilidade e secreção de polissacarídeo, que em contato com superfícies sólidas promovem fixação e crescimento,

principalmente em cateteres e equipamentos médicos (Foris e Snowden, 2017).

Os mecanismos de escape desenvolvidos pelas bactérias em geral, tem apresentado elevada resistência aos agentes antimicrobianos, fenômeno descrito como preocupante, uma vez que, o desenvolvimento de novas drogas convencionais está diminuindo e o número de medicamentos inovadores que chegam ao mercado, ainda parece insuficiente para atender a demanda crescente da resistência bacteriana (Brow *et al.*, 2014). Neste sentido, estudos sugerem que a evolução da resistência associada a produção insuficiente de agentes antimicrobianos tem levado segmentos a se preocupar com uma eminente era pós-antibióticos (Appelbaum, 2012).

2.3.1.1.1 Resistência bacteriana

Recentemente, a OMS iniciou a primeira semana mundial de consciência ao uso de antibióticos, alertando sobre a ameaça global da resistência antimicrobiana e o uso inadequado de agentes antimicrobianos (World Antibiotic Awareness Week, 2015). A resistência bacteriana é facilitada pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos na clínica e em outras atividades, como agricultura, pecuária e meio ambiente (Prestinaci *et al.*, 2015). O aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos é reconhecido em todo o mundo, bem como, um aumento na frequência de isolados clínicos resistentes a múltiplas drogas. Além disso, o termo extremamente resistente às drogas foi aplicado em isolados para os quais não há opções terapêuticas disponíveis (Paterson e Doi, 2007). A resistência aos agentes antimicrobianos tem implicações importantes de morbidade, mortalidade e custos financeiros elevados, tanto em hospitais, quanto na comunidade (Cosgrove *et al.*, 2005).

A resistência bacteriana prejudica a capacidade de tratamento das infecções, o que representa um desafio crescente para os serviços de saúde pública em todo o mundo (Smith e Costa 2013). Espécies de bactérias quando resistentes aos agentes antimicrobianos aumentam a morbidade e mortalidade em infecções hospitalares, principalmente por promover sepse grave e choque séptico (Prestinaci *et al.*, 2015). Essa situação fez o centro de controle e

prevenção de doenças dos Estados Unidos da América a iniciar o monitoramento dessas infecções (CDC, 2013).

Os agentes antimicrobianos são distribuídos em categorias de acordo com seu mecanismo de ação. Dentre as ações desenvolvidas pelos antimicrobianos, incluem a interferência na síntese da parede celular, DNA e RNA, lise da membrana bacteriana, inibição da síntese proteica e interferência metabólica, entre outras (Chandra *et al.*, 2017). Para que os agentes antimicrobianos tenham eficácia, é importante que o fármaco esteja em quantidades suficientes para ultrapassar a membrana celular bacteriana e intracelularmente alcançar os alvos moleculares. No interior da bactéria, a droga precisa interagir com seu alvo e desencadear a morte da bactéria, evitando a ação de bombas de efluxo (Brow *et al.*, 2014). Também, o antimicrobiano precisa evitar a inativação por enzimas capazes de modificar o fármaco no ambiente extracelular ou no interior da célula (O'shea e Moser, 2008).

Entretanto, as bactérias utilizam mais de um caminho para evitar a ação dos antimicrobianos, dessa forma, a ação conjunta de vários mecanismos podem produzir aumento da resistência, conforme ilustrado na (FIG. 9) (Cantón, 2009). Diante de tais dificuldades e desafios, existe uma necessidade urgente para buscar novas moléculas antimicrobianas ou compostos provenientes de plantas que tenham um amplo espectro de atividade contra espécies bacterianas (Chandra *et al.*, 2017).

Tal resistência constitui uma capacidade adquirida ou intrínseca do micro-organismo (Rice e Bonomo, 2005). Para se tornar resistente aos agentes antimicrobianos, comunidades bacterianas utilizam estratégias diferentes, incluindo respostas de engenharia (De la Cruz *et al.*, 2002). Respostas naturais incluem o uso da maquinaria bacteriana pré-existente ou de genes adquiridos de outras bactérias e mutação em genes pré-existentes (resposta pró-ativa) ou de genes adquiridos (resposta pós-ativa). Alguns desses mecanismos requerem processos de engenharia que envolve diferentes plataformas genéticas usadas para mobilização, aquisição e montagem dos genes de resistência adquiridos (Dzidic, *et al.*, 2007; Cantón, 2009).

Dentre as formas pelas quais as bactérias promovem resistência aos antibióticos, a intrínseca pode ser ocasionada por proteínas que funcionam como bomba de efluxo, presente em *Escherichia coli*, *Pseudomas* spp. e *Campylobacter jejuni* (Lomovskaya e Bostian, 2006; Rahman *et al.*, 2017). Esse bombeamento pode acontecer em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo através da aquisição de plasmídeos provenientes de microorganismos resistentes as quinolonas (Chopra e Roberts, 2001; Cantón, 2009). O efluxo ativo em bactérias é realizado por proteínas não específicas, que identificam e expulsam produtos químicos e agentes antibacterianos sem alterações ou degradação (Kumar e Schweizer, 2005).

A transferência de material genético entre as mesmas espécies bacterianas ou espécies diferentes, além da transferência através do progenitor para sua progênie, é denominada transferência horizontal. As espécies bacterianas podem trocar o material genético através dos processos de recombinação genética transformação (incorporação de DNA livre), conjugação e transdução (mediada por bacteriófago) (Chandra *et al.*, 2017).

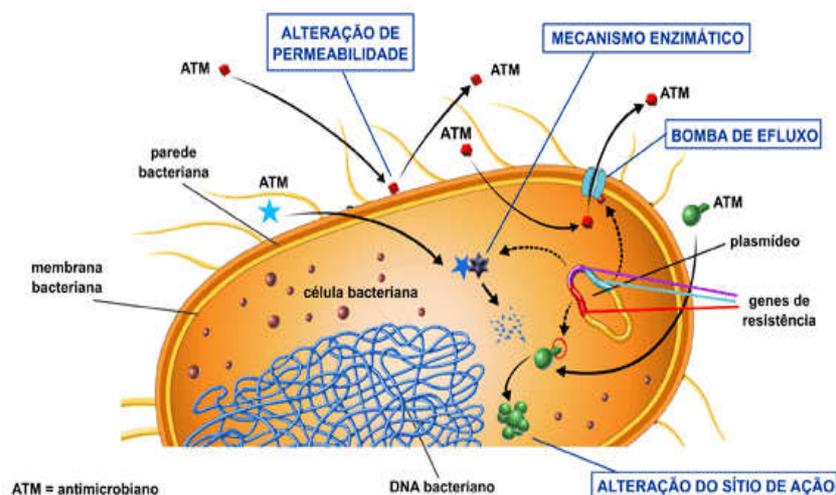
Estes processos de transmissão genética são facilitados por elementos genéticos móveis (transposons, integrons, plamídeo) (WHO *et al.*, 2014). Os plasmídeos são materiais extracromossômicos presentes nas bactérias e carregam genes codificantes para resistência a certos tipos de antibióticos que podem ser transmitidos a outras bactérias através da conjugação. Durante a conjugação, o pilus sexual que se forma entre duas células bacterianas é o modo através do qual o material genético ou plasmídeo que transporta genes resistentes são transferidos (Chandra *et al.*, 2017).

Bactérias patogênicas desenvolveram resistência aos antibióticos β -lactâmicos por modificação da droga ou liberando enzimas, como transferases que inibem ou quebram a estrutura química dos antibióticos (Wright, 2005). Em bactérias Gram-negativo, os aminoglicosídeos tornaram-se ineficazes, uma vez que, essas bactérias promovem à modificação de antibióticos através da fosforilação, adenilação e acetilação (Bush e Fisher, 2011). As β -lactamases hidrolisam a ligação do anel beta-lactâmico dos antibióticos, destruindo assim, o local de ligação dos antimicrobianos β -lactâmicos as proteínas de ligação a penicilina nas bactérias (Wright, 2005).

A ação da penicilina foi rapidamente prejudicada com o aparecimento de resistência do *Staphylococcus aureus* devido à penicilinase mediada por plasmídeos. Essa β -Lactamase rapidamente se espalhou para a maioria dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, bem como para outras espécies de estafilococos (Zahar *et al.*, 2015). Mais de 1000 enzimas β -lactamases de ocorrência natural foram identificadas (Bush e Fisher, 2011).

As β -lactamases de interesse clínico e que apresentam espectro de ação distinto sobre os fármacos, são β -lactamases de espectro estendido (ESBL) em *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, KPC e metalobetalactamase em *Klebsiela pneumoniae* e *Escherichia coli*, respectivamente, e β -lactamase classe C (AmpC) em *Escherichia coli* (Thompson, 2001; WHO, 2014; Prestinaci *et al.*, 2015). A produção de ESBL mediada por plasmídeo hidrolisa penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, entretanto, são inibidas por inibidores de beta-lactamases, incluindo o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam (WHO, 2014). KPC são eficientes em hidrolisar todas as cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e até mesmo inibidores de β -lactamases (Carmeli *et al.*, 2010; Akova *et al.*, 2012). AmpC não é produzida cromossomicamente por *Proteus mirabilis* e *Klebsiela pneumoniae*, uma vez que, não possuem o gene (Thompson, 2001), entretanto, podem apresentar a produção dessa enzima devido a transferência plasmidial do gene *Bla_{AmpC}* adquirido de outras bactérias (Alvarez *et al.*, 2004).

FIGURA 9 - Mecanismos gerais de resistência aos antimicrobianos.



Fonte: Anvisa (2016)

Os agentes antimicrobianos atuam em um local da bactéria através da ligação e modificação da sua função, esse local é chamado de alvo. As células bacterianas tornaram-se resistentes a alguns antibióticos devido à mutação desse alvo. A alteração ou modificação do alvo pode ser ocasionada pela ação de enzimas constitutivas e induzíveis produzidas pelas bactérias (Chandra *et al.*, 2017). Em MRSA a modificação do alvo acontece devido ao elemento genético transponível móvel (transposon ou sequências de DNA móvel) *SCCmec*, que contém o gene de resistência *MecA*, que codifica para a síntese da proteína de ligação a penicilina 2a (PBP2a) (WHO, 2014).

As fluoroquinolonas interferem na ação da DNA girase e topoisomerase IV. Para *Staphylococcus* spp. DNA girase é considerado um alvo limitado de ação das quinolonas, enquanto que topoisomerase IV é o alvo primário de sua ação. Neste sentido, em *Staphylococcus* spp. a resistência contra quinolonas acontece devido a alterações desenvolvidas principalmente no alvo primário (Chandra *et al.*, 2017).

Outra forma de resistência é a alteração da permeabilidade da membrana externa, que ocorre por meio de proteínas na membrana externa chamadas de porinas que possuem a capacidade de produzir grandes canais abertos, permitindo a passagem de água, nutrientes hidrofílicos e o efluxo de resíduos. Entretanto, porinas em bactérias Gram-negativo também podem excluir antibióticos e inibidores (sais biliares) (Scorciapino *et al.*, 2016).

2.3.2 Fungos

Os fungos apresentam potencial patogênico e são representados por um grupo diversificado de organismos, eles podem viver como saprófitas, simbionte, comensais ou parasitas (Murray *et al.*, 2005). Tais organismos são classificados num reino próprio e distinguem-se de outros organismos eucariotas por serem quimiorganoheterotróficos, apresentam parede celular rígida composta por quitina e glucano e uma membrana celular em que o ergosterol substitui o colesterol. Dentre as estirpes, os fungos filamentosos ou pluricelulares constituem a maioria (Murray *et al.*, 2005). Os fungos leveduriformes são fungos unicelulares, entretanto, *Candida* é um fungo

dimórfico com características fenotípicas distintas em sua forma leveduriforme e hifa (Rizzetto *et al.*, 2015).

2.3.2.1 *Candida spp.*

Infecções oportunistas apresentam elevada taxa de morbidade e mortalidade (Gudlaugsson *et al.*, 2003). Leveduras do gênero *Candida* são agentes patogênicos oportunistas mais comuns de infecções em humanos, ocasionando 80 % de todas as infecções fúngicas em ambiente hospitalar (Kim e Sudbery, 2011). Os fatores de risco e sepse tardia por *Candida sp.*, incluem pacientes com internação por mais de 72 h em unidades de terapia intensiva, exposição a antibióticos de amplo espectro, terapia imunossupressora, nutrição parenteral e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Cassone e Cauda, 2012; Colombo, 2014, Doi *et al.*, 2016).

Apesar de todos os avanços nas práticas médicas, infecções sistêmicas por *Candida sp.* são consideradas de difícil diagnóstico, hospitalização prolongada, taxa de mortalidade próxima de 50 % e elevados custos para os sistemas de saúde (Colombo *et al.*, 2014; Doi *et al.*, 2016). No Brasil, Doi *et al.* (2016) avaliou 2,563 casos de infecções sanguíneas por *Candida sp.* (candidemia), o qual apresentou taxa de mortalidade relacionada as essas infecções de 72,2 %.

Estudo recente realizado por Magill *et al.* (2014) em 183 centros médicos dos Estados Unidos da América, demonstraram que *Candida sp.* foi identificada como a causa mais comum de candidemia. Embora *Candida albicans* seja considerado o principal agente associado à candidemia, infecções por outras espécies vêm aumentando e pode apresentar resistência a alguns agentes antifúngicos (Doi *et al.*, 2016). Nos países europeus e nos Estados Unidos da América, as taxas de resistência ao fluconazol e equinocandina são crescentes (Pfaller *et al.*, 2011). Além de *Candida glabrata* e *Candida krusei*, a resistência ao fluconazol também foi documentada entre estirpes de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* de diferentes regiões (Castanheira *et al.*, 2014). No Brasil, a resistência de *Candida sp.* a equinocandina e anfotericina B são raros (Doi *et al.*, 2016). Bizerra *et al.* (2014)

publicaram o primeiro caso de resistência a equinocandina no Brasil, além disso, destacam a necessidade de realização de atividades de vigilância contínua para identificação de mudanças nas taxas de incidência, populações suscetíveis, agentes etiológicos resistentes aos antifúngicos. Adicionalmente, o aumento de isolados clínicos resistentes e multirresistentes de *Candida* sp. atenta para a necessidade de novos agentes antifúngicos (Whaley *et al.*, 2017).

2.3.2.2 *Microsporum canis*

A incidência de infecções ocasionadas por fungos varia de acordo com condições econômicas, região geográfica, hábitos culturais e a quantidade de pessoas em condições de risco para aquisição de infecções fúngicas (Giacomazzi *et al.*, 2016). Infecções menos graves e superficiais são desenvolvidas por fungos dermatófitos. Tais fungos keratinolíticos são frequentemente divididos em três grandes grupos, com base no seu habitat natural e preferência em relação ao hospedeiro (Baldo *et al.*, 2011; Oke *et al.*, 2014). Assim, existem as espécies geofílicas, geralmente existentes no solo e que ocasionalmente podem ser patogênicas para humanos; espécies zoofílicas que preferem os animais para hospedeiro, mas também podem infectar os humanos; e as espécies antropofílicas que são tipicamente patogênicas para humanos (Havlickova *et al.*, 2008).

Dermatófitos se adaptaram ao ambiente usando uma variedade de proteínas do hospedeiro como nutriente, particularmente a queratina, eles secretam proteases que degradam a pele e proteínas do cabelo. Estudos demonstram que a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em uma infecção dermatofita é considerada como base para o desenvolvimento racional de novas estratégias profiláticas e terapêuticas (Vermout *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2011).

Microsporum canis constitui a principal espécie do gênero transmitida de animais para humanos, causando especialmente *Tinea capitis*, infecção fúngica superficial comum entre crianças que entram em contato principalmente com gatos (Havlickova *et al.*, 2008; Nenoff *et al.*, 2013). As manifestações clínicas de *Tinea capitis* em humanos variam de suave, com

pouca perda de cabelo até alopecia extensa com grandes placas inflamatórias e pustulares (Hay, 2017). Os gatos adultos são frequentemente portadores assintomáticos, entretanto, devem ser considerados infecciosos. Os principais sinais de infecção por *Microsporum canis* nos gatos incluem, a perda de pelo com falhas circulares, descamação, coceira, erosões e crostas podem ser observadas em animais jovens e gatos imunossuprimidos (Frymus *et al.*, 2013). Os seres humanos podem se infectar por contato direto com animais doentes ou escovas, roupas contaminadas e com esporos que podem permanecer virulentos por um ano no ambiente (Nenoff *et al.*, 2013).

Nos países em desenvolvimento, *Microsporum audouinii* e *Trichophyton soudanense* são os agentes etiológicos mais frequentemente isolados, entretanto *Microsporum canis* e *Trichophyton tonsurans* são mais frequentes em países Europeus (Nweze e Okafor, 2005). Os protocolos de tratamento para *Tinea capitis* variam de 4 a 8 semanas de duração e as drogas utilizadas incluem, Terbinafina, Itraconazol e Griseofulvina (Hay, 2017).

Outros fungos que tem apresentado alta incidência de infecções em ambientes hospitalares são os fungos filamentosos do gênero *Mucor* e *Fusarium* e isso ocorre principalmente devido a presença de fontes de manutenção e propagação desses micro-organismos em infecções oportunistas (Arvanitidou *et al.*, 2000). Por se tratar de infecções oportunistas, The Japanese Mycology Study Group (2007) verificou maior risco de infecções em pacientes com neutropenia prolongada, uso de corticosteroides, linfopenia, transplante de medula óssea e diabetes.

2.3.2.2.1 Resistência antifúngica aos azólicos

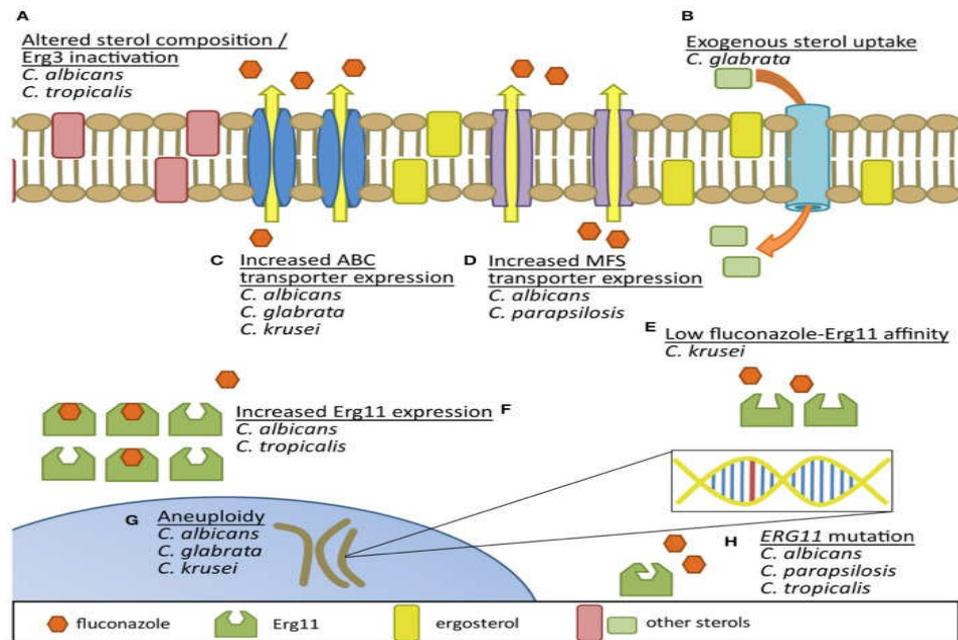
Os azólicos são os antifúngicos mais utilizados para tratar infecções por *Candida*. Dentre a classe dos azólicos, o fluconazol é frequentemente considerado o tratamento preferido para tratar muitas infecções por *Candida*, pois são de baixo custo, apresentam toxicidade limitada e estão disponíveis para administração oral (Whaley *et al.*, 2017). Entretanto, há extensa documentação da resistência intrínseca e desenvolvida aos antifúngicos

azólicos entre várias espécies de *Candida* (Sanglard e Odds, 2002; Tsao *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2010; Castanheira *et al.*, 2014; Whaley *et al.*, 2017).

Os mecanismos de resistência antifúngica aos azólicos desenvolvidos em espécies de *Candida*, apresentados na (FIG. 10) incluem o aumento da expressão de bombas de efluxo, alterações em proteínas alvo e na composição de esteróis da membrana celular (Sanglard e Odds, 2002; Whaley *et al.*, 2017). Dentre os mecanismos, inclui a inativação por mutação no gene 3 de biossíntese do ergosterol (Erg3), absorção de esteróis exógenos com menor afinidade pelos azoles, menor acúmulo intracelular desses medicamentos devido ao aumento da produção de bombas de efluxo transportador cassete ligador de ATP (ABC) e superfamília dos principais facilitadores (MFS) e mutações no gene 11 de biossíntese de ergosterol (ERG11), resultando em menor afinidade da droga com a enzima alvo 14 α -demetilase (ERG11p), entre outros (Sanglard e Odds, 2002; Whaley *et al.*, 2017).

A expressão de bombas de efluxo na membrana plasmática e alterações na biossíntese de ergosterol em *Candida* constituem os principais mecanismos responsáveis pela resistência antifúngica aos azólicos (Tsao *et al.*, 2009; Whaley *et al.*, 2017). As bombas MFS parecem ter uma gama limitada de substratos, considerando que os transportadores ABC têm especificidade mais ampla e de maior significado clínico (Cannon *et al.*, 2009). Análises do genoma de *Candida albicans* demonstraram que duas proteínas transportadoras do tipo ABC, CaCdr1p e CaCdr2p são relacionadas com resistência aos azólicos (Perea *et al.*, 2001). Cdr1p é a principal determinante da resistência a tais medicamentos (Tsao *et al.*, 2009; Tsao *et al.*, 2016). A proteína tipo MFS CaMdr1 é a principal relacionada ao processo de resistência aos azoles (Ben-Yaacov *et al.*, 1994; Whaley *et al.*, 2017).

FIGURA 10 – Mecanismos de resistência antifúngica aos azólicos desenvolvidos em espécies de *Candida*.



Fonte: Whaley *et al.* (2017).

2.4 MUTAGÊNESE

Os genomas de todos os organismos vivos estão constantemente sujeitos ao acontecimento de danos, quer por agentes externos ou por processos endógenos, tais como dano no DNA (Williams e Sobol, 2013; Liu *et al.*, 2016). Mutagenicidade faz referência à indução de alterações permanentes na sequência de DNA de um organismo, o que pode resultar em mudança nas características hereditárias dos sistemas vivos. As mutações podem alterar um único gene, bloco de genes ou cromossomos inteiros. As mutações pontuais são as que afetam um ou poucos nucleotídeos dentro de um gene, esta é a alteração mais comum na sequência de DNA, que pode ser dividida em três tipos principais: substituição de pares de bases (a substituição de um par de bases com outro); deleção (a perda de um ou mais pares de bases); e inserção (a adição de pares de bases adicionais na sequência de DNA) (Słoczyńska *et al.*, 2014).

O termo "genotoxicidade" é um conceito mais amplo do que mutagenicidade e descreve a capacidade dos compostos em afetar a estrutura

do DNA ou o aparato celular e topoisomerasas, que são enzimas responsáveis pela fidelidade do genoma. Efeitos genotóxicos no DNA nem sempre estão relacionadas com mutações (Maurici *et al* 2005; Eastmond *et al.*, 2009).

As mutações são ocasionadas principalmente por fatores externos, incluindo agentes químicos e físicos, chamados de agentes mutagênicos. Além disso, mutações podem ocorrer espontaneamente devido a erros na replicação do DNA, reparo e recombinação (Migliore e Coppedè 2002). Em geral, as mutações podem ser agrupadas em negativas, neutras, positivas, subletal e letal (Cooke *et al.* 2003). Alterações mutagênicas que ocorrem nas células de linhagem germinativa podem ser transmitidas para as gerações futuras, enquanto que mutações somáticas podem contribuir para a patogênese de várias doenças, incluindo o câncer (Izzotti *et al.* 2003; Weakley *et al.* 2010).

O termo "agente mutagênico" refere-se ao agente químico ou físico que é capaz de induzir alterações no material genético de um organismo. Agentes mutagênicos induzem mutações por diferentes mecanismos, dentre eles, a formação de adutos por alquilação, oxidação, aminação, fotoadição, hidrólise e intercalamento de bases por analogia, entre outras (Słoczyńska *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Na TABELA 2, são apresentados três exemplos de agentes mutagênicos que podem afetar diretamente o material genético e também de forma indireta, agir sobre o DNA através da síntese de novos produtos químicos (Słoczyńska *et al.*, 2014).

Produtos químicos no ambiente podem ser difundidos no ar, água e solo (Słoczyńska *et al.*, 2014). Um dos primeiros estudos a relatar a formação de tumores em animais experimentais expostos ao alcatrão foi no início do século XX (Yamagiwa e Ishikawa, 1915). Mais tarde, isolaram o benzo[a]pireno como um componente do alcatrão de carvão (Cook *et al.*, 1933). Neste contexto, muitos produtos químicos já foram descritos por ocasionar mutação e câncer (Bechtel, 1989). A exposição humana à substâncias químicas específicas ou agentes físicos cancerígenos também produz mutação, sendo considerados altamente relevantes não só para câncer, mas também para doenças cardiovasculares, teratogênese e envelhecimento precoce (Vahakangas *et al.*, 1992).

TABELA 2 - Agentes mutagênicos empregados neste estudo e mecanismos de ação.

Agentes mutagênicos	Tipo de mutagênico	Mecanismo de ação	Referência
Aflatoxina B1 (AFB1)	Ação indireta	Estimula a liberação de radicais livres que promovem aberrações cromossômicas	Alpsoy <i>et al.</i> (2009)
4-nitroquinoline-N-oxide (4-NO)	Ação direta	Promove substituição de base, principalmente em resíduos G, induzindo transições GC para AT	Fronza <i>et al.</i> (1992)
Azida sódica (AZS)	Ação direta	Indutor de mutagênese pela produção do metabólito L-azido-alanine que interage com o DNA, induzindo transições GC para AT	Gulluce <i>et al.</i> (2010) Słoczyńska <i>et al.</i> (2014)

Guanina (G), guanina-citosina (GC), adenina-timina (AT).

Agentes mutagênicos são convertidos em produtos reativos dentro do corpo (Miller, 1970). Estes compostos reagem com o DNA, formando adutos de DNA que conduzem a mutação no material genético durante sua replicação (Hemminki *et al.*, 1994). Em cada célula humana, milhares de sítios no DNA podem sofrer danos todos os dias (Lindahl e Wood, 1999). Várias famílias de DNA polimerases estão envolvidas na síntese do DNA, desempenhando funções específicas na polimerização do DNA (Liu *et al.*, 2016).

As polimerases pertencentes às famílias A, B e X, são consideradas de alta fidelidade e responsáveis pela replicação cromossômica, entretanto, tais polimerases não conseguem realizar reparos em danos no DNA (Gill *et al.*, 2011; Prindle e Loeb, 2012). A natureza bioquímica exata da resposta de dano no DNA é dependente de variáveis e envolvem a ativação de pontos de verificação do ciclo celular, reparo de iniciação do DNA, bem como no início da senescência celular, morte ou tolerância de danos no DNA (Williams e Sobol, 2013).

A tolerância de danos no DNA envolve o recrutamento de polimerases pertencentes principalmente a família Y, chamadas de polimerase de síntese translesão do DNA (ou também “bypass”), que atuam após a replicação do DNA (Liu *et al.*, 2016). A razão para esta resposta é aumentar estabilidade

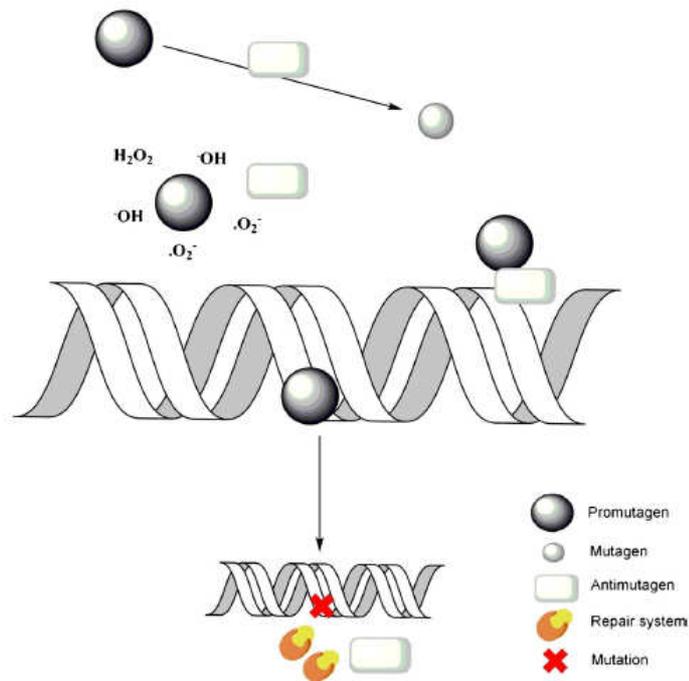
genética na presença de danos no DNA celular em replicação, entretanto, pode resultar tanto num reparo do dano, como também, num aumento da mutagênese ou morte celular (Liu *et al.*, 2016).

Se o reparo de dano no DNA não for solucionado pelas polimerases específicas, estes adutos podem produzir deslocamento no quadro de leitura (*frameshifts*), perturbando a replicação do DNA e originando as mutações (Furukohri *et al.*, 2008) Tais eventos bioquímicos complexos como reparação do DNA, tolerância e resposta aos danos no DNA são de importância crítica em relação a estabilidade do genoma e o início da carcinogênese, bem como para a eficácia durante o tratamento quimioterapêutico do câncer (Williams e Sobol, 2013).

O conhecimento sobre o modo de ação de certos compostos mutagênicos fornece uma base para explicação de como agentes antimutagênicos podem atuar (Słoczyńska *et al.*, 2014). Compostos conhecidos como antimutagênicos são capazes de diminuir ou mesmo eliminar os efeitos mutagênicos de produtos químicos potencialmente nocivos. O termo "antimutagênico" foi descrito principalmente para agentes que possuem a capacidade de diminuir a taxa ou frequência de mutações induzidas ou espontâneas (Novick e Szilard, 1952). Este grupo de agentes inclui compostos naturais e sintéticos (Słoczyńska *et al.*, 2014).

Existem dois diferentes tipos de antimutagênicos, os desmutagênicos e os bioantimutagênicos. Desmutagênicos apresentam função extracelular, capaz de inativar os mutagênicos antes que eles acometam o DNA. Por outro lado, bioantimutagênicos agem intracelularmente, participando na supressão da mutação do DNA, ilustrados na (FIG. 11) (Kada *et al.*, 1982). Estes compostos são capazes de influenciar na reparação e replicação do genoma (Kada e Shimoï, 1987; De Flora, 1998; De Flora *et al.*, 2001).

FIGURA 11 - Mecanismo básico de ação dos antimutagênicos.



Fonte: Słoczyńska *et al.* (2014).

Com base no mecanismo de ação antimutagênica, várias classes de compostos podem ser classificados, dentre eles, com atividade antioxidante, inativadores e bloqueadores, bem como compostos com outros diferentes modos de ação (Słoczyńska *et al.*, 2014). Na TABELA 3 estão ilustrados alguns exemplos de extratos e compostos com atividade antioxidante e que também apresentam ação antimutagênica.

TABELA 3 - Antioxidantes com atividade antimutagênica e mecanismos de ação.

Extrato ou composto	Mecanismo de ação	Referência
Ácido gálico	Remoção de mutagênicos e ligação ou inserção em transportadores de membrana, bloqueando a transferência do mutagênico para o citoplasma	Hour <i>et al.</i> (1999)
Compostos fenólicos	Interferência com citocromo P450, interação com metabólitos mutagênicos ativos e proteção do DNA contra mutagênicos pela ação eletrofílica	Marnewick <i>et al.</i> (2000) De Flora <i>et al.</i> (2001) Bushman (1998)
Ácido lipóico	Atividade antioxidante	Unal <i>et al.</i> (2013)
Troxerutina	inibição da interação com mutagênicos no DNA	Subastri <i>et al.</i> (2017)
Magnolol	Inibição de citocromo P1A1 e P1A2	Saito <i>et al.</i> (2006)
Extratos ricos em compostos fenólicos, catequinas, ácido ascórbico, β -caroteno, antocianinas, ácido elágico, entre outros.	Inibição de citocromo P4501A1, bloqueio de mutagênicos, remoção de EROs, inibição da nitrosação e proteção de sítios nucleofílicos do DNA	Bartsch <i>et al.</i> (1988) Izquierdo-Vega <i>et al.</i> (2017)
Vanilina	Reparo do DNA	Ferguson (2001)
Selênio	Inibição de citocromo P4501A	Peng <i>et al.</i> (2016)
EGCG	Indução de detoxificação por estimular glutatona s-transferase e inibição da formação de mutagênicos	Cheng <i>et al.</i> (1991) Cheng <i>et al.</i> (2009)
Cumarinas	Inibição de citocromo P4501A e 2 ^a	Marumoto <i>et al.</i> (2011)

Compostos antitumorais agem através de mecanismos antimutagênicos (Tsai *et al.*, 1996; Dion *et al.*, 1997). Assim, pesquisas com compostos antimutagênicos com atividade antioxidante representam um campo em expansão nas pesquisas relacionadas ao câncer (Ferguson e Philpot, 2008; El-Sayed e Hussain, 2013; El-Sayed *et al.*, 2013).

2.5 CÂNCER

Carcinogênese é um processo complexo que envolve múltiplas fases, onde podem ocorrer alterações moleculares e celulares, particularmente de origem genética (Ramos *et al.*, 2008). As três fases envolvidas no presente processo incluem, a fase inicial: em que a célula normal é exposta ao agente carcinogênico, provocando uma alteração genética; a fase de progressão, caracterizada por desregulação da proliferação e diferenciação celular e redução de apoptose (crescimento do tumor); aumento do potencial angiogênico e metastático (Jemal *et al.*, 2008; Ramos, 2008).

Atualmente, o câncer é considerado uma enfermidade em nível global, com elevada incidência e mortalidade (Ferlay *et al.*, 2015), mesmo em situação de grande diversidade e disponibilidade quimioterapêutica (Rai *et al.*, 2016). As metástases são a principal causa de morte por câncer (WHO, 2016). Aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes foram relacionadas ao câncer em 2012 (McGuire, 2014). Dentre os tipos de câncer, as leucemias afetam diversas linhagens de células sanguíneas. As linhagens que originam de precursor mieloide, especificamente leucemia mieloide aguda (LMA), é também chamada de leucemia aguda mielocítica, leucemia mieloide aguda, leucemia granulocítica aguda, leucemia não-linfocítica aguda. O termo "Aguda" significa que são leucemias de células imaturas (Blastos), que não se diferenciam e podem progredir de forma rápida se não for tratada e provavelmente fatal em poucos meses. Para este tipo de leucemia, é estimado para 2016 o surgimento de aproximadamente 20.000 novos casos, com projeção de 10.500 mortes nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2016).

A maioria dos casos de LMA se desenvolve em células do sangue que vão se diferenciar em leucócitos (glóbulos brancos), com exceção dos linfócitos, mas alguns casos de LMA se desenvolvem em outros tipos de células sanguíneas. Tal doença tem origem na medula óssea, mas na maioria dos casos ela avança rapidamente para a corrente sanguínea. Por vezes, pode espalhar para outras partes do corpo, incluindo os nódulos linfáticos, fígado, baço, sistema nervoso central e testículos (American Cancer Society, 2016).

O prognóstico da LMA continua desfavorável, principalmente para pacientes idosos. Não há dados precisos de sua real incidência no Brasil, porém a incidência aproximada é de três casos para 100.000 habitantes/ano na população adulta de outros países. Com o envelhecimento da população brasileira, é esperado um aumento na incidência de LMA entre 60-70 anos de idade (Ruutu *et al.*, 2004).

O tratamento da LMA mudou pouco nos últimos 40 anos. A terapia padrão consiste do uso em esquemas de dias com citarabina e antraciclina, seguida por consolidação com quimioterapia adicional ou transplante com células-tronco. Apesar da terapia intensiva, muitos pacientes apresentam recaídas e com prognóstico desfavorável. Atualmente, nenhum fármaco foi aprovado para o tratamento da recaída de LMA (Shafer e Grant, 2016).

Gemtuzumab ozogamicina, um anticorpo monoclonal do antígeno CD33 (um anti-CD33) conjugado com caliqueamicina, um antibiótico natural indutor de apoptose, foi inicialmente aprovado pelo FDA para pacientes idosos com LMA na primeira recaída de não candidatos à quimioterapia citotóxica padrão (Bross *et al.*, 2001). A droga foi posteriormente retirada do mercado nos EUA em 2010 (Petersdor *et al.*, 2013). Neste sentido, há a necessidade urgente de novas estratégias de tratamentos eficazes para LMA (Shafer e Grant, 2016).

A maioria dos fármacos quimioterapêuticos disponíveis foram desenvolvidos com base em genes-alvos reconhecidos ou proteínas associadas a vias de sobrevivência ou proliferação celular (Galustian e Dalglish, 2010). No entanto, a maior parte destes fármacos têm efeitos secundários graves de citotoxicidade sobre células normais. Além disso, as células cancerígenas também têm capacidade de conferir resistência a determinadas drogas (Lehne, 2000). Na iniciação e progressão do tumor, as vias de sinalização celular são modificadas para favorecimento de acontecimentos oncogênicos, alterando assim, a homeostase celular (Bianco *et al.*, 2006). Estudos sobre o câncer mostram uma complexa rede de vias de sinalização que beneficiam a progressão tumoral, gerando um microambiente favorável para a nutrição celular (Wang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

2.5.1 Definições de morte celular

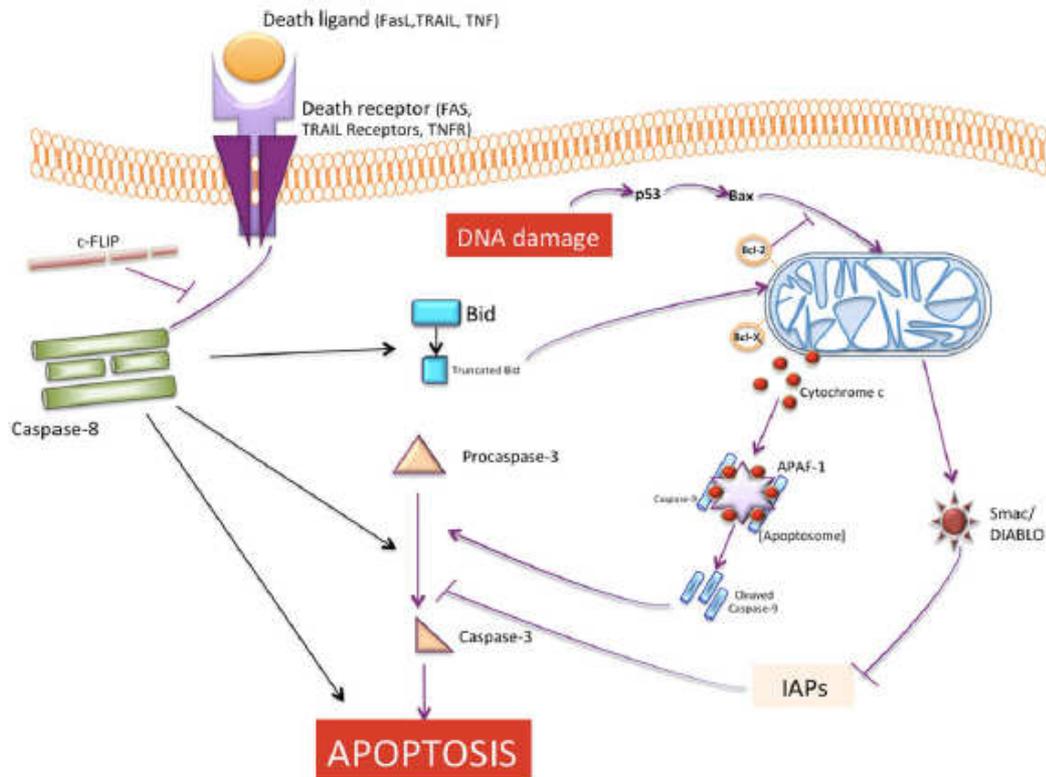
2.5.1.1 Apoptose

Assim como a viabilidade celular é importante para os organismos vivos, a eliminação de células desnecessárias é fundamental para manutenção da homeostasia de tecidos, órgãos e de todo o organismo. Apoptose é um tipo de mecanismo programado de morte celular, controlada por interações entre várias moléculas responsáveis pela eliminação de células indesejáveis (Yang *et al.*, 2006).

Qualquer anormalidade no processo de apoptose pode desencadear vários tipos de doenças, incluindo o câncer, doenças autoimunes e neurodegenerativas (Horvitz, 1999). A apoptose é regulada por uma variedade de família de genes, que agem em conjunto promovendo alterações morfológicas e bioquímicas na célula durante o processo (Kiraz *et al.*, 2016). Diferentes famílias de genes estão envolvidos no processo de apoptose, incluindo caspases, proteínas inibidoras de apoptose, família de genes de células B de linfoma (Bcl)-2, superfamília de genes do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) e p53 (proteína supressora de tumor) (Galluzzi *et al.*, 2012).

Ao sofrer apoptose, a célula apresenta alterações morfológicas de encolhimento celular, condensação e fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Galluzzi *et al.*, 2009), que pode acontecer basicamente por estimulação de duas vias principais: 1) via intrínseca (ou mitocondrial) que ocorre principalmente por alterações bioquímicas como, liberação de citocromo c da mitocôndria, ativando diferentes caspases e 2) via extrínseca que é a ativação do receptor de morte Fas (Fasr), receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) e receptor TRAIL (TRAILR) por sinais externos à célula. Após a ativação de diferentes moléculas intermediárias, ambas as vias desencadeiam ativação de caspases finais que geralmente levam a clivagem de diferentes proteínas envolvidas no processo que são apresentados na (FIG. 12) (Ghobrial *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2011).

FIGURA 12 - Visão geral das duas principais vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca.



Fonte: Kiraz *et al.* (2016).

2.5.1.1.1 Apoptose intrínseca

A apoptose intrínseca (FIG. 13) é independente da sinalização de receptores, pode ser desencadeada por uma infinidade de condições estressantes intracelularmente, dentre elas, estresse oxidativo, sobrecarga de Ca^{++} citoplasmático, materiais tóxicos, radiação, infecção viral, citocinas, hormônios, danos no DNA, entre outros. Embora a cascata de sinalização que desencadeia a apoptose intrínseca seja altamente heterogênea em relação aos estímulos iniciadores, todos os mecanismos são conectados à mitocôndria (Elmore, 2013).

Além da propagação da cascata de sinalização pró-apoptótica, mecanismos anti-apoptóticos também estão envolvidos na tentativa de permitir que as células possam lidar com o estresse, assim, ambos os sinais convergem para a mitocôndria, caso a sinalização pró-apoptótica prevaleça,

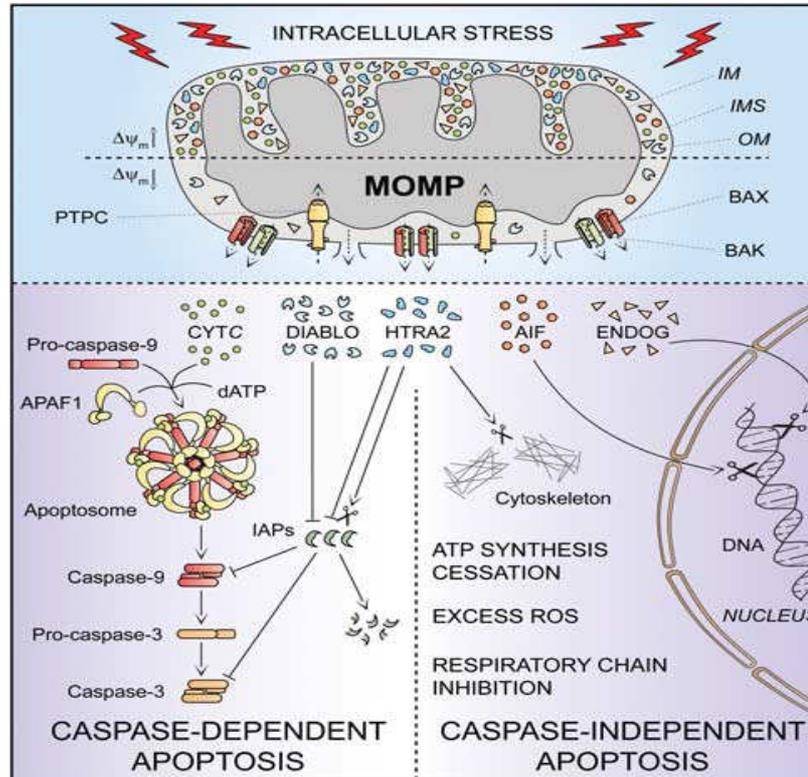
ocorre a permeabilização da mitocôndria com liberação para o citoplasma de proteínas indutoras de apoptose (Kiraz *et al.*, 2016).

Citocromo c, Smad (proteína que regula o fator de transformação do crescimento (TGF- β) e HtrA2/Omi (Proteína 2 requerente de alta temperatura) são um grupo de moléculas pró-apoptóticas liberadas das mitocôndrias que desencadeiam a ativação da cascata protéica de caspases (Galluzzi *et al.*, 2012). Citocromo c interage com Apaf-1 (Fator ativador de apoptose 1), resultando na formação do complexo “apoptossomo”, ativando pró-caspase-9 em caspase-9. Após ativar caspase-9, ativa pró-caspase-3 em caspase-3, assim, a cascata final torna-se ativada e o núcleo é fragmentado juntamente com a ruptura da membrana nuclear (Hill *et al.*, 2004). Este estágio é o evento inicial da via intrínseca e extrínseca da apoptose, em que a caspase-3 cliva as diferentes proteínas tais como as kinases, proteínas de controle do DNA, proteínas do citoesqueleto e inibidoras de endonucleases. A condensação do DNA, a formação de vesículas na membrana e todas as alterações morfológicas são reguladas por caspases e desencadeadas por ambas as vias, intrínseca e extrínseca (Thornberry e Lazebnik, 1998).

Por outro lado, outro grupo de moléculas são liberadas das mitocôndrias, incluindo proteínas pró-apoptóticas, endonuclease G ou AIF (Fator indutor de apoptose), entretanto, envolvidas mais tardiamente no processo, promovendo apoptose independente de caspase que pode ser visualizado na (FIG. 13) (Kiraz *et al.*, 2016). Estas moléculas quando são translocadas para o núcleo, primeiramente promovem fragmentação do DNA e condensação da cromatina, sendo definida essas ações como estágio 1; e uma condensação avançada com fragmentação do DNA com auxílio da caspase-3 é definido como estágio 2 (Susin *et al.*, 2000). Todos os eventos de apoptose intrínseca são controladas principalmente pela família de proteínas Bcl-2 e família de proteínas supressora de tumor p53, essa majoritariamente envolvida na ativação das proteínas da família Bcl-2. Membros da família Bcl-2 podem atuar como pró-apoptótica (Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad e Blk) ou como anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-X, e BAG), além de, determinar a integridade da membrana da mitocôndria envolvidas no processo de liberação do citocromo c (Cory e Adams, 2002; Elmore, 2013). Adicionalmente, outras

proteínas estão relacionadas a inibição da apoptose (IAPs-Proteínas inibidoras de apoptose), que são inibidas por antagonistas de IAPs (Kiraz *et al.*, 2016).

FIGURA 13 – Via intrínseca da apoptose.



Fonte: Galluzzi *et al.* (2012).

2.5.1.1.2 Apoptose extrínseca

O termo apoptose extrínseca tem sido utilizado para casos de morte celular induzida por sinais de estresse extracelular que são detectados e propagados em receptores específicos na transmembrana (Kiraz *et al.*, 2016). Apoptose pela via extrínseca é mediada principalmente por sinalização via receptores de morte que pertencem a superfamília de genes do fator de necrose tumoral (TNF) apresentado na (FIG. 14) (Mehlen e Bredesen, 2011). A sinalização inicial ocorre pelas interações entre os ligantes e receptores de morte da membrana celular, tais como ligante Fas (FasL) via receptor Fasr, ligante TNF via receptor TNF R1 e ligante TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado com TNF) ao receptor TRAIL R1 (Locksley *et al.*, 2001).

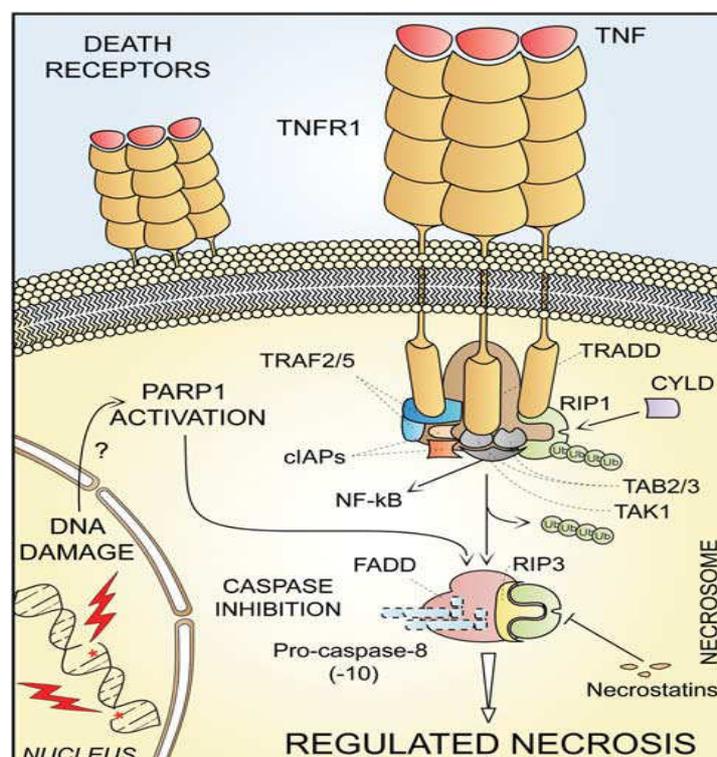
A ligação do ligante FasL ao receptor Fasr induz a ligação da proteína adaptadora Fas associada com domínio de morte (FADD), enquanto que a ligação do TNF ao TNFR promove a ligação ao domínio de morte associado a TNFR (TRADD), resultando em ativação de pró-caspase-8. Essa pró-caspase 8 é ativada por autocatálise com auxílio do complexo sinalizador indutor de morte (DISCO), conseqüentemente, induz a proteína Bid e assim, envolvendo ativação da via intrínseca por sinalização externa, desencadeando todo o processo realizado pela via intrínseca, ativando caspase-3 e caspase-7 (Galluzzi *et al.*, 2012; Elmore *et al.*, 2013). A Bid, proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2, exibe participação comum entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Caspase 8 faz a clivagem e modificação lipídica da proteína citoplasmática Bid para Bid truncada (tBid), ocorrendo assim, a interação da tBid com a mitocôndria, induzido a liberação de citocromo c via moléculas Bak e Bax e formando o apoptossomo (Sax *et al.*, 2002).

Alternativamente, o sinal pró-apoptótico extrínseco podem ser iniciado por meio dos receptores de dependência UNC5A-D (receptor de netrina-1) e DCC (carcinoma colorretal deletado), que exercem funções letais unicamente quando seus ligantes específicos diminuem a um nível limiar crítico. A indução de apoptose a partir do receptor DCC é ativada quando, na ausência de seus ligantes, DCC interage com outras proteínas para formação do complexo, o qual irá ativar a pró- caspase-9. O receptor UNC5-B, na ausência do seu ligante Netrina-1, induz a apoptose a partir do recrutamento da proteína fosfatase 2A (PP2A), a qual irá realizar a desfosforilação/ativação da proteína DAPK (Proteína Quinase serina/treonina associada à Morte) (Galluzzi *et al.*, 2012). A proteína DAPK induzirá a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) e ativação de caspase-9 e caspase-8 (via Bid). Efeitos associados a proteína DAPK permanecem desconhecidos, mas DAPK é conhecida por induzir a morte celular por mecanismos dependentes e independentes de p53 (Galluzzi *et al.*, 2012; Delcros e Mehlen, 2013).

2009; Zhang *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2004; Bano *et al.*, 2005). Quando caspases, em particular, caspase-8, são inibidas por manipulações genéticas (knockout ou RNA de interferência), ou bloqueadas por agentes farmacológicos (inibidores químicos de caspases), bem como, o bloqueio farmacológico do receptor 1 interagindo com proteína kinase (RIP1) e seu homólogo receptor 3 interagindo com proteína kinase (RIP3) ocorre e não acontece a degradação, essas interações físicas e funcionais são formas bioquímicas para definição de um processo regulado de morte celular por necrose (Cho *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Vandenabeele *et al.*, 2010).

Necroptose pode ser ainda caracterizada por sua dependência a módulos específicos de sinalização. Os casos de necroptose que exibem ativação RIP1 (fosforilação de RIP1) (He *et al.*, 2009), suprimida por inibidores RIP1, incluindo necrostatin-1 (Degterev *et al.*, 2008) deve ser rotulado como necrose regulada dependente de RIP1. A ativação dependente de RIP3, mas independente de RIP1, promovem necroptose, insensíveis à ação do Necrostatin-1 (Zhang *et al.*, 2009).

FIGURA 15 - Necrose regulada ou necroptose



Fonte: Galluzzi *et al.* (2012).

2.5.1.3 Morte celular autofágica

A autofagia é um processo catabólico altamente regulado, que envolve a degradação de componentes celulares próprios, a partir da maquinaria dos lisossomos, organela digestiva envolvida com morte celular. A autofagia desempenha um importante papel no crescimento celular, desenvolvimento e homeostase, ajudando a manter um equilíbrio entre síntese, degradação e subsequente reciclagem dos produtos celulares (Galluzzi *et al*, 2011).

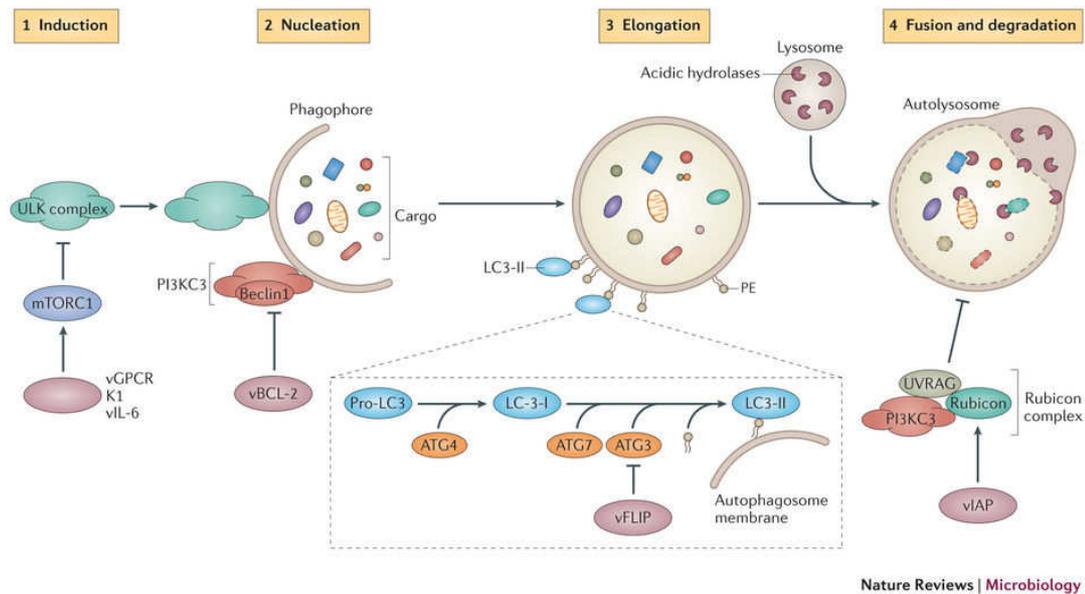
Com base nas características morfológicas, o termo “morte celular autofágica” tem sido amplamente empregado para indicar tipos de morte celular acompanhado de elevada vacuolização citoplasmática (Galluzzi *et al.*, 2012). Primeiramente, autofagia foi descrita por mediar o processo fisiológico de morte celular *in vivo* do inseto *Drosophila melanogaster*. Em um segundo momento, autofagia parece ser o mecanismo de morte em células cancerígenas quando moduladores essenciais de apoptose não respondem ao tratamento *in vitro* por agentes quimioterápicos (Laane *et al.*, 2009). No entanto, na maioria dos casos conhecidos, autofagia constitui uma resposta citoprotetora, ativada pelas células na tentativa de lidar com o estresse, embora não iniba a morte celular (Boya *et al.*, 2005).

Os mecanismos moleculares relacionados a autofagia podem ser divididos em três processos distintos, tais como, indução e alongamento representados na (FIG. 16) e maturação representada na (FIG. 17), controladas pelos produtos dos genes Atg (Dwivedi e Ahnn, 2009).

Deficiência nutricional e estresse sinaliza inibição de mTOR, permitindo deste modo a ativação da proteína Ulk 1, o que conduz ao início do processo de autofagia (Deretic, 2010). A proteína alvo da rapamicina (mTOR) quando ativada é um inibidor da fase de iniciação. Adicionalmente, na fase de iniciação a autofagia é induzida pelo complexo PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III) também designada Vps34, beclina 1 (mAtg6) e p150 (subunidade reguladora da Vps34) que forma a nucleação do fagóforo (membrana lipídica dupla de isolamento) (Sun *et al.*, 2015; Nakayama e Inoue, 2016). A expansão da membrana autofágica é mediada pela interação de proteínas Atgs que são responsáveis pelo recrutamento de outra proteína Atg para a membrana, a LC3

(Atg8). Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, a proteína LC3 é degradada (Liang *et al.*, 2015; Nakayama e Inoue, 2016).

FIGURA 16 - Indução e alongamento na morte celular autofágica

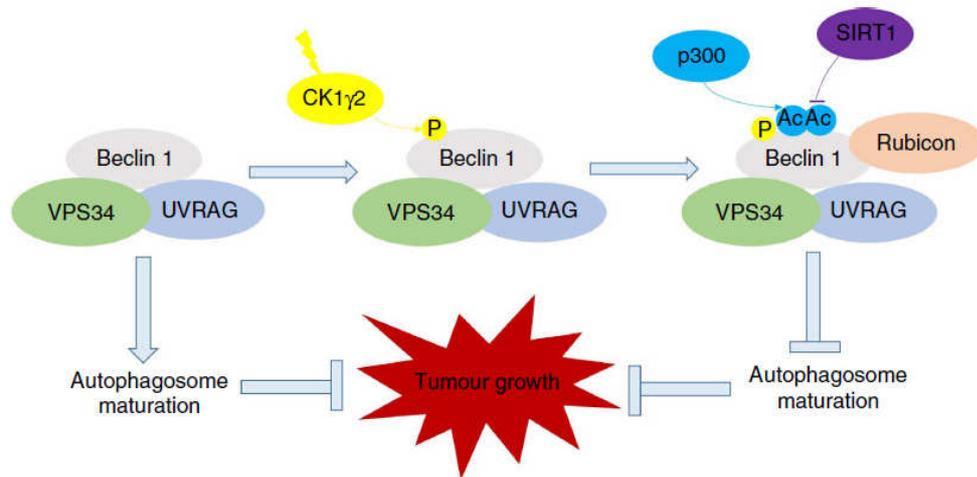


Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Liang *et al.* (2015).

A maturação ocorre devido a fusão dos autofagossomos com as organelas endossomos e lisossomos através da atuação de diversas proteínas, tais como Rab7, SNAREs (Receptor de proteínas de ligação ao fator solúvel sensível a N-etilmaleimida), ESCRT (complexo de triagem endossomal necessária para o transporte) e proteínas Vps (“vacuolar protein sorting”) classe C. A proteína UVRAG (proteína associada ao gene de resistência a radiação UV) recruta proteínas Vps da classe C e por via dessa interação ativa Rab7 que promove a fusão. Também participa da fusão, a Rubicon, uma proteína que interage com Beclina 1 (Ravikumar *et al.* 2010). A acetilação da Beclina 1 inibe a maturação do autofagossomo, promovendo o recrutamento de rubicon. A desacetilação de Beclina 1 por sirtuína 1 (SIRT1), promove a maturação do autofagossomo (Sun *et al.*, 2015).

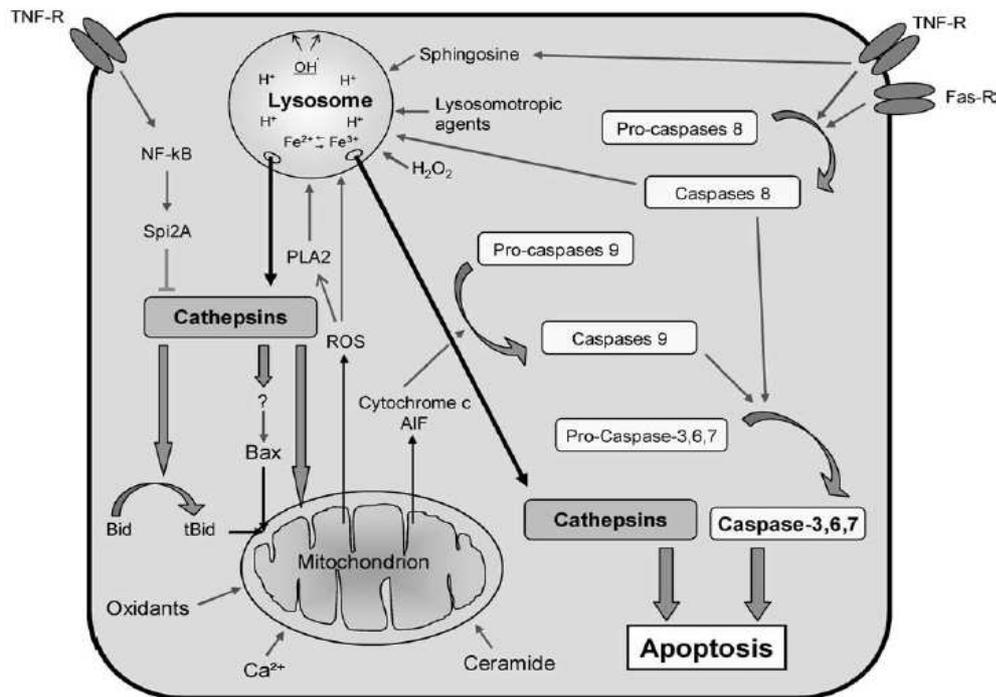
FIGURA 17 - Maturação na morte celular autofágica



Fonte: Sun *et al.* (2015).

Há participação dos lisossomos no processo de morte celular programada e a permeabilização da membrana lisossomal com subsequente liberação de enzimas proteolíticas para o citoplasma, tem uma ativa contribuição para a iniciação e execução da apoptose (Chwieralski *et al.*, 2006). Tais enzimas, presentes nos lisossomos, apresentam capacidade para decompor ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos (de Duve, 2005). Em condições fisiológicas, estas proteases são localizadas dentro dos lisossomos, e são liberados para o citoplasma após estimulação ou dano celular. Dentre elas, catepsinas desempenham um papel importante na regulação da apoptose dependente e independente de caspases (Chwieralski *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007; Owa *et al.*, 2013). Dessa forma, a ação das catepsinas após sua liberação para o citoplasma é ativação de Bid, degradando proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e ativando apoptose via mitocondrial conforme representada na (FIG. 18) (Cesen *et al.*, 2012).

FIGURA 18 - Enzimas lisossomais e ativação de sinalização pró-apoptótica.



Fonte: Chwieralski *et al.* (2006).

Além das modalidades de morte já mencionadas, catástrofe mitótica, anóiques, entose, phartanatos e piroptose são outros exemplos de morte celular, sendo algumas descritas como novas modalidades de morte celular (Galluzzi *et al.*, 2012). Adicionalmente, enquanto a morte celular por necrose não regulada promove inflamação, processos de morte celular programada acionam mecanismos anti-inflamatórios para remoção de material apoptótico, prevenindo assim, a inflamação (Szondy *et al.*, 2017).

2.6 INFLAMAÇÃO

De uma maneira geral, inflamação é o processo fisiológico que tem como objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo e, também, induzir uma série de eventos que contribuem para a cicatrização e reconstituição do tecido lesado. Sinais inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas biogênicas e eicosanoides, induzem uma série de eventos em diversos processos biológicos, variando desde respostas vasculares locais até alterações generalizadas, caracterizada pelo acúmulo de fluidos e leucócitos que conduzem a alteração da temperatura corporal, edema e dor (Kotas e

Medzhitov, 2015). Neste sentido, essa cascata de eventos pode prolongar e induzir lesão tecidual pela liberação exacerbada de enzimas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (Tracey, 2002).

A resposta inflamatória parece ser mediada por diferentes mediadores fisiológicos e imunológicos que desempenham atividades na inflamação aguda e crônica (Kanaka Padmanabham e Giles, 2011). Durante ambos os processos de inflamação aguda e crônica, uma variedade de fatores solúveis promovem o aumento da expressão de moléculas celulares de atração e adesão, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos. Muitos desses mediadores solúveis regulam a ativação de células residentes, incluindo os fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos. Adicionalmente, tais mediadores promovem o recrutamento de novas células inflamatórias, dentre elas, os monócitos, linfócitos neutrófilos e eosinófilos. Tais ações resultam em respostas sistêmicas ao processo inflamatório, dentre elas, hipertensão, síntese de proteínas de fase aguda, leucocitose, entre outras (Feghali e Wright, 1997).

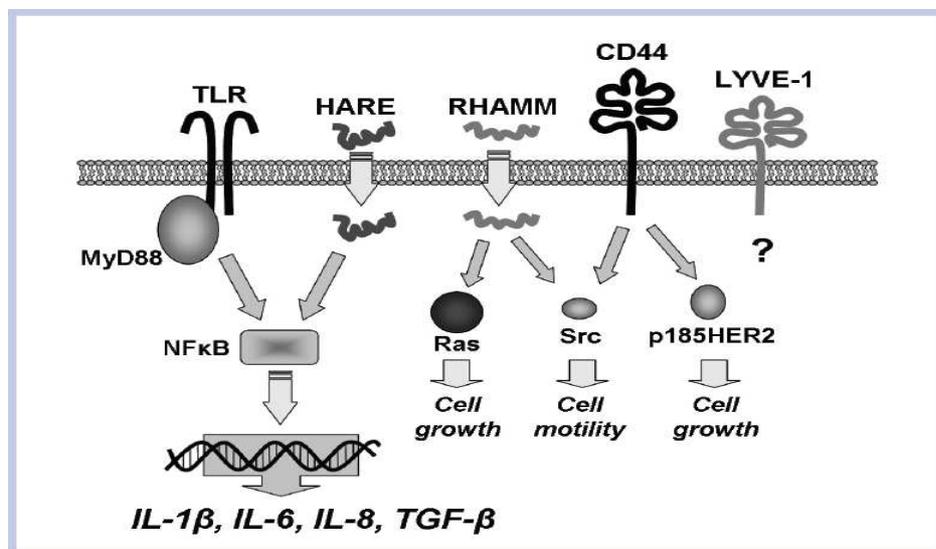
Os fatores solúveis que medeiam estas respostas podem ser destacados em quatro categorias: primeiramente, metabólitos inflamatórios lipídicos como o fator de ativação plaquetária (PAF) e derivados do ácido araquidônico, como prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas, gerados a partir dos fosfolipídeos celulares; ativação das cascatas de coagulação, complemento e de cininas, que geram numerosos peptídeos pró-inflamatórios; óxido nítrico, potente vasodilatador endógeno, cuja relevância no processo inflamatório passou a ser explorado; e um grupo de polipeptídeos conhecidos como citocinas (Salvemini *et al.*, 1996; Feghali e Wright, 1997).

As citocinas são secretadas por diferentes células em resposta a uma variedade de estímulos e induzem efeitos característicos sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função das células alvo. Essas substâncias também atuam em vários processos como cicatrização, hematopoese e angiogênese. Uma determinada citocina pode ser secretada individualmente ou como parte de uma resposta coordenada, juntamente com outras citocinas não relacionadas. Além disso, uma citocina pode induzir a expressão de outras citocinas ou mediadores, induzindo, assim, uma cascata de efeitos biológicos

que amplificam a resposta inflamatória e influenciam a sua evolução (Collins, 1999; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A atividade enzimática, especificamente da enzima hialuronidase, além de ter a capacidade de promover a indução de quimiocinas e citocinas, também pode degradar o ácido hialurônico de baixo peso molecular (Asari *et al.*, 2010; Harunari *et al.*, 2014). Estudos descrevem que o ácido hialurônico de alto peso molecular, exibe atividade anti-inflamatória, enquanto que os produtos de degradação do ácido hialurônico de baixo peso molecular são potentes indutores da inflamação (Prevo *et al.*, 2001). O ácido hialurônico é o principal componente da matriz extracelular, considerado uma das principais moléculas envolvidas no processo de regeneração tecidual. A ação do ácido hialurônico e seus produtos de degradação tem sido relacionados a inflamação, migração celular e angiogênese através da modulação de receptores específicos representados na (FIG. 19) (Litwiniuk *et al.*, 2016).

FIGURA 19 – Principais vias de sinalização celular ativada por ácido hialurônico e derivados.



Receptor Toll-like (TLR); receptor ácido hialurônico por endocitose (HARE); receptor de motilidade mediado por ácido hialurônico (RHAMM); antígeno receptor de transmembrana tipo 1 (CD44); receptor endotelial de vasos linfáticos 1 (LYVE-1); gene de resposta primária da diferenciação celular mieloide (MyD88); Fator nuclear Kappa-beta (NFκβ); proteína Ras; Kinase Src; proteína tirosino-quinase do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (p185HER2); interleucina (IL); fator de crescimento transformador beta (TGF-β). Fonte: Litwiniuk *et al.* (2016).

Neste sentido, estudos descrevem que os inibidores da enzima hialuronidase podem tornar-se compostos candidatos a droga anti-inflamatória (Harunari *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015). Tal enzima é encontrada em um grande número de organismos, incluindo mamíferos, bactérias (Ohya e Kaneko, 1970; Hamai *et al.*, 1989) e bacteriófagos (Baker *et al.*, 2002), assim como no veneno de animais terrestres, incluindo abelhas (Kemeny *et al.*, 1984), vespas (Kolarich *et al.*, 2005), escorpiões (Pessini *et al.*, 2001), cobras (Girish e Kemparaju, 2006), lagartos (Tu e Hendon, 1983) e marítimos, incluindo camarão (Karlstam e Ljungloef, 1991), lagosta (Krishnapillai *et al.*, 1999) e peixes (Hopkins e Hodgson, 1998). Hialuronidase é uma enzima ácido-ativa (endo- β -N-glucosaminidase) no sistema circulatório de mamíferos (Harunari *et al.*, 2014). Tal enzima, além de degradar o ácido hialurônico, também está envolvida no controle da permeabilidade vascular e degranulação dos mastócitos (Zeng *et al.*, 2015).

Adicionalmente, estudos descrevem a existência de vários tipos de inibidores dessa enzima, dentre elas, proteínas, glicosaminoglicanos, polissacarídeos, ácidos graxos, alcaloides, antibióticos, antinematoides, compostos orgânicos sintéticos, glicosídeos de saponinas, derivados fenólicos, flavonoides, terpenoides, entre outros antioxidantes (Girish *et al.*, 2009).

2.7 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

2.7.1 Doença de Alzheimer

Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa ocasionada por neurodegeneração cortical e do hipocampo, resultando em declínio progressivo da cognição e memória (West *et al.*, 2000). De acordo com o Relatório Mundial de Alzheimer, no ano de 2015, foi estimado que 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam demência, sendo que, este número deve dobrar a cada 20 anos. Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, representando 60 a 80 % dos casos de demência e a sexta maior causa de morte nos Estados Unidos. Em 2015, foi estimado um

custo de US \$ 220 milhões relacionados ao tratamento da doença, para 2050, a projeção é de aproximadamente US \$ 1 trilhão (Alzheimer, 2015).

Menos de 1 % dos casos de DA apresentam origem genética com sintomas que se desenvolvem antes dos 65 anos de idade, enquanto que a maioria dos casos é referida como esporádica (Cai *et al.*, 2012). Ambas as formas expressam sintomas semelhantes e mecanismos fisiopatológicos que envolvem alterações mitocondriais, estresse oxidativo associada à membrana e superprodução e acúmulo de formas neurotóxicas da proteína beta amiloide (A β) (Mattson, 2004; Mucke, 2009).

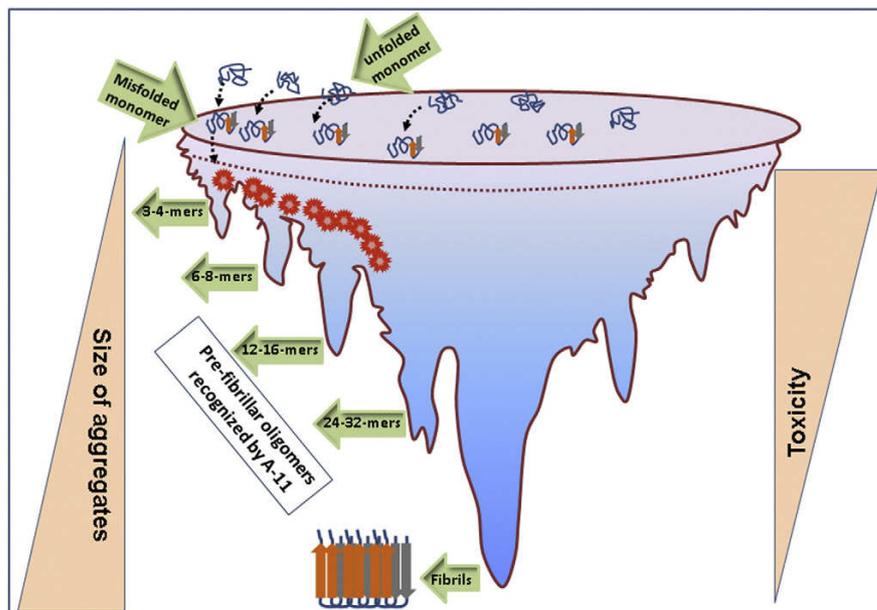
As características patológicas cerebrais na DA é marcada pela presença de placas A β e emaranhados neurofibrilares (Blennow *et al.*, 2006). Estudos realizados ao longo de décadas têm estabelecido consenso de que a geração de A β tóxicas é um evento chave na patogênese da DA. Segundo Grundke-Iqbal *et al.* (1983), emaranhados neurofibrilares intracelulares são compostos de filamentos helicoidais de proteína estabilizadora de microtúbulos (Tau) anormalmente hiperfosforilada (Tau-P) e emparelhada. A proteína Tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos, cuja principal função é estabilizá-los pela agregação da tubulina (Kikkawa *et al.*, 1994).

Mais recentemente, o foco das investigações passou a estar mais concentrado na verificação do papel dos efetores que desencadeiam a formação de oligômeros solúveis de A β e Tau-P, do que apenas na análise de depósitos proteicos de A β (García-Ayllón *et al.*, 2011). Adicionalmente, estudos sugerem que a acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a acetilcolina, no cérebro de pacientes com DA é responsável por ações não catalíticas, incluindo atividade de acúmulo de β -amiloide (Pera *et al.*, 2009) e que a butirilcolinesterase (BChE) desempenha atividade de transformação de placas β -amiloide inofensivas em estruturas patogênicas presentes na demência e doenças neurodegenerativas (Lane *et al.*, 2006). A proteína A β é um peptídeo com 38 a 43 aminoácidos gerados pela clivagem proteolítica sequencial da proteína precursora amiloide (APP) por enzimas β e γ secretases (Chow *et al.*, 2010). Assim, foi sugerido que os grandes agregados de proteína A β não são os responsáveis pela neurodegeneração e sim os oligômeros solúveis

menores, estes foram definidos como as espécies tóxicas de A β (Sengupta *et al.*, 2016).

Dentre as proteínas amiloidogênicas que se encontram em forma de agregados maiores, incluem a Tau (Gerson e Kaye, 2013), α -sinucleína (Sengupta *et al.*, 2016) e proteína TAR 43 de ligação ao DNA (TDP-43) (Fang *et al.*, 2014), que ao sofrerem modificações, se transformam em oligômeros tóxicos representados na (FIG. 20) (Sengupta *et al.*, 2016). Tais oligômeros exercem sua toxicidade através de uma variedade de mecanismos incluindo a interação direta com a membrana ou via receptor (Kayed e Lasagna-Reeves, 2013).

FIGURA 20 - Relação entre o tamanho dos conjuntos A β oligômeros e os seus efeitos tóxicos.



Fonte: Sengupta *et al.* (2016).

Além disso, os oligômeros A β são indutores de inflamação (Minter *et al.*, 2015), entretanto, ainda são conflitantes as informações sobre qual A β induz inflamação (Ferrera *et al.*, 2014). O processo inflamatório aparece antes da formação de agregados A β , sugerindo que a inflamação se inicia primeiramente devido aos oligômeros menores de A β (Ferrera *et al.*, 2014). Ainda não há evidências de que A β induz inflamação através de mecanismos específicos, tais como interação direta com a membrana ou via receptor,

permanecendo ainda um processo em discussão sobre o quem vem primeiro, oligômeros A β ou inflamação (Sengupta *et al.*, 2016).

Melhor compreensão do mecanismo de neurotoxicidade, como as proteínas amiloides interagem, é essencial para a busca de terapias mais eficazes para tratamento da DA (García-Ayllón *et al.*, 2011). Durante a progressão da DA, diferentes tipos neuronais são afetados, embora, haja uma elevada perda de neurônios colinérgicos acompanhada de declínio nos níveis de acetilcolina (Davies e Maloney, 1976; Perry *et al.*, 1977).

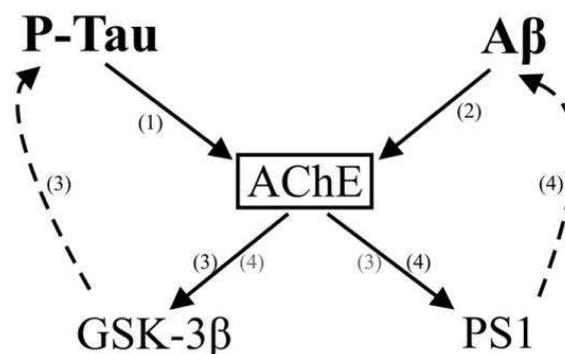
Dentre as ações relacionadas a ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos pela acetilcolina, incluem a melhora na atenção e cognição. A disfunção colinérgica é associada aos primeiros prejuízos cognitivos observados na DA (Francis *et al.*, 2012). Neste sentido, terapias destinadas a reverter o déficit colinérgico são estudadas em grande parte com base na importância da função colinérgica na cognição. Apesar da diminuição geral da atividade da AChE no cérebro de pacientes com DA, a terapia atual se baseia principalmente do uso de inibidores da AChE, estes aumentam a transmissão colinérgica, porém, apresentam efeitos terapêuticos modestos e transitórios (Giacobini, 2002; Kaduszkiewicz *et al.*, 2005).

No entanto, apesar da eficiência clínica modesta dos inibidores da AChE, estudos e desenvolvimento de novos inibidores, particularmente os que agem duplamente, inibindo AChE e formação de placas A β continuam sendo desenvolvidos (Muñoz-Torrero, 2008; Pepeu e Giovannini, 2009; Contestabile, 2011). Este último efeito baseia-se no fato de que, as moléculas inibidoras da AChE podem para além do seu efeito sobre a atividade da enzima, interagir por meio de sítios aniônicos periféricos da enzima com proteínas amilóides (Inestrosa *et al.*, 1996).

Além da concepção de novos inibidores com a capacidade de bloquear os sítios catalíticos e periféricos da AChE, há evidências *in vitro* e *in vivo* de que inibidores da AChE também podem influenciar o processamento de APP (Peng *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2009). Conforme ilustrado na (FIG. 21), é proposto que a AChE interage tanto com A β e Tau-P. A Tau-P pode levar a um aumento da atividade da AChE (Silveyra *et al.*, 2011a), sendo assim, a variante T-AChE ativa a glicogênio sintase quinase

(GSK-3 β), induzindo a hiperfosforilação da Tau (Toiber *et al.*, 2008). Além disso, os peptídeos A β também pode aumentar os níveis da AChE (Sberna *et al.*, 1997). Por sua vez, a AChE pode afetar o processamento de APP e de produção de A β por modulação dos níveis da subunidade catalítica da enzima PS1 γ -secretase (Silveyra *et al.*, 2011b). Assim, o aumento da AChE pode afetar ambas as vias amiloidogênicas e hiperfosforilação da Tau.

FIGURA 21 - Representação esquemática das múltiplas relações entre AChE e proteínas envolvidas na patogênese da doença de Alzheimer A β e P-Tau.



Fonte: García-Ayllón *et al.* (2011).

O tratamento farmacológico utilizado clinicamente na DA é feito com drogas anticolinesterásicas, dentre elas, tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina são as mais comumente usadas e promissoras para tratamento da DA leve e moderada (Zhou *et al.*, 2016). Tacrina foi o primeiro inibidor de AChE e BChE aprovado para uso em larga escala (Nagabukuro *et al.*, 2005). Entretanto, devido a hepatotoxicidade da tacrina, derivados foram sintetizados (Park *et al.*, 2015). Outra medicação aprovada para tratamento da DA é a memantina, um antagonista do receptor Nmethyl-D-aspartate (NMDA), que atua bloqueando a ação tóxica mediada pelo glutamato em células cerebrais. A memantina isoladamente ou associada aos anticolinesterásicos é indicado no tratamento de pacientes com DA nas fases moderada e grave (Zhou *et al.*, 2016).

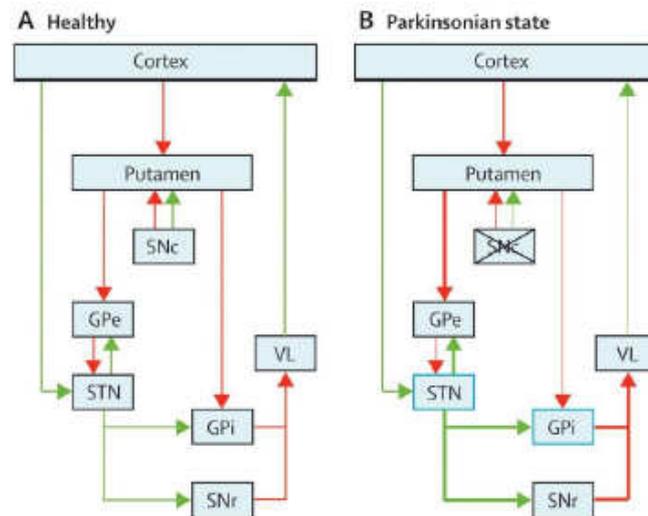
Atualmente, além de se buscar formas de diagnóstico precoce, tratamentos alternativos estão sendo objeto de estudo, dentre elas, imunoterapia com anticorpos oligômero específico, antioxidantes, anti-inflamatórios ou a combinação de tratamentos para potencial efeito sinérgico (Gomes *et al.*, 2014; Sengupta *et al.*, 2016). Dentre os antioxidantes com potencial de inibição da AChE e BChE, estão os flavonoides rutina e quercetina (Ademosun *et al.*, 2015; Neagu *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2009).

2.7.2 Doença de Parkinson

Parkinsonismo é uma doença motora progressiva, que afeta 1,5 milhões de Norte Americanos, sendo considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer, afetando aproximadamente 5 % da população acima de 65 anos de idade (Sarkar *et al.*, 2016). Estudos demonstram que 1 a 2 % da população com mais de 65 anos é afetada pela doença de Parkinson (DP), aumentando para 4 % em indivíduos acima de 85 anos de idade (Bekris *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017). A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra origina a DP (Wirdefeldt *et al.*, 2011). A perda seletiva e progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância nigra do mesencéfalo cerebral e disfunção do gânglio basal é acompanhada por uma redução drástica dos níveis de dopamina do corpo estriado (núcleo caudado, putâmen e globo pálido), responsável pelo controle da postura e movimento (Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009; Nague *et al.*, 2016).

Em condições normais, a dopamina facilita os neurônios na via direta, chamada de globo pálido interno (GPI) e inibe aqueles na via indireta, chamada de globo pálido externo (GPe). A ativação da via direta, representada na (FIG. 22), conduz a uma redução no disparo neuronal e facilitação do movimento, enquanto que a ativação da via indireta suprime os movimentos. Na DP, a diminuição da dopamina reprime o início dos movimentos, ocasionando as principais características motoras, tremores e rigidez (Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009).

FIGURA 22 - Resumo do modelo fisiopatológico clássico dos gânglios basais nos estados saudáveis (A) e parkinsoniana (B).



Setas verdes indicam atividade excitatória e setas vermelhas indicam a atividade inibitória. GPe = globo pálido pars externa. GPi = globo pálido pars interna. SNc = substância nigra pars compacta. SNr = substância nigra pars reticulata. STN = núcleo subtalâmico. VL = núcleo ventrolateral. Fonte: Adaptado por Rodriguez-Oroz (2009).

Características frequentemente presentes na análise histopatológica da DP são marcadas pela presença de corpos de Lewy. Esses corpos são formados devido ao dobramento anormal de proteínas e estresse no retículo endoplasmático (RE), originando proteínas tóxicas que se acumulam e agregam, sendo chamadas de corpos de Lewy (Malhotra e Kaufman, 2007; Sarkar *et al.*, 2016).

Em mamíferos, o RE desempenha atividades de enrolamento de proteínas (Malhotra e Kaufman, 2007; Sarkar *et al.*, 2016). Uma vez que os peptídeos são sintetizados no citoplasma, são transportados para o RE onde chaperonas promovem o dobramento apropriado das proteínas. No entanto, devido a mutação (como por exemplo, gene Parkin), super expressão ou modificações pós-traducionais incomuns, a proteína segue dobrada incorretamente. Os neurônios dopaminérgicos são suscetíveis a essa condição de enrolamento incorreto de proteínas, quando isso acontece, o estresse no ER ocorre, sendo que se o estresse for grave, o programa de morte celular é ativado (Malhotra e Kaufman, 2007; Sarkar *et al.*, 2016).

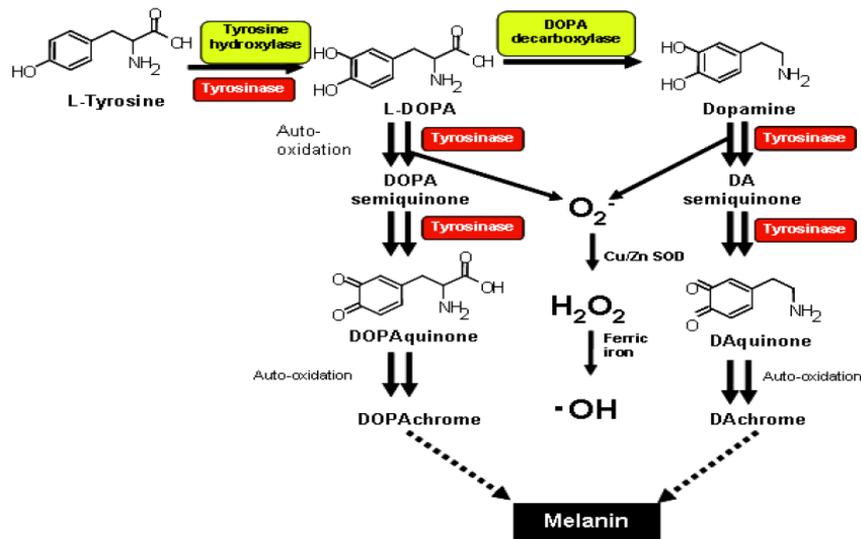
Tais proteínas anormais são consideradas tóxicas e são compostas por diferentes proteínas amiloides, entre elas a α -sinucleína (Irizarry *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998), sinphilina-1 (Wakabayashi *et al.*, 2000) e ubiquitina (Kuzuhara *et al.*, 1988). Corpos de Lewy também foram observados em outras áreas do cérebro, na região posterior do cérebro, medula espinal e sistema nervoso entérico. Acredita-se que o dobramento anormal da proteína α -sinucleína podem desencadear uma cascata de eventos que podem originar os sintomas clínicos da DP (Sakar *et al.*, 2016).

Adicionalmente, Jenner (2003) e Yacoubian *et al.* (2009) descreveram como patogênese da DP, a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, a agregação protéica, inflamação, catálise por ferro, excitotoxicidade, morte celular por apoptose e diminuição de fatores neurotróficos.

Evidências demonstram que a tirosinase, uma enzima polifenol oxidase envolvida na síntese de melanina da pele e cabelos e de neuromelanina (Bao *et al.*, 2010), desempenha atividade de formação de espécies reativas que oxidam a dopamina, conforme ilustrado na (FIG. 23). Tal consequência desencadeia a geração de mais espécies reativas de oxigênio que acarreta em danos celulares que conduzem à morte de células neuronais da substância nigra (Fedorow *et al.*, 2005; Hasegawa, 2010). Neste sentido, estudo considera a tirosinase um alvo importante na busca de novas drogas contra a DP (Neagu *et al.*, 2015), uma vez que, estudos demonstram aumento da peroxidação lipídica e de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo no cérebro de pacientes com DP (Dexter *et al.*, 1994; Alam *et al.*, 1997).

Dessa forma, o estresse oxidativo leva a disfunção sistêmica dos neurônios, o que pode levar à degeneração celular contínua e estresse fisiopatológico. Embora existam diversas causas para DP, o mecanismo da doença converge para a associação de fatores, incluindo, idade, fatores ambientais e genéticos, comprometimento mitocondrial, estresse oxidativo e proteínas tóxicas induzindo estresse celular, levando a falhas dos mecanismos de compensação e disfunção neuronal crônica (Greenamyre e Hastings, 2004; Surmeier *et al.*, 2010; Chesselet e Richter, 2011; Sarkar *et al.*, 2016).

FIGURA 23 - Geração de catecol quinonas citotóxicas e outras espécies reativas de oxigênio durante ação enzimática de tirosinase.



Fonte: Hasegawa (2010).

Adicionalmente, desde que se estabeleceu o diagnóstico da síndrome de Parkinson (Parkinson, 2002), apenas nas últimas décadas foi realizado o desenvolvimento de terapias específicas. Foi em 1960, quando se descobriu que a dopamina presente no corpo estriado é responsável pelos sintomas motores da DP (Carlsson *et al.*, 1957; Carlsson e Waldeck, 1958). Até então, a maioria dos tratamentos da DP era baseado na reposição da dopamina, melhorando assim, as principais características patológicas, como movimento lento, rigidez e tremor (Sarkar *et al.*, 2016). O medicamento Levodopa, um precursor da dopamina, foi introduzido depois de ter sido demonstrado que a principal causa de DP é devido à degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância nigra (Birkmayer e Hornykiewicz, 1961; Barbeau, 1965) e por várias décadas a Levodopa foi a terapia padrão, embora muitas complicações motoras e discinesias estejam associadas ao uso deste medicamento (Godwin-Austen e Smith, 1977; Simuni *et al.*, 2002; Bekris *et al.*, 2010).

Devido às complicações associadas a Levodopa, novos medicamentos sob a forma de agonistas do receptor de dopamina foram inseridos no mercado (Corrodi *et al.*, 1973; Calne *et al.*, 1974), dentre eles, o Ropinirol e Pramipexol (Rascol *et al.*, 2000; Fahn, 2005), entretanto, foi verificado efeitos colaterais não motores mais graves do que a Levodopa (Korczyn, 2003). Recentes avanços foram realizados na forma de tratamento cirúrgico direcionado para o

globo pálido interno ou núcleo subtalâmico e de estimulação cerebral (Benabid, 2009; Benabid *et al.*, 2009).

2.8 DIABETES

Conforme a American Diabetes Association (ADA), diabetes mellitus é uma complexa doença metabólica, ocasionada por uma deficiência na produção de insulina ou o aumento da resistência à ação desse hormônio (ADA, 2012). Segundo Shaw *et al.* (2010), a prevalência mundial de diabetes entre adultos foi estimada em 6,4 %, afetando 285 milhões de adultos em 2010, com projeção de 7,7 % e 439 milhões de adultos até 2030. Entre 2010 e 2030, haverá aumento de 69 % no número de adultos com diabetes em países em desenvolvimento e aumento de 20 % em países desenvolvidos. Para países em desenvolvimento, o aumento do número de diabetes é esperado para cada grupo etário, com uma duplicação para o grupo etário acima de 60 anos, já em países desenvolvidos, o aumento esperado para essa faixa etária é de apenas 38% (Shaw *et al.*, 2010). Em 2010, a população total de adultos portadores de diabetes no Brasil foi estimada em 7,6 milhões, sendo projetada para o ano 2030, 12,7 milhões de adultos portadores da doença (Shaw *et al.*, 2010).

Existem duas principais formas de diabetes (WHO, 1999). O tipo 1 é geralmente caracterizado por uma deficiência na secreção de insulina, associada a uma destruição auto-imune das células β pancreáticas (Zhang *et al.*, 2008), sendo considerada a principal forma de diabetes em jovens (The Diamond Project Group, 2006). Este tipo de diabetes representa aproximadamente 5 a 20 % de todos os casos de diabetes e está associado a uma maior morbidade e mortalidade. Estes pacientes necessitam do tratamento com insulina exógena para sua sobrevivência, desta forma, o diagnóstico deve ser precoce para a prevenção de morbidades decorrentes do não tratamento (Rewers, 2012).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é ocasionado principalmente por aumento da resistência à ação da insulina (Zimmet *et al.*, 2001). O DM2 compreende aproximadamente 90 % de todos os casos da doença. Os pacientes com esta condição clínica conservam capacidade de secreção

endógena de insulina; todavia, os níveis de insulina são baixos em relação aos da glicose e à magnitude de resistência à insulina. Esses pacientes não dependem da insulina para sobrevivência imediata, e raramente verifica-se o desenvolvimento de cetoacidose, exceto em condições de estresse físico (Barski *et al.*, 2012). Contudo, muitos pacientes podem necessitar de terapia com insulina exógena para o controle apropriado da glicemia caso não consigam unicamente por meio da dieta e por meio do uso de agentes hipoglicemiantes orais (Zimmet *et al.*, 2001).

As principais complicações decorrentes do diabetes estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças vasculares. Essas complicações podem ser divididas em doença microvascular e macrovascular. As complicações microvasculares incluem nefropatia e retinopatia (Baynes e Thorpe, 1999). As complicações macrovasculares incluem, as doenças cardiovascular aterosclerótica, arterial coronariana, cerebrovascular e vascular periférica, sendo essas as principais causas de mortes na população diabética (Yim *et al.*, 2007). Acredita-se que essas complicações do diabetes ocorram devido ao dano oxidativo provocado nesses tecidos pelas ERO (Yim *et al.*, 2007).

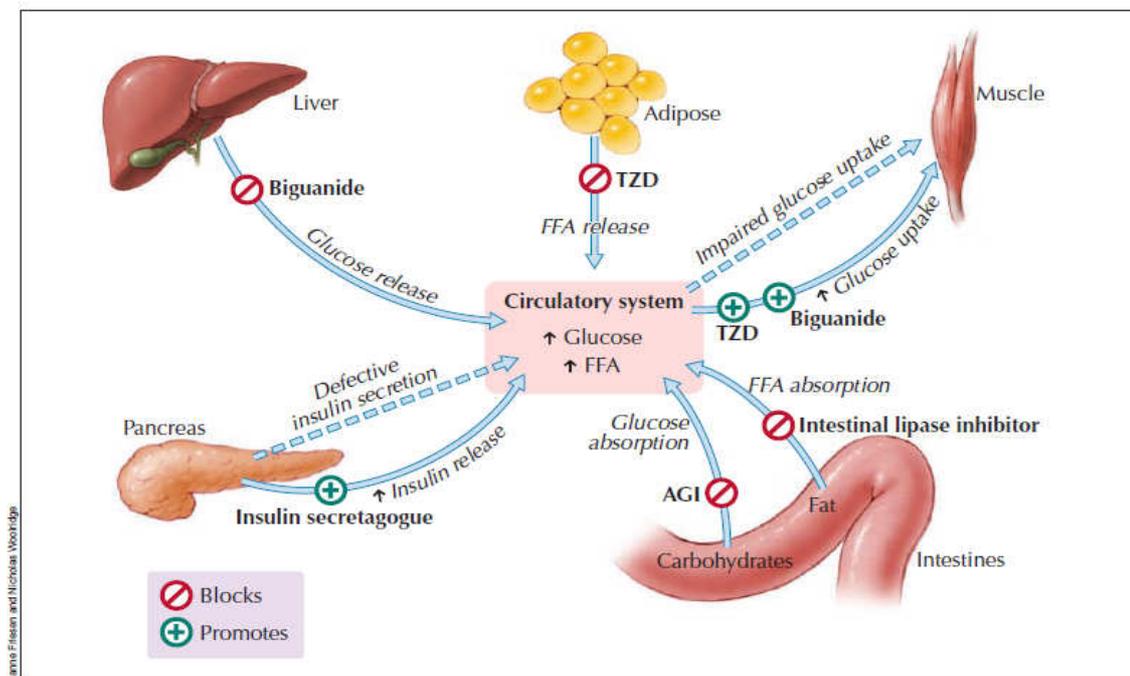
Vários estudos em modelos animais demonstram mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes dos tecidos hepático, renal e cardíaco (Saxena *et al.*, 1993). Em condições fisiológicas, a cadeia respiratória mitocondrial gera um gradiente de prótons, cuja energia é utilizada para síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Quando há alta estimulação desse processo decorrente de uma hiperglicemia, ocorre desequilíbrio nesse gradiente de prótons transmembrânico e alteração do potencial de membrana mitocondrial, estimulando a produção de superóxidos. Portanto, essa situação desencadeia uma série de alterações mitocondriais que afetam a síntese de ATP e aumenta a susceptibilidade celular ao estresse oxidativo (Kiritoshi *et al.*, 2003).

O provável mecanismo para o desenvolvimento dessas complicações tem sido descrito, enfocando que esses níveis elevados de glicemia estimulam a conversão de glicose em sorbitol e frutose, com consumo de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e glutatona, conseqüentemente, desencadeia uma série de eventos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento das complicações vasculares decorrentes

do diabetes. Portanto, a diminuição dos redutores antioxidantes NADPH e glutatona, ocasiona uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo associado ao aumento de ROS intracelular (Browlee, 2001). Recentemente, Henriksen *et al.* (2011) descreveram que a superabundância de oxidantes está envolvida na etiologia multifatorial da resistência à insulina, principalmente no tecido muscular esquelético, e o subsequente desenvolvimento de DM2.

Embora a terapia não farmacológica (por exemplo, dieta, exercício físico e perda de peso) continue sendo importante no tratamento de diabetes, a terapia farmacológica é muitas vezes necessária para alcançar o controle glicêmico ideal. A administração de agentes antihiperlipicemiantes orais (AHOs) pode ser realizada tanto isoladamente ou combinada com outros AHOs ou insulina. A quantidade de AHOs disponíveis aumentou significativamente, o que se traduz em mais opções terapêuticas. Dentre os AHOs, incluem os inibidores da α -amilase e α -glucosidase, biguanidas, secretagogos de insulina, sensibilizadores de insulina e inibidor de lipase intestinal representados na (FIG. 24) (Cheng e Fantus, 2005; Dalar e Kończak, 2013).

FIGURA 24 - Principais órgãos-alvo e ações de agentes antihiperlipicemiantes administrados por via oral em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.



Tiazolidinediona (TZD); ácidos graxos livres (FFA); inibidor α -glucosidase (AGI). Fonte: Cheng e Fantus (2005).

Os AHOs que não atuam em um alvo fisiopatológico específico da diabetes, agem inibindo competitivamente enzimas intestinais responsáveis pela quebra de oligossacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos para serem absorvidos (Dalar e Kończak, 2013). Tal medicação atua principalmente inibindo a α -glicosidase, que se encontra predominantemente na metade proximal do intestino delgado. Os três principais medicamentos que agem inibindo as enzimas α -glicosidase e α -amilase e utilizados na prática clínica são Acarbose, Voglibose e Miglitol, que atuam diminuindo a biodisponibilidade dos carboidratos no organismo e conseqüentemente reduzindo os níveis de glicemia pós-prandial (DiNicolantonio *et al.*, 2015).

A elevada prevalência e complexidade dessa doença e o elevado custo financeiro decorrente do seu tratamento tem desafiado cientistas a investigarem a ação de plantas medicinais como alternativas terapêuticas para o tratamento do diabetes com menores custos e baixos efeitos colaterais (Tripathi e Chandra, 2009). Neste sentido, produtos naturais com ação antioxidante são descritos por apresentarem ações de inibição da enzima α -amilase e α -glicosidase semelhantes a acarbose (Yamagishi *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015). Os medicamentos que agem inibindo a digestão e absorção de carboidratos têm sido considerados a abordagem terapêutica mais comum para redução da hiperglicemia pós-prandial (Sakulnarmrat e Kończak, 2012).

2.9 OBESIDADE

Conforme a OMS, o excesso de peso e obesidade representa ameaça para a saúde (WHO, 2000). A obesidade é definida pelo excesso de peso, neste sentido, o índice de massa corporal (IMC), que é o peso em quilogramas, dividido pela altura em metros ao quadrado ($IMC = \text{Peso (quilogramas)}/\text{altura (metros}^2\text{)}$), é usado para identificar obesidade. Para os adultos, um IMC de 25,0 a 29,9 kg/m^2 é definido como excesso de peso e um IMC de 30 kg/m^2 ou superior é definido como obesidade (Jensen *et al.*, 2014). Entretanto, esse índice não é utilizado para crianças com idade entre 2 a 18 anos, nesses casos, recomenda-se o uso de uma escala percentual do IMC com base no

sexo e idade da criança. Sendo assim, para essa população de 2 a 18 anos, o excesso de peso é definido como um IMC entre 85 a 94 % e obesidade um IMC igual ou acima de 95 % (Fitch *et al.*, 2016). O risco de mortalidade aumenta conforme aumenta o IMC acima de 25 kg/m², sendo que, um aumento de 5 pontos no IMC, aumenta a mortalidade geral em 29 %, a mortalidade por complicação vascular em 41 % e a mortalidade relacionada ao diabetes em 210 % (Whitlock *et al.*, 2009).

Segundo Ng *et al.* (2014), a taxa de prevalência mundial para excesso de peso ou obesidade entre 1980 e 2013 aumentou 27,5 % para adultos e 47,1 % para crianças, considerando um total de 2,1 bilhões de indivíduos com sobrepeso ou obesidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. No entanto, a prevalência de sobrepeso e obesidade é maior nos países desenvolvidos, quando comparados aos em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, mais homens são considerados com sobrepeso ou obesidade, entretanto, nos países em desenvolvimento, as mulheres apresentam maior excesso de peso e obesidade (Ng *et al.*, 2014). No Brasil, inquéritos nacionais realizados desde o ano de 1970, descrevem que a taxa de obesidade vem aumentando em todas as faixas etárias (IBGE, 2010).

O aumento na taxa de excesso de peso e obesidade reflete nos custos decorrentes dessa condição, quando comparados aos gastos com saúde de um indivíduo de peso médio (Sturm, 2002). No Brasil, Bahia *et al.* (2012) estimam que os custos do Sistema Único de Saúde brasileiro para tratamento do excesso de peso e obesidade equivalem a US\$ 221 milhões, para doenças relacionadas ao excesso de peso e obesidade é de US\$ 2,1 bilhões, sendo US\$ 1,4 bilhão (68,4 %) para as internações e US\$ 679 milhões para procedimentos ambulatoriais.

Estudos descrevem diversos fatores associados ao desenvolvimento da obesidade, incluindo a ingestão excessiva de calorias (Crino *et al.*, 2015), fatores socioeconômicos (Kershaw *et al.*, 2013), genético familiar (Price e Gottesman, 1991), microbiota humana e infecções (Schreiner *et al.*, 2015), alteração do ritmo circadiano (Garaulet e Madrid, 2009), alterações hormonais responsáveis pelo controle nervoso central da ingestão alimentar, dentre eles, peptídeo semelhante ao glucagon, oxintomodulina, leptina, adiponectina,

grelina, peptídeo tirosina-tirosina e colecistoquinina (Simpson *et al.*, 2012; Bataille e Dalle, 2014).

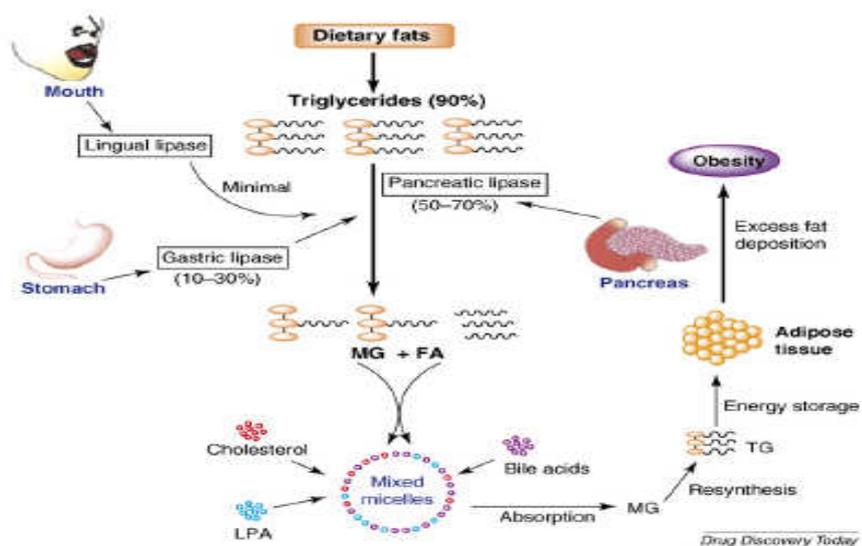
Adicionalmente, pacientes com obesidade apresentam risco elevado para o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo, doença cardíaca coronariana, hipertensão e acidente vascular cerebral, certos tipos de câncer, diabetes tipo 2, doença da vesícula biliar, dislipidemia, osteoartrite, gota e doenças pulmonares, incluindo a apneia do sono (WHO, 2000; Jensen *et al.*, 2014). Além disso, indivíduos que apresentam hipotireoidismo, síndrome de Cushing, síndrome de ovário policístico, artrite reumatoide (Feng *et al.*, 2016) e uso de certos tipos de medicamentos, incluindo antidepressivos (Uguz *et al.*, 2015), sulfoniluréias, tiazolinedionas e insulina (Apovian *et al.*, 2015), corticosteroides (Wung *et al.*, 2008), β -bloqueadores e anticonvulsivantes (Ness-Abramof e Apovian, 2005) são considerados pacientes de risco para o desenvolvimento de obesidade.

Neste sentido, a obesidade por ser uma condição médica crônica, necessita por parte da equipe de saúde, uma abordagem abrangente. Embora todos os pacientes afetados necessitem de aconselhamento sobre nutrição, atividade física e mudanças comportamentais, aqueles que não respondem a intervenções no estilo de vida, podem se beneficiar de farmacoterapia, dispositivos médicos, ou cirurgia bariátrica (Kahan *et al.*, 2016). A farmacoterapia da obesidade é indicada como auxiliar juntamente com as mudanças comportamentais em indivíduos obesos com e sem doenças associadas. Além disso, é imprescindível a continuidade do tratamento, quer seja com medicação de curto ou de longo prazo (Kahan, 2016). Atualmente existem cinco medicamentos aprovados pelo FDA para uso de longo prazo, dentre eles, o Orlistat, inibidor da enzima lipase pancreática (Apovian *et al.*, 2015); o Locaserin, agonista do receptor de serotonina; a combinação de Fentermina, amina simpatomimética e Topiramato (múltiplos mecanismos) (Kahan, 2016); a combinação de Naltrexona, antagonista do receptor opióide e Bupropiona, um inibidor de dopamina e norepinefrina (Greenway *et al.*, 2009); e o injetável Liraglutida, agonista do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (Secher *et al.*, 2014).

Dentre os medicamentos descritos, o que apresenta uma abordagem para reduzir a absorção de gorduras provenientes da dieta é o orlistat, um derivado saturado da Lipstatina, composto isolado da bactéria *Streptomyces toxytricini* e que promove inibição da enzima lipase pancreática (Weibel *et al.*, 1987; Apovian *et al.*, 2015). Além da ação antiobesidade do orlistat, o tratamento com esse medicamento apresenta redução modesta da pressão sanguínea, melhora da tolerância oral a glicose e prevenção do diabetes tipo 2 em pacientes obesos (Heymsfield *et al.*, 2000; Torgerson *et al.*, 2004).

Lipases são enzimas que digerem gorduras, incluindo triacilglicerol e fosfolipídios. Dentre as lipases humanas, incluem as lipases pré-duodenal (lingual e gástrica) e extra-duodenal (pancreática, hepática, lipoproteica e endotelial) apresentada na (FIG. 25) (Mukherjee, 2003). A lipase pancreática (triacilglicerol acil hidrolase) é a principal enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas, desempenhando função fundamental na digestão de triacilgliceróis. Essa enzima remove os ácidos graxos a partir da posição α e α' dos triacilgliceróis provenientes da dieta, produzindo β -monoacilgliceróis e ácidos graxos saturados e polinsaturados de cadeia longa. A lipase pancreática é responsável pela hidrólise de 50-70 % do total das gorduras provenientes da dieta (Mukherjee, 2003; Birari e Bhutani, 2007).

FIGURA 25 - Papel fisiológico da lipase pancreática na absorção de lipídios.



Fonte: Birari e Bhutani (2007).

Adicionalmente, existem plantas medicinais e derivados fenólicos com ação antioxidante que promovem inibição da enzima lipase, apresentando resultados de inibição semelhantes ao orlistat. Tais ações verificadas em extratos e moléculas naturais podem servir como estratégia de tratamento alternativo mais seguro, natural e com menor custo quando comparados as drogas sintéticas (Birari e Bhutani, 2007; Slanc et al., 2009; de la Garza *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar quimicamente o extrato das folhas de *Hancornia speciosa*, bem como avaliar as atividades biológicas de seu extrato etanólico e flavonoides identificados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Demonstrar a qualidade e segurança microbiológica das folhas de *Hancornia speciosa*;

3.2.2 Realizar a caracterização química das folhas de *Hancornia speciosa* e de seu extrato etanólico (EEHS);

3.2.3 Verificar a atividade antimicrobiana do EEHS;

3.2.4 Avaliar o potencial citotóxico e os mecanismos de morte celular induzida pelo EEHS;

3.2.5 Comparar o potencial antioxidante do EEHS e flavonoides identificados;

3.2.6 Analisar a atividade antimutagênica do EEHS e flavonoides identificados;

3.2.7 Determinar as atividades de inibição enzimáticas do EEHS e flavonoides identificados.

ANEXOS

ANEXO 1

Artigo publicado na revista PLOS ONE (ISSN - 1932-6203)

Fator de impacto (JCR 2016): 2.806

Qualis para biotecnologia: A1

ANEXO 2

Artigo publicado na revista OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR
LONGEVITY (ISSN - 1942-0900)

Fator de impacto (JCR 2016): 4.49

Qualis para biotecnologia: A1

RESEARCH ARTICLE

Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract from *Hancornia speciosa* Gomes

Uilson P. Santos¹, Jaqueline F. Campos¹, Heron Fernandes V. Torquato², Edgar Julian Paredes-Gamero^{2,3}, Carlos Alexandre Carollo⁴, Leticia M. Estevinho⁵, Kely de Picoli Souza¹, Edson Lucas dos Santos^{1*}

1 School of Environmental and Biological Science, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados Ithau, Dourados, MS, Brazil, **2** Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **3** Center for Interdisciplinary Research Biochemistry, University of Mogi das Cruzes, Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, Mogi das Cruzes, SP, Brazil, **4** Federal University of Mato Grosso do Sul, Center of Biological and Health Sciences, Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Campo Grande, MS, Brazil, **5** Agricultural College of Bragança, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Santa Apolónia, Bragança, Portugal and Centre of Molecular and Environmental Biology, University of Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal

* edson.lucas@pq.cnpq.br



OPEN ACCESS

Citation: Santos UP, Campos JF, Torquato HFV, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, et al. (2016) Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract from *Hancornia speciosa* Gomes. PLoS ONE 11(12): e0167531. doi:10.1371/journal.pone.0167531

Editor: Gabriel Agbor, Institute of medical research and medicinal plant studies, CAMEROON

Received: September 5, 2016

Accepted: November 9, 2016

Published: December 1, 2016

Copyright: © 2016 Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and PRODER, (24.073 – Á, Portugal). E.L.S.; E.J.P.G e C.A.L.C., were recipient of fellowship from CNPq, Brazil. The funders had no role in study

Abstract

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) is a fruit tree, popularly known as mangabeira, and it is widely distributed throughout Brazil. Several parts of the plant are used in folk medicine, and the leaf and bark extracts have anti-inflammatory, antihypertensive, antidiabetic, and antimicrobial properties. In this study, we investigated the chemical composition of the ethanolic extract of *Hancornia speciosa* leaves (EEHS) and its antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities as well as the mechanisms involved in cell death. The chemical compounds were identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The antioxidant activity of the EEHS was investigated using the method that involves the scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radicals as well as the inhibition of oxidative hemolysis and lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) in human erythrocytes. The antimicrobial activity was determined by calculating the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, minimum fungicidal concentration, and zone of inhibition. Kasumi-1 leukemic cells were used to assess the cytotoxic activity and mechanisms involved in cell death promoted by the EEHS. The chemical compounds identified were quinic acid, chlorogenic acid, catechin, rutin, isoquercitrin, kaempferol-rutinoside, and catechin-pentoside. The EEHS demonstrated antioxidant activity via the sequestration of free radicals, inhibition of hemolysis, and inhibition of lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with an oxidizing agent. The antimicrobial activity was observed against American Type Culture Collection (ATCC) and hospital strains of bacteria and fungi, filamentous fungi and dermatophytes. The cytotoxic activity of the EEHS was induced by apoptosis, reduction of the mitochondrial membrane potential, and activation of cathepsins. Together, these results indicate the presence of phenolic compounds and flavonoids in the EEHS and that their antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities in acute myeloid leukemia cells are mediated by apoptosis.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The cerrado region (Brazilian Savannah) of Brazil covers approximately 2 million km² and corresponds to approximately 22% of the Brazilian territory [1]. This biome has a wide variety of medicinal plants used in folk medicine. Many of these plants have been investigated, and their antioxidant [2], antimicrobial [3], antidiabetic [4], anti-inflammatory [5], and cytotoxic [6] activities, among others, have been scientifically proven.

One of the medicinal plants found in the Brazilian cerrado is *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), popularly known as mangabeira. In this species, the roots have antihypertensive and wound-healing activities [7]; the bark has antidiabetic, anti-obesity, antimicrobial, and gastroprotective activities [3,8,9]; the latex has anti-inflammatory activity [10]; and the leaves have antihypertensive [11], vasodilator [12,13], anti-inflammatory [14,15], and antidiabetic [4] activities and are used for treatment of dysmenorrhea [16].

Presently, there is a growing demand for natural products with therapeutic activities, including antioxidant activity, which can overcome the harmful effects of free radicals [17], and low toxicities compared with synthetic antioxidants that are widely used in food products, cosmetics, and drugs [18,19].

Among the main chemical compounds responsible for the antioxidant activities of medicinal plants, phenolic compounds and flavonoids are the most prominent because of their roles against oxidative stress [20,21].

These compounds also have antimicrobial activities [22]. These properties have attracted scientific interest because 60% of the antimicrobial drugs discovered in the past few decades are of natural origin [23]. Furthermore, the number of pathogens that are resistant to commercial antimicrobials has increased [24].

In addition, compounds derived from natural sources have great potential as anticancer drugs, and 51% of the drugs currently available for treatment of this pathology are directly or indirectly derived from natural products [23]. Among these compounds, phenolic compounds and flavonoids from several plant species have cytotoxic activities against different cell lines, including leukemic cell lines [2,25,26].

In this context, the aim of this study was to determine the chemical composition of the ethanolic extract of *Hancornia speciosa* Gomes leaves and evaluate its antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities *in vitro* using the acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1.

Materials and Methods

Ethics of Experimentation

The *H. speciosa* Gomes leaves were collected following the identification of the plant and authorization of the SISBIO (*Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade*, permit number 54470–1). The protocol to collect of human peripheral blood, was approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa; CEP) of the University Center of Grande Dourados, Brazil (CEP process number 123/12). All subjects provided written informed consent for participation.

Plant Material and Extract Preparation

The *H. speciosa* Gomes leaves were in Dourados, Mato Grosso do Sul (S 21° 59' 41" and W 55° 19' 24"), Brazil, oven-dried with the air circulation at a temperature of 45 ± 5°C, and then ground in a Willy-type knife mill. An exsiccated sample was deposited in the Herbarium of the Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil, with registration number 4774.

The extract was then prepared by macerating the plant material in an ethanol 96% (1:10) mixture at room temperature for 14 days. Then, the extract was filtered, the filtrate was concentrated in a rotary vacuum evaporator (Gehaka, São Paulo, SP, Brazil), freeze-dried to obtain a calculated specific yield of 28%, and the final freeze-dried ethanol extract of *H. speciosa* Gomes (EEHS) was stored at -20°C protected from light.

Chemical Analysis

Determination of total flavonoids and phenolic compounds. The content of phenolic compounds in the EEHS was determined using the Folin-Ciocalteu colorimetric method, as detailed by Meda et al. [27], with some modifications. The EEHS (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was diluted in absolute ethanol, and a 0.5-mL aliquot was added to 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:10 with distilled water). This solution was allowed to stand for 5 min at room temperature. After this period, 2 mL of a 14% sodium carbonate solution was added to the samples, the mixture was incubated for 2 h at room temperature, and the absorbance was read at 760 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, UK). A standard curve was prepared using gallic acid in the concentration range of 0.4–11.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The total amount of phenolic compounds was expressed in milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of the EEHS.

The total flavonoids present in the EEHS were determined according to the method described by Liberio et al. [28], with some modifications. Briefly, 4.5 mL of a hexahydrate aluminum chloride solution ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at 2% in absolute methanol was mixed with 0.5 mL of the EEHS (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mixture was incubated for 30 min at room temperature, and the absorbance was read at 415 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, UK). A standard curve was prepared using quercetin in the concentration range of 0.4–11.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The total flavonoids were expressed in milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram of the EEHS. All experiments were performed in triplicate.

Determination of phenolic compounds in the EEHS using HPLC-DAD-MS/MS. A 1 μL aliquot of the EEHS (1 mg/mL) was analyzed via high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD; Shimadzu, Japan) coupled to a high-resolution mass spectrometer (model micrOTOF-Q IIII, Bruker, Germany). A C-18 column (Kinetex, 2.6 μm , 150 x 2.2 mm) protected by a pre-column of the same material was used. The mobile phases used were water (phase A) and acetonitrile (phase B), both containing 1% acetic acid. The following gradient elution was used: 0–2 min. at 5% B, 2–20 min. at 5%–80% B, and an additional 10 min for column washing and re-equilibration. The flow rate was 0.2 mL/min. The mass spectrometer parameters were as follows: capillary voltages of the electrospray ionization system (ESI) of 3500 V (negative mode) and 4500 V (positive mode). The capillary temperature was 200°C , the collision energy was variable for the MS/MS experiments, and data were obtained in the positive and negative ion modes. The negative mode was chosen because it generated more data than the positive mode. Trifluoroacetic acid sodium salt was used as the internal calibrant. The compounds quinic acid, chlorogenic acid, catechin, rutin, and isoquercitrin were identified by comparison with commercial standards (Sigma-Aldrich).

Antioxidant activity

Scavenging of DPPH free radicals. The scavenging of stable DPPH radicals was evaluated using the method detailed by Gupta and Gupta [29], with some modifications. Briefly, 200 μL of the EEHS (100–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was mixed with 1.8 mL of an ethanol solution of 0.1 mM DPPH. The mixture was homogenized and incubated for 30 min at room temperature in the dark. The absorbance was read at 517 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG

Instruments Limited, UK). Ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as the antioxidant standards. Three independent experiments were performed in duplicate. The percentage of free radical-scavenging activity was expressed with the following formula: $1 - (\text{Abs}_{\text{sample}}/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$.

Antioxidant assay in human erythrocytes

Inhibition assay of AAPH-induced hemolysis. The protection against hemolysis promoted by the EEHS were evaluated using the method described by Valente et al. [30], with some modifications. The tests were conducted with erythrocyte suspensions (2.5%) previously incubated at 37°C for 30 min in the presence of different concentrations of ascorbic acid or the EEHS (50–125 µg/mL). After this period, 2,2'-azobis-2-amidinopropane (AAPH) at a concentration of 50 mM was added to the samples subjected to hemolysis induction. This mixture was incubated at 37°C for 4 h with frequent stirring. The negative control consisted of erythrocytes incubated with ethanol at a final concentration of 0.6%. After every 60-min incubation period, samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min, and an aliquot of each supernatant was collected and diluted in saline solution. Subsequently, the absorbance was read at 540 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, UK). Three independent experiments were conducted in duplicate. The percentage of hemolysis was measured using the following formula: $A/B \times 100$, where (A) corresponds to the sample absorbance and (B) corresponds to the total hemolysis (erythrocytes incubated with distilled water).

Inhibition of malondialdehyde production. The effect of the EEHS on the inhibition of the production of malondialdehyde (MDA), a by-product of lipid peroxidation, was evaluated by incubation of a human erythrocyte suspension (5%) in 50 mM of the oxidizing agent AAPH [31]. The suspension was pre-incubated at 37°C for 30 min in the presence of ascorbic acid or the EEHS (100 µg/mL). Afterwards, 50 mM AAPH was added, and the mixture was maintained at 37°C for 3 h with frequent stirring. The negative control consisted of erythrocytes incubated with ethanol at a final concentration of 0.6%. After the incubation period, the samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Aliquots (500 µL) of the supernatants were transferred to test tubes containing 1 mL of 10 nmol thiobarbituric acid (TBA). The standard solution consisted of 500 µL of 20 mM MDA in 1 mL of TBA. The samples were incubated at 96°C for 45 min. After the samples were cooled for 15 min, 4 mL of n-butyl alcohol was added to each sample, and the samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatants were read at 532 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, UK). Two independent experiments were conducted in triplicate. The MDA levels in the samples were expressed in nmol/mL using the following formula: $\text{sample absorbance} \times (20 \times 220.32 / \text{standard absorbance})$.

Antimicrobial activity

Microbial growth. The antimicrobial activity of the EEHS was evaluated using gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*), gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), and the yeast *Candida albicans*. All microorganisms used were certified by the American Type Culture Collection (ATCC) and the Agricultural School (*Escola Superior Agrária, ESA*) of Bragança, Portugal. The tested strains were initially cultured in Muller-Hinton broth containing 20% glycerol and were stored at -70°C. Before experimental use, each sample was subcultured overnight in liquid nutrient broth (for the bacterial strains) or peptone dextrose liquid medium (for the yeast strain). The inocula were diluted in saline solution and adjusted to a 0.5 McFarland standard. Each dilution was confirmed by spectrophotometric readings at 540 nm for bacterial strains and 640 nm for yeast strains in a Unicam Helios Alpha

UV-VIS spectrophotometer (Thermo Spectronic, Cambridge, UK) [32]. Aliquots of different bacterial inocula (10^8 colony forming units (CFU)/mL) and yeast inocula (10^5 CFU/mL) were added to the microplates for evaluation of antimicrobial activity.

Minimum inhibitory concentration. The minimum inhibitory concentrations of the EEHS as well as the controls, gentamicin (antibiotic) and amphotericin B (antifungal), were determined using a microdilution assay, as described by Morais et al. [33]. Antimicrobial assays were conducted using nutrient broth (NB) (for the bacterial strains) or yeast peptone dextrose (YPD) liquid medium (for the yeast strain) in 96-well microplates. The EEHS was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) at 70% (final concentration of DMSO of 0.27%), and serial dilutions were prepared with concentrations between 0.78 and 100 mg/mL. The inocula were added to all wells except for the negative controls, and the microplates were incubated at 37°C for 24 h (for the bacterial strains) or 25°C for 48 h (for the yeast strain). DMSO was used as the control. The antimicrobial activity was detected by adding 20 μ L of 1% 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium (TTC). The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the sample capable of inhibiting microbial growth, as indicated by the TTC staining. The MIC was calculated after collecting a 20 μ L aliquot from each well where color changes were not observed and transferring it to NB or YPD medium for 24 h at 37°C (for the bacterial strains) or 48 h at 25°C (for the yeast strain). The lowest concentration that did not result in growth after subculturing was defined as the minimum bactericidal concentration (MBC) or minimum fungicidal concentration (MFC). Assays were performed in triplicate for each microorganism.

Inhibition of fungal growth. Pure cultures of fungal isolates were obtained from the Microbiology Laboratory of ESA. The agar diffusion technique was used to evaluate the activity of the EEHS against the filamentous fungi *Colletotrichum acutatum* ESA12, *Fusarium culmorum* ESA23, and *Mucor piriformis* ESA43, as well as the dermatophytes *Microsporium canis* ESA28, *Microsporium audouinii*, and *Trichophyton* sp. After autoclaving, potato dextrose agar (PDA) was incorporated into the EEHS at final concentrations of 5 mg/mL and 10 mg/mL, followed by plating onto Petri dishes. Tartaric acid at 1% and chloramphenicol at 0.1 g/L were added to the PDA. Subsequently, a 5-mm culture disc of each fungal strain tested was transferred to the center of the dishes. The discs were obtained from the edges of colonies previously grown for seven days on PDA. The plates were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72 h. After this period, the diameters of the fungal growth zones were measured [34]. Assays were performed in duplicate for each microorganism.

Cytotoxic activity

Cell lines and culture conditions. The acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1 was cultured in RPMI 1640 medium (Gibco; Rockville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (CULTILAB, Brazil), 100 U/mL of penicillin, and 100 μ g/mL of streptomycin, and it was incubated in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Assay with Annexin V and propidium iodide. The cytotoxic activity was evaluated using the method described by Paredes-Gamero et al. [35], with some modifications. Cells were plated onto 96-well microplates (10^5 cells/mL) in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS in the absence or presence of the EEHS (25–200 μ g/mL) for 24 h in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After this period, the cells were washed with PBS and resuspended in Annexin buffer (0.01 M HEPES, pH = 7.4, 0.14 M NaCl and 2.5 mM CaCl₂). Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) was added to each cell suspension according to the manufacturer's instructions, and each suspension was incubated for 20 min at room temperature. The stained cells were analyzed using an Accuri C6 flow

cytometer (Becton Dickinson, NJ, USA) and Accuri C6 software (Becton Dickinson). A total of 4000 events were collected per sample.

Evaluation of the mitochondrial membrane potential. Changes in the mitochondrial membrane potential were assessed using 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Molecular Probes; Eugene, OR, USA) following the method described by de Moraes et al. [36]. JC-1 is a cationic marker with a membrane potential-dependent accumulation in the mitochondria, indicated by the change of the fluorescence emission from red (590 nm) to green (520 nm). The cells labeled red indicate a higher mitochondrial membrane potential, whereas those labeled green indicate a lower potential. To this end, Kasumi-1 cells were seeded in 24-well plates (10^5 cells/mL) in medium containing 10% FBS and were treated with the IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of the EEHS or carboxycyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone (10 μM) (control) for 24 h in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2 . Subsequently, the cells were centrifuged and incubated with JC-1 (1 $\mu\text{g/mL}$) for 15 min at room temperature. Fluorescence was detected in an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using Accuri C6 software (Becton Dickinson, USA). A total of 4000 events were collected per sample.

Effect of inhibitors on EEHS-induced cell death. Kasumi-1 cells were plated onto 96-well microplates (10^5 cells/mL) containing RPMI 1640 supplemented with 10% FBS in the presence of 20 μM of the pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-Asp-(O-methyl)-fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK), 20 μM of necrosis inhibitor necrostatin-1 (NEC-1), 20 μM of cathepsin inhibitor trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E64), and 50 μM of reactive oxygen species inhibitor N-acetyl-L-cysteine (NAC), and it was incubated in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2 for 60 min. Afterwards, 160 $\mu\text{g/mL}$ of the EEHS was added to each sample, and the mixture was incubated for 24 h. Then, the cells were washed with PBS, resuspended in Annexin buffer (0.01 M HEPES, pH = 7.4, 0.14 M NaCl and 2.5 mM CaCl_2) and incubated for 20 min at room temperature after the addition of annexin V-FITC and propidium iodide (PI) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) according to the manufacturer's instructions. The analyses were performed using an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson) and Accuri C6 software (Becton Dickinson), with 4000 events collected per sample.

Statistics

All data are shown as the mean \pm standard error of mean (SEM) and for statistical significant differences between the groups, using the *t-test* for comparison between two groups, using the Prism 6 GraphPad software. The results were considered significant when $p^* P < 0.05$, $** P < 0.01$ e $*** P < 0.001$.

Results

Chemical composition

The concentrations of phenolic compounds and total flavonoids in the EEHS were 179 ± 2.9 mg GAE/g of extract and 29 ± 1.1 mg QE/g of extract, respectively. The chemical profile of the extract was determined using HPLC-DAD-MS/MS (Fig 1 and Table 1) and indicated the presence of quinic acid (1), chlorogenic acid (2), catechin (3), rutin (6), and isoquercitrin (7), which were identified by comparison with authentic standards. In addition, two other heterosidic flavonoid derivatives were characterized, kaempferol-rutinoside (8), and their fragmentation patterns were similar to those of rutin but differed in the absence of a hydroxyl group in the flavonoid. They were identified through the fragment with an m/z of 285.0393 ($\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$). Compound 10 had a UV spectrum similar to that of catechin and was found at an m/z of 435.1282, consistent with the molecular formula $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ and corresponding to the addition

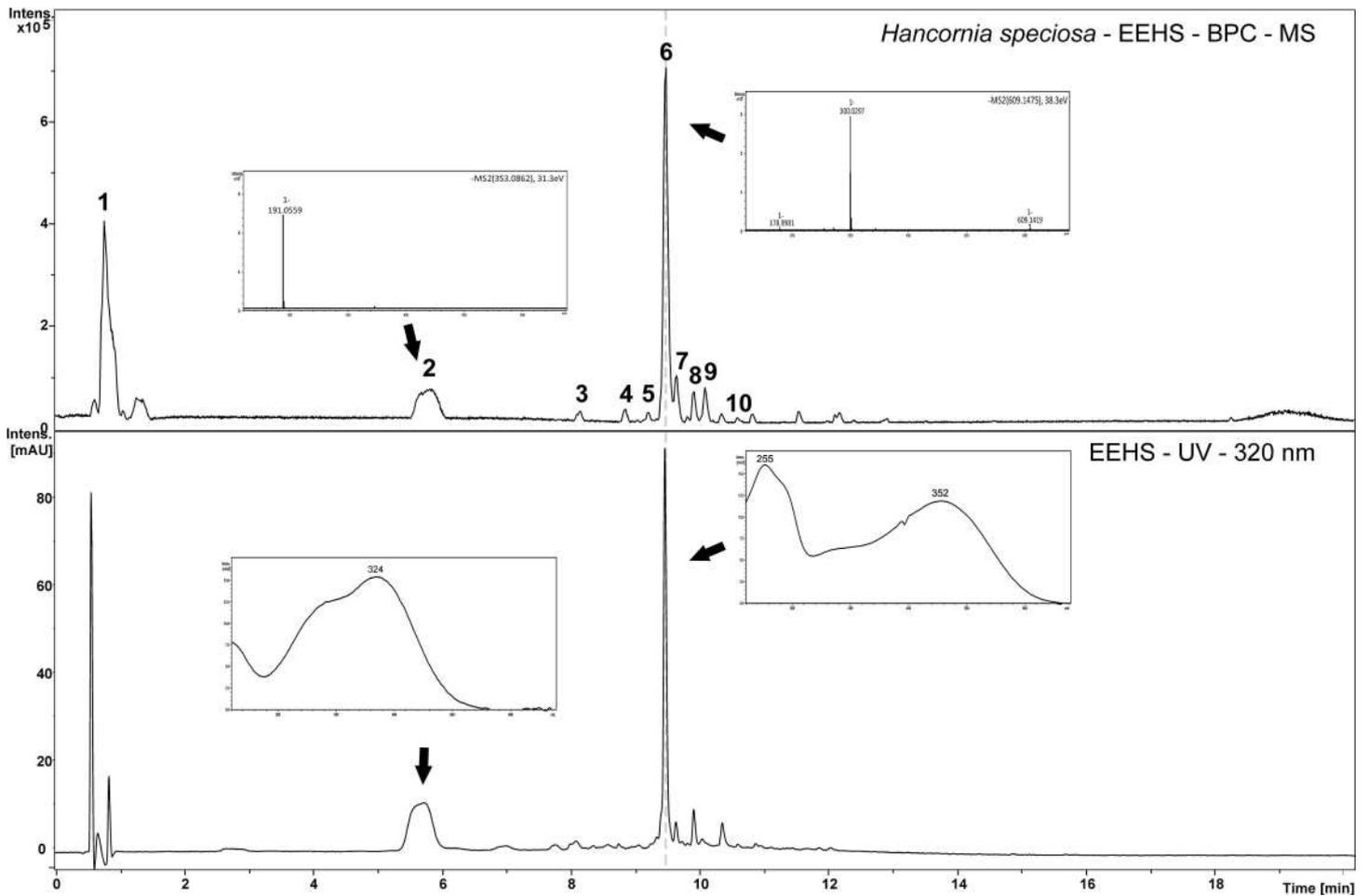


Fig 1. Chemical composition. Chromatograms obtained by HPLC-DAD-MS/MS (negative ion mode) indicating the presence of phenolic compounds in the EEHS. The enlarged figures correspond to the MS/MS spectra of the following main compounds: chlorogenic acid (peak 2) and rutin (peak 6).

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g001

Table 1. Phenolic compounds identified from the HPLC-DAD-MS/MS of the ethanolic extract of *Hancornia speciosa* leaves.

ID	RT [min]	Molecular Formula	[M-H] ⁻	Error PPM	MS/MS	Compound
1	0.8	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0565	-2.1	—	Quinic acid*
2	5.8	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	1.5	191.0556; 173.044; 161.0228	Chlorogenic acid*
3	8.1	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0704	-2.8	—	Catechin*
4	8.8	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.0967	-3.0	249.0615	Unknown
5	9.2	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	385.1132	-0.7	249.0578	Unknown
6	9.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1476	3.3	300.0303; 271.0251	Rutin*
7	9.6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0867	-2.1	300.0265	Isoquercetrin*
8	9.9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1494	-2.1	285.0393; 284.0313; 255.0291	Kaempferol-rutinoside
9	10.1	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1017	-2.7	341.0638; 231.0281; 217.0127; 189.0202; 177.0175	Unknown
10	10.6	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	435.1282	-3.4	273.0779; 167.0310	Catechin-pentoside

* identified by comparison with an authentic standard

doi:10.1371/journal.pone.0167531.t001

of a pentose to catechin. These fragmentation patterns allowed the characterization of this molecule as a catechin-pentoside derivative.

Antioxidant activity

Scavenging of DPPH free radicals. The EEHS had a higher DPPH free radical-scavenging activity than did the lipophilic antioxidant standard BHT; however, the scavenging activity of the EEHS was lower than that of the hydrophilic antioxidant standard ascorbic acid. The IC₅₀ of the EEHS was 7.1-fold lower than that of BHT and 3.2-fold higher than that of ascorbic acid. The maximum scavenging activity of the EEHS (in µg/mL) was 5-fold higher than that of ascorbic acid and 5-fold lower than that of BHT (Table 2).

Protective effect of the EEHS against AAPH-induced hemolysis. The protective effect against AAPH-induced hemolysis was evaluated for the EEHS. With regard to the protection against AAPH-induced hemolysis, ascorbic acid prevented erythrocyte hemolysis within 180 minutes in a concentration-dependent manner (Fig 2A–2C). The EEHS protected erythrocytes incubated with AAPH for up to 240 min and decreased hemolysis by 20.1% and 21.4% at concentrations of 100 µg/mL and 125 µg/mL, respectively (Fig 2A–2D).

Inhibition of malondialdehyde production. The antioxidant properties of the EEHS were also evaluated by determination of the inhibition of the production of MDA, which is the by-product of lipid peroxidation of erythrocyte membranes induced by AAPH. Treatment of erythrocytes with ascorbic acid and the EEHS at the lowest concentration able to inhibit hemolysis (100 µg/mL) for 3 h decreased the MDA levels by 88% and 63%, respectively, compared with the control group incubated with AAPH alone (Fig 3).

Antimicrobial activity

Minimum inhibitory concentration. Table 3 shows that the EEHS was effective against all of the microorganisms evaluated, including a gram-positive strain (*S. aureus*) and a gram-negative strain (*P. mirabilis*). However, it presented bacteriostatic and fungistatic activity against a gram-negative strain (*K. pneumoniae*) and the yeast *Candida albicans*, respectively. In addition, all ATCC strains were more sensitive to the action of the EEHS compared with hospital strains, except for *K. pneumoniae* and *C. albicans*, which showed the same MIC.

Fungal growth inhibition assay. The EEHS inhibited the growth of filamentous fungi and dermatophytes compared with the solvent (control). The filamentous fungal species most sensitive to the action of the EEHS was *M. piriformis*, which was inhibited at EEHS concentrations of 5 mg/mL and 10 mg/mL. The EEHS inhibited strains *F. culmorum* and *C. acutatum* only at the highest concentration evaluated (Fig 4A). The dermatophyte species most sensitive to the action of the EEHS was *M. canis*, which was inhibited at the concentrations of 5 mg/mL and 10 mg/mL. *M. audouinii* was sensitive to the 10 mg/mL concentration of the EEHS. At the concentrations tested, the EEHS did not affect the growth of *Trichophyton* sp. (Fig 4B).

Table 2. IC₅₀ of the ethanolic extract of *Hancornia speciosa* Gomes leaves (EEHS) compared with the antioxidant standards ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) along with the percentage of maximum scavenging activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

DPPH	IC ₅₀ (µg/mL)	Maximum Activity	
		%	µg/mL
Ascorbic acid	2.9 ± 0.8	96.6 ± 0.3	10
BHT	66.1 ± 23.6	95.1 ± 0.5	500
EEHS	9.4 ± 0.8	94.8 ± 0.8	50

doi:10.1371/journal.pone.0167531.t002

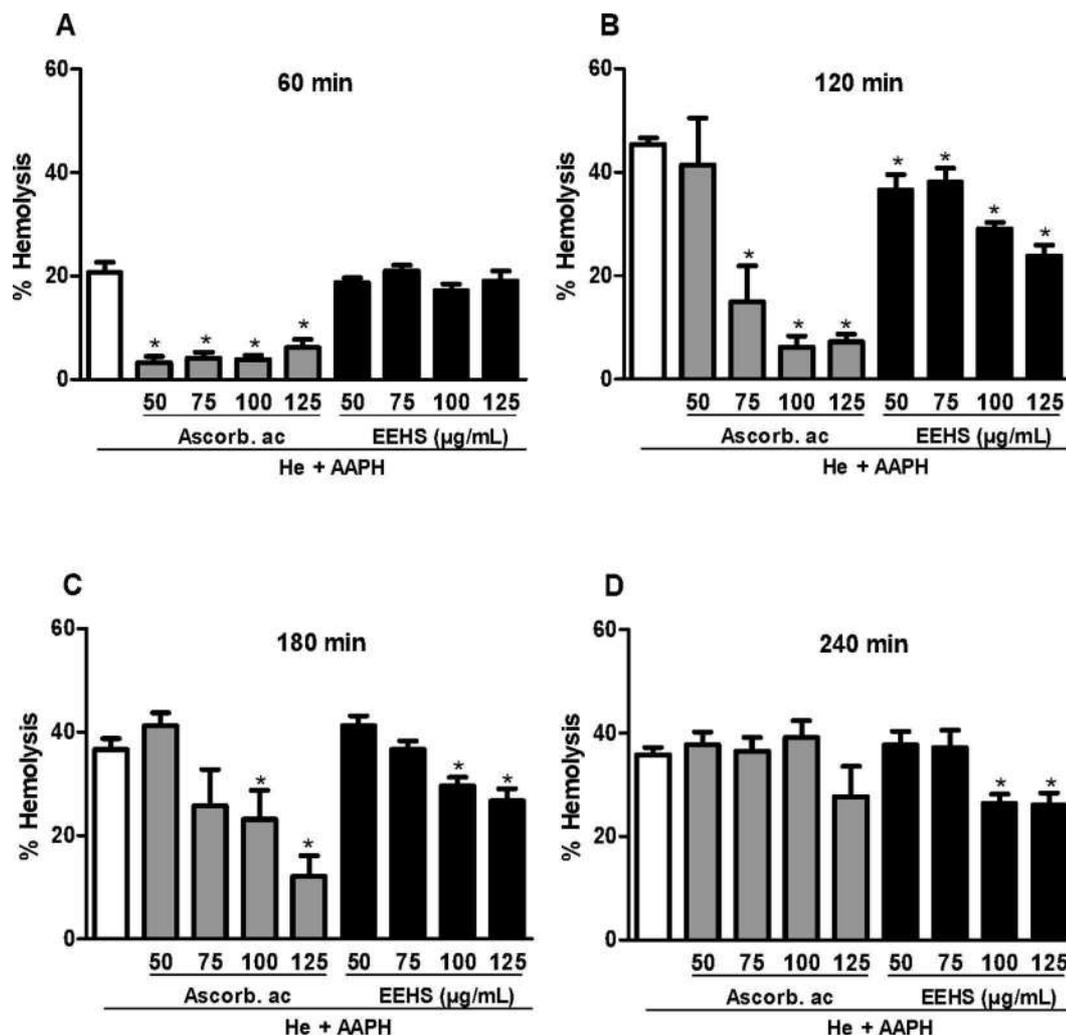


Fig 2. Effects of EEHS on the inhibition of hemolysis of human erythrocytes induced by AAPH. The groups were evaluated at (A) 60, (B) 120, (C) 180, and (D) 240 min of incubation. The controls consisted of an erythrocyte suspension (2.5%) incubated with AAPH alone. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ when the treated groups were compared with the AAPH group (erythrocytes incubated with AAPH alone) during the respective incubation periods.

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g002

Cytotoxic activity

Cell death profile. The evaluation of the cytotoxicity of the EEHS in Kasumi-1 cells labeled with annexin V-FITC/PI indicated a decrease in the viability of tumor cells in late apoptosis (Fig 5B and 5C) by 21.6% and 78.7% at concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the IC_{50} was 160 $\mu\text{g/mL}$ (Fig 5A).

Evaluation of the mitochondrial membrane potential. The analysis of the effects of the EEHS ($\text{IC}_{50} = 160 \mu\text{g/mL}$) on the mitochondrial membrane potential in Kasumi-1 cells in 24 h using the JC-1 fluorescent marker indicated a decrease in the potential by 98.4% (Fig 6A and 6B).

Effect of inhibitors on EEHS-induced cell death. The inhibitors E64 and NAC were effective in inhibiting the EEHS-induced death ($\text{IC}_{50} = 160 \mu\text{g/mL}$) of Kasumi-1 cells treated for 24 h. However, in this study, the apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK and necrosis inhibitor NEC-1 were ineffective in inhibiting cell death (Fig 7A and 7B).

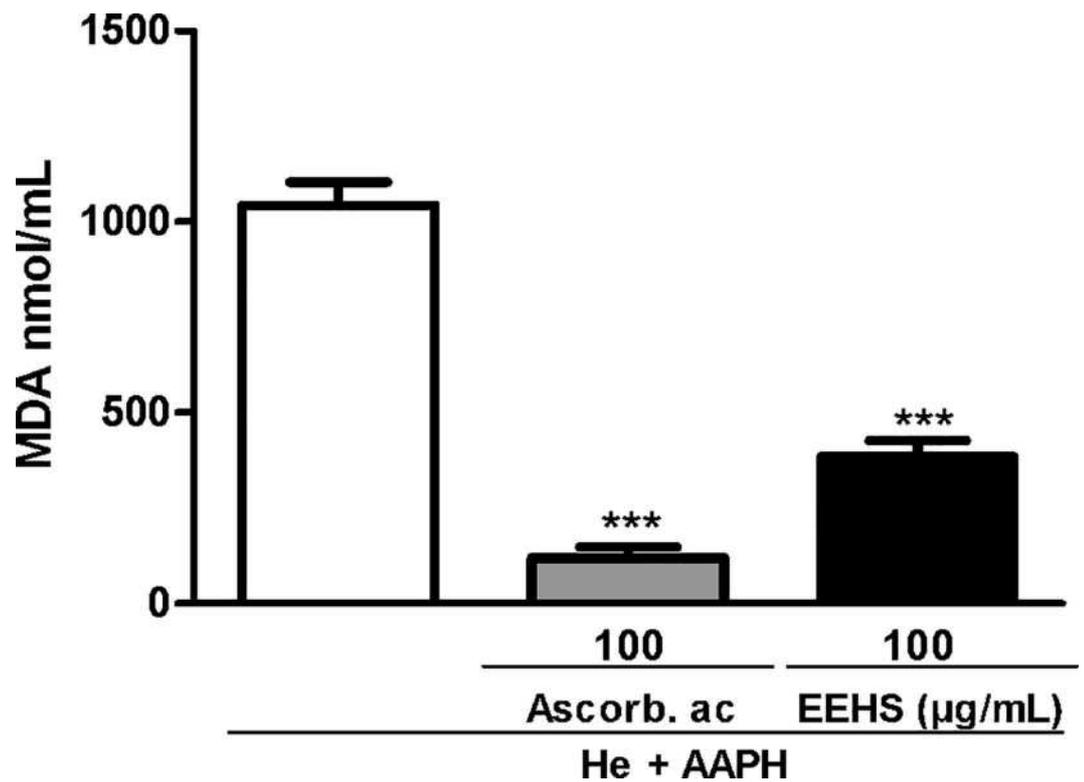


Fig 3. Effects of the EEHS on the inhibition of lipid peroxidation induced by AAPH. The control corresponds to erythrocytes incubated with AAPH alone. Values are expressed as the mean ± SEM of two independent experiments performed in duplicate. *** P < 0.001 when the treated groups were compared with the AAPH group (erythrocytes incubated with AAPH alone).

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g003

Discussion

Plant extracts are naturally occurring products with complex chemical compositions. These compounds are responsible for the biological activity of the extracts and can act alone or synergistically. Previous phytochemical studies with leaves of *H. speciosa* identified several

Table 3. Minimal inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum fungicidal concentration (MFC) of the EEHS and controls.

Microorganism	EEHS mg/mL		Gentamicin mg/mL		Amphotericin B mg/mL	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC	MIC	MFC
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	0.78	3.12	0.0312	0.0625	-	-
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933)	3.12	6.25	0.0625	0.0625	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	12.5	ND	0.00012	0.00012	-	-
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	6.25	ND	-	-	0.0020	>0.003
<i>S. aureus</i> (ESA)	3.12	6.25	0.125	0.125	-	-
<i>P. mirabilis</i> (ESA)	6.25	12.5	0.00049	0.00049	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (ESA)	12.5	ND	0.0039	0.0039	-	-
<i>C. albicans</i> (ESA)	6.25	ND	-	-	0.0021	>0.003

ATCC, American Type Culture Collection; ESA, Agricultural School, Bragança, Portugal.

ND, Not detected; -, Unvalued.

doi:10.1371/journal.pone.0167531.t003

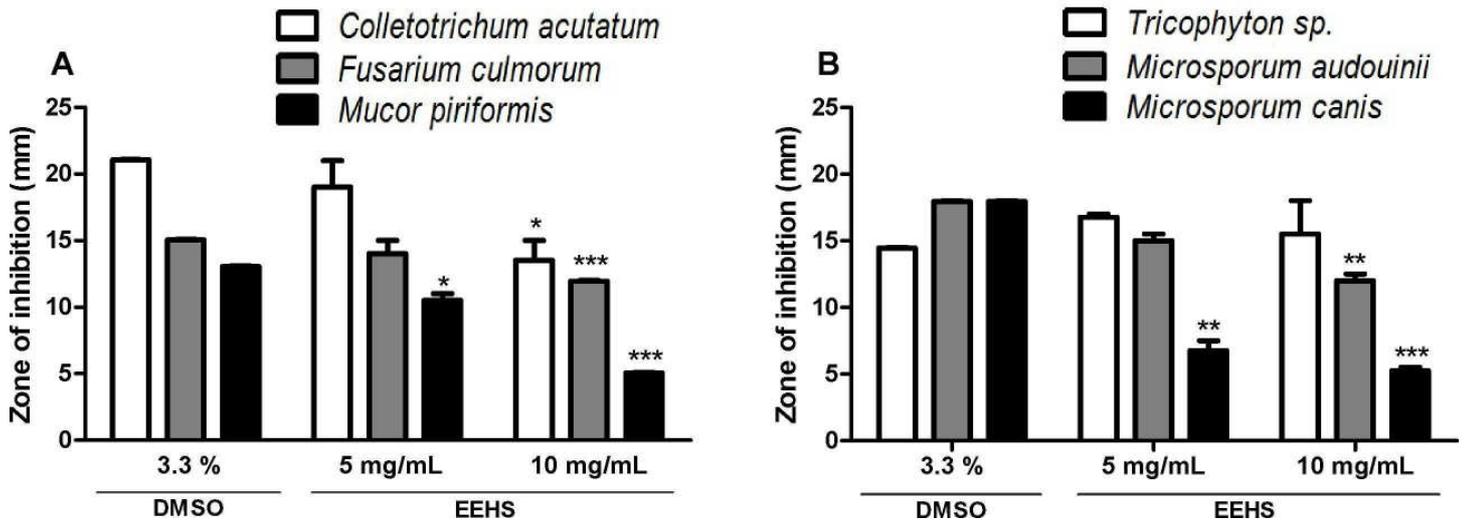


Fig 4. Zone of inhibition of filamentous fungi. Growth inhibition by the EEHS (5 mg/mL and 10 mg/mL) in the (A) filamentous fungal species *Colletotrichum acutatum* ESA12, *Fusarium culmorum* ESA23, and *Mucor piriformis* ESA43 and (B) dermatophytes *Microsporium canis* ESA28, *Microsporium audouinii*, and *Trichophyton* sp. (in mm). Values are expressed as the mean \pm SEM of duplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ when the treated groups were compared with the control group (3.3% DMSO).

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g004

compounds, including L-(+)-bornesitol, quinic acid, chlorogenic acid, and flavonoids derived from kaempferol and rutin [4,37,38,39]. In this study, several phenolic derivatives were identified in the UV spectrum of the EEHS (Fig 1), and rutin along with chlorogenic acid were the major compounds in the extract. The amounts of total flavonoids and phenolic compounds in natural products are important parameters to be considered when assessing the quality and biological potential of natural products [40]. In this study, the concentration of total phenolic compounds in the EEHS was higher than that in the extract of *H. speciosa* fruit [41]. Phenolic compounds are hydrogen donors capable of directly scavenging free radicals and reducing oxidative damage [42,43], which makes them potent antioxidants. In other medicinal plant extracts, these compounds also activated endogenous antioxidant systems and inhibited the lipid peroxidation of human erythrocytes [2, 44]. Among the phenolic compounds, flavonoids are the most prominent because of their potent antioxidant activity [45].

The analysis of the direct scavenging of free radicals indicated that the EEHS was more effective than BHT, a synthetic antioxidant used in a wide variety of food products [46] and cosmetics [47]. The free radical-scavenging capacity of the EEHS was higher than that of the extracts of *H. speciosa* fruit [41], which may be attributed to the higher concentration of phenolic compounds in the leaf extract. In addition, the effects of the antioxidant activity in a biological model *in vitro* were evaluated in human erythrocytes subjected to lipid peroxidation by the action of free peroxy radicals generated by the oxidizing agent AAPH. These radicals cause erythrocyte hemolysis via the oxidation of lipids and proteins of the cell membranes [48]. The EEHS demonstrated a sustained ability to protect against AAPH-induced hemolysis. The inhibition of lipid peroxidation was also determined by the quantification of the levels of MDA, which is a marker of oxidative damage to the lipids found in the erythrocyte membranes [49]. Umarani et al. [50] reported that the flavonoid rutin, also present in the EEHS, promoted the inhibition of lipid peroxidation in the heart tissue of rats subjected to oxidative stress. Henneberg et al. [51] reported the ability of rutin to sequester reactive oxygen species in human erythrocytes subjected to oxidative damage. Protection against lipid peroxidation promoted by the EEHS may be associated with its direct role in the scavenging of peroxy radicals

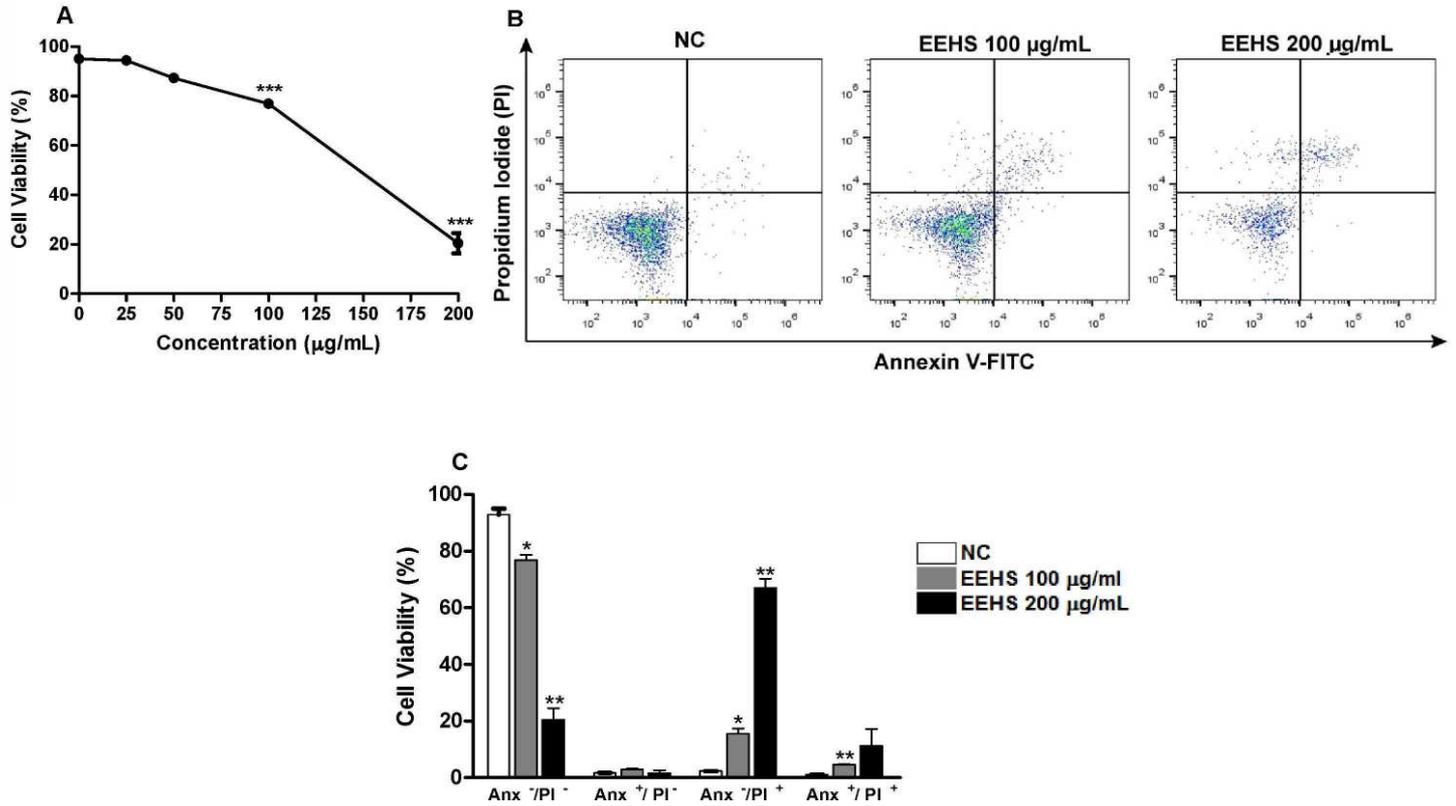


Fig 5. Cytotoxic activity of the EEHS in the acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1. (A) Concentration-response curve (25–200 µg/mL). (B) Dot plots indicating the flow cytometry data of cells stained with propidium iodide (PI) and annexin-V-FITC (An) treated with a negative control (NC), 100 µg/mL of the EEHS or 200 µg/mL of the EEHS. The lower left quadrant shows viable cells (An⁻/PI⁻); the lower right quadrant shows apoptotic cells (An⁺/PI⁻); the upper left quadrant shows cells undergoing necrosis (An⁻/PI⁺); and the upper right quadrant shows cells in late apoptosis (An⁺/PI⁺). (C) Percentage of cell death obtained from dot plots of cells treated with NC, 100 µg/mL of the EEHS, or 200 µg/mL of the EEHS. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 when the treated groups were compared with the control group.

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g005

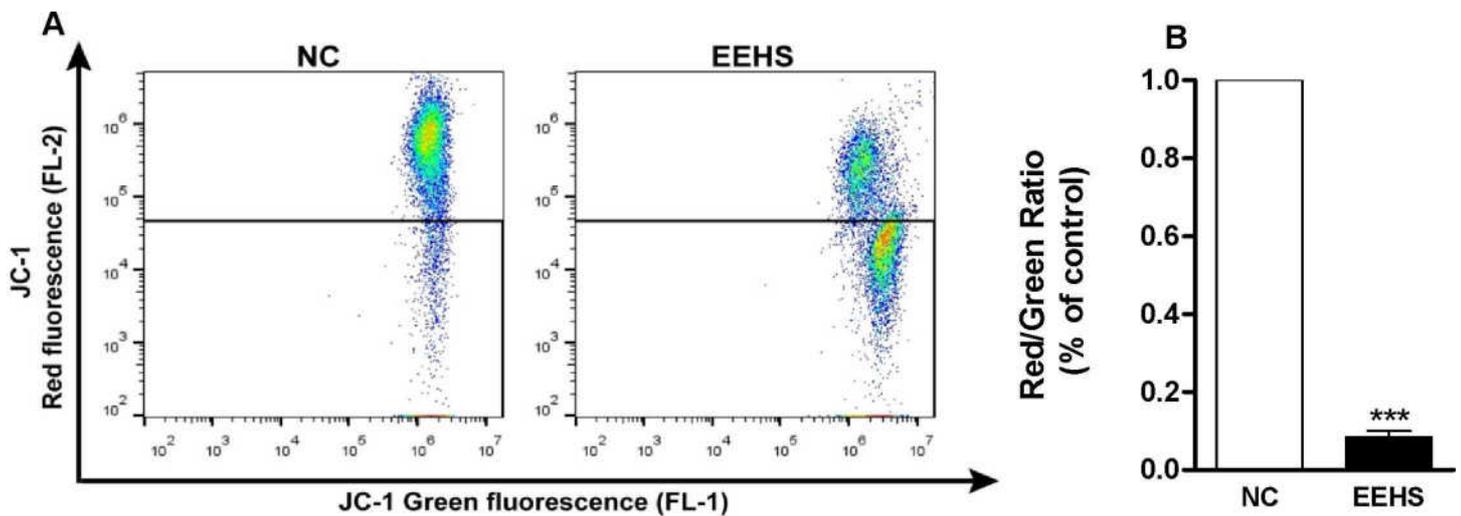


Fig 6. Estimation of the effect of the EEHS (160 µg/mL) on the mitochondrial membrane potential of the acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1 by flow cytometry. (A) Dot plots of flow cytometric data indicating the pattern of cell staining using JC-1 in green (FL-1) and red (FL-2). (B) Percentage of change of the mitochondrial membrane potential obtained from dot plots. *** P < 0.001 when the treated groups were compared with the control group.

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g006

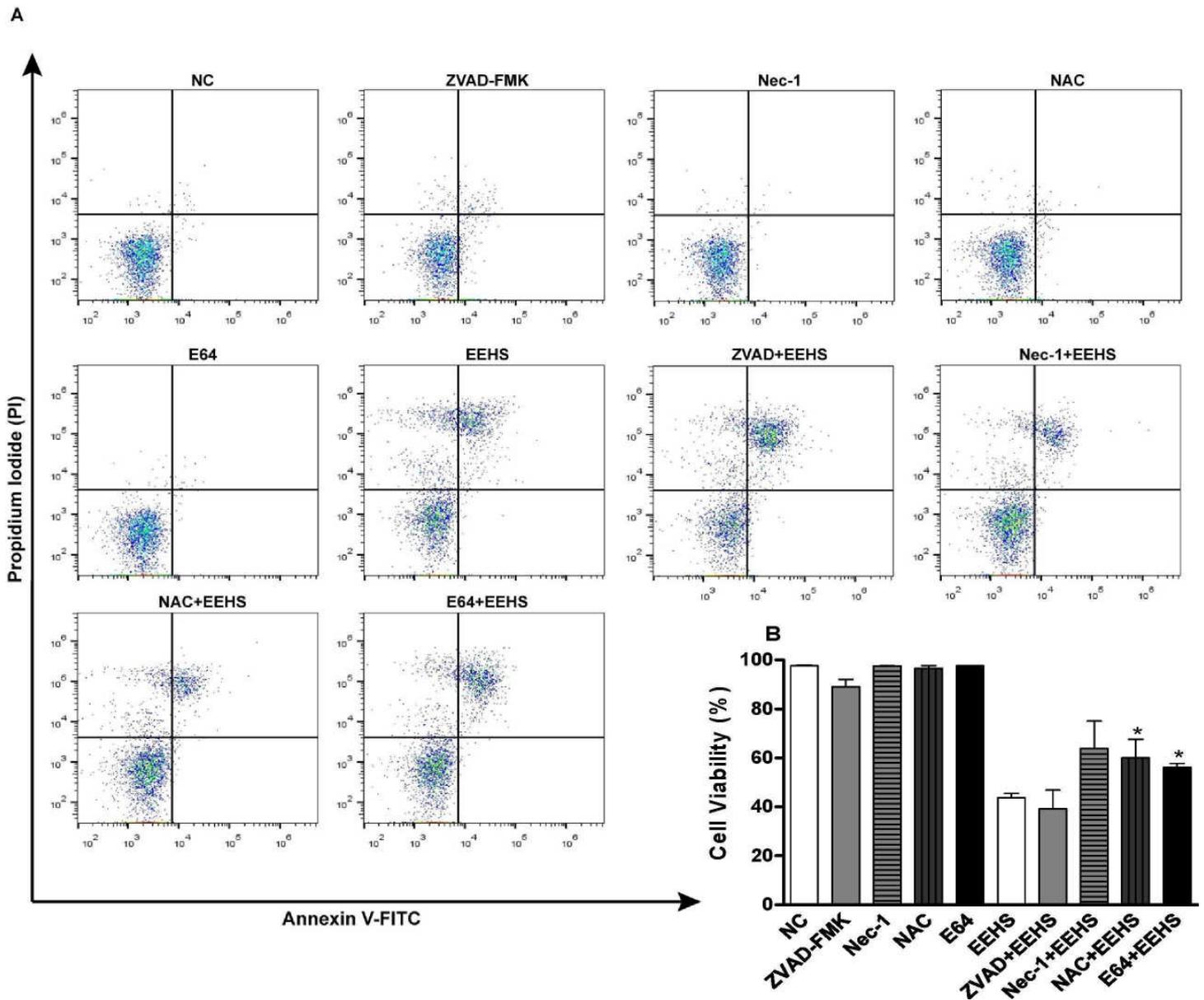


Fig 7. Cytotoxic activity of the EEHS in the acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1 in the presence of cell death inhibitors. (A) Dot plots of the flow cytometry data of cells stained with propidium iodide and annexin-V-FITC in the presence of inhibitors Z-VAD-FMK, Nec-1, NAC, or E64 and in the presence of the EEHS combined with each of these inhibitors. (B) Percentage of cell viability obtained from dot plots at the EEHS concentration of 160 µg/mL. * P < 0.05 when the treated groups were compared with the control group.

doi:10.1371/journal.pone.0167531.g007

or the modulation of endogenous antioxidant mechanisms, including the activation of the enzymes glutathione, catalase, and superoxide dismutase [2,48].

In addition to the antioxidant activity, phenolic compounds have antimicrobial activity via several mechanisms, including adsorption to and disruption of microbial membranes, ion deprivation, enzyme interaction, and interaction with membrane transporters [52,53,54].

Amin et al. [22] found that quercetin derivatives, such as those present in the EEHS, were active against methicillin-resistant *S. aureus* strains. Previous studies with extracts of *H. speciosa* bark reported antimicrobial activity against gram-positive bacteria (*S. aureus*) and gram-

negative bacteria (*H. pylori*) [3]. In this study, the EEHS presented antimicrobial activity against ATCC and hospital strains. The bactericidal action of the extract was observed against gram-positive and gram-negative bacteria. However, gram-negative bacteria are more resistant than gram-positive bacteria [55]. The bacterial cell wall, particularly in gram-negative bacteria, is an effective barrier against candidate drug molecules. This barrier is strongly polar and contains efflux pumps that act as a resistance mechanism, ejecting the compounds that pass through the outer membrane [56]. Al-Fatimi et al. [57] and Sahreen et al. [58] reported that plant extracts effective against gram-negative bacteria contained polar compounds that could interact with the chemical composition of the bacterial cell wall structure, thus promoting its effects.

The EEHS also presented fungistatic activity against the yeast *C. albicans* and inhibited the growth of filamentous fungi as well as dermatophytes. The presence of condensed tannins in the EEHS, particularly catechins, may explain the observed antifungal activity because these compounds can inactivate adhesion proteins, transporters, and enzymes [52].

Fungi promote superficial infections, which are common in elementary school children [59], and invasive infections, which are considered one of the leading causes of morbidity and mortality in immunocompromised patients [60]. The opportunistic nature of these infections increases the risk of infections in patients with prolonged neutropenia, lymphopenia, bone marrow transplants, and diabetes as well as those treated with corticosteroids [61].

Plants with antimicrobial activity also present cytotoxic activity by promoting death in various tumor cell lines [62] via different mechanisms. The primary routes of cell death are apoptosis, autophagy, and necrosis, and deaths by apoptosis and autophagy are considered programmed cell death mechanisms, whereas necrosis is considered an unregulated cell death mechanism [63]. However, cell death by necrosis may be regulated by a process known as necroptosis [64]. Previous studies indicated that the extracts of leaves, branches, fruit, and fruit latex of *H. speciosa* presented low toxicities towards the human tumor cell lines HCT-8 (colon carcinoma), MDA-MB-435 (melanoma), and SF-295 (glioblastoma) [65]. Moreover, our results indicated that the EEHS was effective in acute myeloid leukemia cells, and the cytotoxic activity was concentration-dependent and mediated by apoptosis. Martin et al. [66] found that the presence of phosphatidylserine in cell death assays with annexin V-FITC is considered an early event of apoptosis. Cell labeling with propidium iodide, which binds to DNA, is only observed during membrane damage, which occurs in late apoptosis or early necroptosis [67]. The flavonoids that are catechin and quercetin derivatives have potent cytotoxic activities and cause apoptosis using mitochondrial pathways in human leukemic cell lines, including monocytic leukemia (U937), erythroleukemia (K562), and promyelocytic leukemia (HL-60) [25]. Therefore, the presence of flavonoids in the EEHS can be directly associated with the cytotoxicity of the extract.

The EEHS decreased the mitochondrial membrane potential. Similarly, previous studies on cell viability reported the apoptotic activity of plant extracts in leukemic cell lines via reduction of the mitochondrial membrane potential [2,31,68].

Mitochondria-mediated apoptosis occurs in response to various death stimuli, including activation of tumor suppressor proteins and oncogenes, DNA damage, chemotherapeutic agents, nutritional deprivation, and ultraviolet radiation [69]. In these cases, apoptosis can occur via the intrinsic (mitochondrial-mediated) or extrinsic apoptotic pathways, both of which are caspase-dependent. Moreover, *in vitro* studies demonstrated that caspase-independent apoptosis can be regulated by lysosomes and endoplasmic reticulum [70]. Assessing the mechanism by which the EEHS promoted cell death, using cell death inhibitors, indicated the involvement of cysteine proteases (cathepsins). These results suggest that the EEHS promotes apoptosis via cathepsins because these enzymes induce apoptosis of tumor cells in a caspase-

dependent and caspase-independent manner [71]. The EEHS promoted caspase-independent apoptosis considering that the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK did not inhibit the cytotoxic activity of the extract. Cathepsins can also promote apoptosis by directly causing catalysis and proteolytic degradation of various substrates involved in cell death [72,73,74]. Antitumor agents such as vincristine, a naturally occurring alkaloid identified and isolated from plants of the genus *Vinca*, induce changes in the permeability of the lysosomal membrane and promote the release of cathepsins into the cytoplasm [75, 76]. Lysosomal cathepsins can act directly in the mitochondria by stimulating the release of cytochrome C and producing reactive oxygen species. The latter has direct and indirect effects on lysosomes [77] and causes progressive destabilization of the membranes of intracellular organelles, including lysosomes and mitochondria [78]. In this context, the EEHS strongly decreased the mitochondrial membrane potential and formation of reactive oxygen species, as shown by the inhibition of cell death using NAC, an inhibitor of these molecules.

Together, these results indicate that phenolic acids and flavonoids are present in the EEHS extract, and the antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of these compounds in acute myeloid leukemia cells are mediated by apoptosis via a decrease in the mitochondrial potential and cathepsin activation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and PRODER, (24.073 – Â, Portugal). E.L.S.; E.J.P.G e C.A.L.C., were recipient of fellowship from CNPq, Brazil.

Author Contributions

Conceptualization: UPS JFC HFVT EJPG CAC LME KPS ELS.

Data curation: EJPG CAC LME KPS ELS.

Formal analysis: UPS JFC HFVT EJPG CAC LME KPS ELS.

Funding acquisition: EJPG CAC LME KPS ELS.

Investigation: UPS JFC HFVT EJPG CAC LME KPS ELS.

Methodology: UPS JFC HFVT EJPG CAC LME KPS ELS.

Project administration: ELS.

Resources: EJPG CAC LME KPS ELS.

Supervision: EJPG CAC LME KPS ELS.

Validation: UPS JFC HFVT EJPG CAC LME KPS ELS.

Visualization: UPS KPS ELS.

Writing – original draft: UPS JFC EJPG CAC LME KPS ELS.

Writing – review & editing: UPS JFC EJPG CAC LME KPS ELS.

References

1. Oliveira PS, Marquis RJ. The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press, New York; 2002.

2. Casagrande JC, Macorini LF, Antunes KA, Santos UP, Campos JF, Dias-Júnior NM, Sangalli A, et al. Antioxidant and Cytotoxic Activity of Hydroethanolic Extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. PLoS ONE. 2014; 9 (11): e112748 doi: [10.1371/journal.pone.0112748](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112748) PMID: [25402205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25402205/)
3. Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. Journal of Ethnopharmacology. 2008; 120: 161–168. doi: [10.1016/j.jep.2008.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.001) PMID: [18761076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18761076/)
4. Pereira AC, Pereira AB, Moreira CC, Botion LM, Lemos VS, Braga FC, et al. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. J Ethnopharmacol. 2015; 161: 30–5. doi: [10.1016/j.jep.2014.11.050](https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.050) PMID: [25500300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25500300/)
5. da Silva AO, Damaceno Alves A, Almeida DA, Balogun SO, de Oliveira RG, Aires Aguiar A, et al. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg.J Ethnopharmacol. 2014a; 154 (2): 319–29.
6. da Silva MDB, Reichert CL, de Andrade LF, de Moraes Santos CA, Weffort-Santos AM. Cytotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. J Ethnopharmacol. 2014b; 157: 243–50.
7. Hirschmann GS, Arias AR. A survey of medicinal plants of Minas Gerais. Brazil. J. Ethnopharmacol. 1990; 29: 159–172. PMID: [2374429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2374429/)
8. Grandi TMS, Trindade JA, Pinto MJF, Ferreira LL, Catella AC. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. Acta Bot. Bras. 1989; 3 (2): 185–224.
9. Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande—Minas Gerais. Cienc. Agrotec. 2001; 25 (1): 102–123.
10. Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. J Ethnopharmacol. 2011; 135: 530–7. doi: [10.1016/j.jep.2011.03.059](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.059) PMID: [21463669](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21463669/)
11. Silva GC, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, Lemos VS, Cortes SF. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. J. Ethnopharmacol. 2011; 137: 709–13. doi: [10.1016/j.jep.2011.06.031](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.031) PMID: [21756990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21756990/)
12. Ferreira HC, Serra CP, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol 3-kinase. Journal of Ethnopharmacology. 2007a; 109: 161–164.
13. Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. Phytomedicine. 2007b; 14: 473–478.
14. Endringer DC, Valadares M, Campana PRV, Campos JJ, Guimarães KG, Pezzuto JM, et al. Evaluation of Brazilian Plants on Cancer Chemoprevention Targets In Vitro. Phytother. Res. 2010; 24: 928–933. doi: [10.1002/ptr.3050](https://doi.org/10.1002/ptr.3050) PMID: [19957245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19957245/)
15. Geller FC, Teixeira MR, Pereira AB, Dourado LP, Souza DG, Braga FC, et al. Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. Phytother Res. 2015; 12: 1887–93.
16. Rizzo JA, Monteiro MSR, Bitencourt C. Utilização de plantas medicinais em Goiânia. In: Congresso Nacional de Botânica, Anais. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil. 1990; 2: 691–707.
17. Sofi FR, Raju CV, Lakshmisha IP, Singh RR. Antioxidant and antimicrobial properties of grape and papaya seed extracts and their application on the preservation of Indian mackerel (*Rastrelliger kana-gurta*) during ice storage. J Food Sci Technol. 2016; 53 (1): 104–17. doi: [10.1007/s13197-015-1983-0](https://doi.org/10.1007/s13197-015-1983-0) PMID: [26787935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26787935/)
18. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. 2006; 97 (4): 654–660.
19. Wannas WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, et al. Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. Food and Chemical Toxicology. 2010; 48 (5): 1362–1370. doi: [10.1016/j.fct.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002) PMID: [20211674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20211674/)
20. Li T, Chen S, Feng T, Dong J, Li Y, Li H. Rutin protects against aging-related metabolic dysfunction. Food Funct. 2015; 7 (2): 1147–54.
21. Yu XL, Li YN, Zhang H, Su YJ, Zhou WW, Zhang ZP, et al. Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. Food Funct. 2015; 6 (10): 3296–306. doi: [10.1039/c5fo00500k](https://doi.org/10.1039/c5fo00500k) PMID: [26242245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26242245/)
22. Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2015; 15: 59 doi: [10.1186/s12906-015-0580-0](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0580-0) PMID: [25879586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879586/)
23. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. Journal of natural products. 2016; 79 (3): 629–661. doi: [10.1021/acs.jnatprod.5b01055](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055) PMID: [26852623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26852623/)

24. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015; 20 (5): 8856–74 doi: [10.3390/molecules20058856](https://doi.org/10.3390/molecules20058856) PMID: [25993417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25993417/)
25. Roy S, Banerjee B, Vedasiromoni JR. Cytotoxic and apoptogenic effect of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. leaf extract in human leukemic cell lines U937, K562 and HL-60. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 37 (1): 234–47. doi: [10.1016/j.etap.2013.11.008](https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.11.008) PMID: [24366058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366058/)
26. Joray MB, Trucco LD, González ML, Napal GN, Palacios SM, Bocco JL, et al. Antibacterial and Cytotoxic Activity of Compounds Isolated from *Flourensia oolepis*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015: 912484 doi: [10.1155/2015/912484](https://doi.org/10.1155/2015/912484) PMID: [26819623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26819623/)
27. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*. 2005; 91: 571–577.
28. Liberio SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJAM, Mattar NS, et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern. Med*. 2011; 11: 1–10.
29. Gupta D, Gupta RK. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complement Altern. Med*. 2011; 11: 1–9.
30. Valente MJ, Baltazar AF, Henrique R, Estevinho L, Carvalho M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem. Toxicol*. 2011; 49: 86–92. doi: [10.1016/j.fct.2010.10.001](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.001) PMID: [20934479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20934479/)
31. Campos JF, dos Santos UP, Macorini LF, de Melo AM, Balestieri JB, Paredes-Gamero EJ, et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of própolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 65: 374–380. doi: [10.1016/j.fct.2014.01.008](https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008) PMID: [24412556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412556/)
32. Feás X, Estevinho LM, Salinero C, Vela P, Sainz MJ, Vázquez-Tato MP, et al. Triacylglyceride, Antioxidant and Antimicrobial Features of Virgin *Camellia oleifera*, *C. reticulata* and *C. sasanqua* Oils. *Molecules*. 2013; 18: 4573–4587 doi: [10.3390/molecules18044573](https://doi.org/10.3390/molecules18044573) PMID: [23599015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23599015/)
33. Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol*. 2011; 49: 1096–1101. doi: [10.1016/j.fct.2011.01.020](https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020) PMID: [21291944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21291944/)
34. Akintobi OA, Adejuwon AO, Olawale AK. Antimicrobial Evaluation of the Stem Bark Extracts of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Ex G. Don. Report and Opinion*. 2013; 5 (10): 41–45.
35. Paredes-Gamero EJ, Martins MNC, Cappabianco FAM, Ide JS, Miranda A. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1820: 1062–1072. doi: [10.1016/j.bbagen.2012.02.015](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.02.015) PMID: [22425533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22425533/)
36. Moraes VW, Cairas AC, Paredes-Gamero EJ, Rodrigues T. Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death and Disease*. 2013; 4: e658 doi: [10.1038/cddis.2013.190](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.190) PMID: [23744358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23744358/)
37. Endringer DC, Pezzuto JM, Soares CM, Braga FC. L-(+)-Bornesitol. *Acta Crystallographica. Section E: Structure Reports Online*. 2007; 63: o1067–o1068.
38. Endringer DC, Pezzuto JM, Braga FC. NF-B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. *Phytomedicine*. 2009; 16 1064–1069. doi: [10.1016/j.phymed.2009.03.022](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.03.022) PMID: [19423310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19423310/)
39. Pereira AB, Veríssimo TM, Oliveira MA, Araujo IA, Alves RJ, Braga FC. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012; 887–888:133–7. doi: [10.1016/j.jchromb.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.009) PMID: [22333437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22333437/)
40. Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem. Toxicol*. 2008; 46: 3482–3485. doi: [10.1016/j.fct.2008.08.025](https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025) PMID: [18804144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804144/)
41. Almeida MMB, Sousa PHM, Arriaga AMC, Prado GM, Magalhães CEC, Maia GA, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*. 2011; 44 (7): 2155–2149.
42. Kesharwani RK, Singh DV, Misra K, Rizvi SI. Plant polyphenols as electron donors for erythrocyte plasma membrane redox system: validation through in silico approach. *Org Med Chem Lett*. 2012; 2:12. doi: [10.1186/2191-2858-2-12](https://doi.org/10.1186/2191-2858-2-12) PMID: [22475026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22475026/)
43. Wintola OA, Afolayan AJ. The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora africana* Thunb. used as antidiarrheic in Eastern Cape Province, South Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 15:307 doi: [10.1186/s12906-015-0835-9](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0835-9) PMID: [26335685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26335685/)

44. Ribeiro AB, Berto A, Ribeiro D, Freitas M, Chisté RC, Visentainer JV, et al. Stem bark and flower extracts of *Vismia cauliflora* are highly effective antioxidants to human blood cells by preventing oxidative burst in neutrophils and oxidative damage in erythrocytes. *Pharm Biol.* 2015; 53 (11): 1691–8. doi: [10.3109/13880209.2014.1001407](https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1001407) PMID: [25868622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25868622/)
45. Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2013; 22 (8): 1063–79. doi: [10.1517/13543784.2013.805744](https://doi.org/10.1517/13543784.2013.805744) PMID: [23795677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23795677/)
46. Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessments of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem. Toxicol.* 1999; 37 (9–10): 1027–38. PMID: [10541460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10541460/)
47. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. *Handbook of pharmaceutical excipients.* 5th ed. London: Pharmaceutical Press; 2006.
48. Zou CG, Agar NS, Jones GL. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sci.* 2001; 69: 75–86. PMID: [11411807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11411807/)
49. Haider L, Fischer MT, Fischer JM, Bauer J, Hoftberger R. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011; 134: 1914–1924 doi: [10.1093/brain/awr128](https://doi.org/10.1093/brain/awr128) PMID: [21653539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21653539/)
50. Umarani V, Muvvala S, Ramesh A, Lakshmi BV, Sravanthi N. Rutin potentially attenuates fluoride-induced oxidative stress-mediated cardiotoxicity, blood toxicity and dyslipidemia in rats. *Toxicol Mech Methods.* 2015; 25 (2): 143–9. doi: [10.3109/15376516.2014.1003359](https://doi.org/10.3109/15376516.2014.1003359) PMID: [25560802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25560802/)
51. Henneberg R, Otuki MF, Furman AE, Hermann P, do Nascimento AJ, Leonart MS. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013; 35 (1): 52–5. doi: [10.5581/1516-8484.20130015](https://doi.org/10.5581/1516-8484.20130015) PMID: [23580885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580885/)
52. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12 (4): 564–582. PMID: [10515903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10515903/)
53. Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 306 (2): 530–6. PMID: [12804597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12804597/)
54. Favela-Hernández JM, Clemente-Soto AF, Balderas-Rentería I, Garza-González E, Camacho-Corona Mdel R. Potential Mechanism of Action of 3'-Demethoxy-6-O-demethyl-isoguaiacin on Methicillin Resistant *staphylococcus aureus*. *Molecules.* 2015; 20 (7): 12450–8.
55. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules.* 2009; 14 (2): 586–97. doi: [10.3390/molecules14020586](https://doi.org/10.3390/molecules14020586) PMID: [19214149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19214149/)
56. Brown DG, Lister T, May-Dracka TL. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2014; 24: 413–418.
57. Al-Fatimi M, Wurster M, Schroder G, Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111: 657–666. doi: [10.1016/j.jep.2007.01.018](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.018) PMID: [17306942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17306942/)
58. Sahreen S, Khan MR, Khan RA, Shah NA. Estimation of flavonoids, antimicrobial, antitumor and anticancer activity of *Carissa opaca* fruits. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 13: 372. doi: [10.1186/1472-6882-13-372](https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-372) PMID: [24373124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24373124/)
59. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2008; 51 (4): 2–15
60. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37 (9): 1172–1177. doi: [10.1086/378745](https://doi.org/10.1086/378745) PMID: [14557960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14557960/)
61. The Japanese Mycology Study Group, editor. *Guidelines for management of deep-seated mycoses 2007.* Tokyo: Kyowa Kikaku; 2007.
62. Bardaweel SK, Hudaib MM, Tawaha KA, Bashatwah RM. Studies on the *In Vitro* Antiproliferative, Antimicrobial, Antioxidant, and Acetylcholinesterase Inhibition Activities Associated with *Chrysanthemum coronarium* Essential Oil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2015; *eCAM.* 2015: 790838. doi: [10.1155/2015/790838](https://doi.org/10.1155/2015/790838) PMID: [26290675](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26290675/)
63. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation.* 2007; 14: 1237–1243 doi: [10.1038/sj.cdd.4402148](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148) PMID: [17431418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17431418/)
64. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009; 137:1112–1123 doi: [10.1016/j.cell.2009.05.037](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037) PMID: [19524513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19524513/)

65. Ribeiro SS, Jesus AM, Anjos CS, Silva TB, Santos ADC, Jesus JR, et al. Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. *Planta Med.* 2012; 78: 1601–1606. doi: [10.1055/s-0032-1315043](https://doi.org/10.1055/s-0032-1315043) PMID: [22814822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814822/)
66. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995; 182: 1545–1556. PMID: [7595224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7595224/)
67. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods.* 2015 Aug; 423:99–103. doi: [10.1016/j.jim.2015.04.025](https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.025) PMID: [25975759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25975759/)
68. Campos JF, Dos Santos UP, da Rocha Pdos S, Damião MJ, Balestieri JB, Cardoso CA, et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015; 2015: 296186. doi: [10.1155/2015/296186](https://doi.org/10.1155/2015/296186) PMID: [26185516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26185516/)
69. Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat. Struct.* 2001; 8: 394–401.
70. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005; 11: 725–730. doi: [10.1038/nm1263](https://doi.org/10.1038/nm1263) PMID: [16015365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16015365/)
71. Kaznelson DW, Bruun S, Monrad A, Gjerløv S, Birk J, Röpke C, et al. Simultaneous human papilloma virus type 16 E7 and CDK inhibitor p21 expression induces apoptosis and cathepsin B activation. *Virology.* 2004; 320 (2): 301–312. doi: [10.1016/j.virol.2003.12.018](https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.018) PMID: [15016552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15016552/)
72. Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 3149–3157. doi: [10.1074/jbc.M008944200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008944200) PMID: [11073962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11073962/)
73. Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG. Characterization of the necrotic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.* 2001; 8: 588–594. doi: [10.1038/sj.cdd.4400851](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400851) PMID: [11536009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11536009/)
74. Foghsgaard L, Lademann U, Wissing D, Poulsen B, Jaattela M. Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 39499–39506. doi: [10.1074/jbc.M206669200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206669200) PMID: [12185082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12185082/)
75. Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S. Introduction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102 (1): 192–197. doi: [10.1073/pnas.0408592102](https://doi.org/10.1073/pnas.0408592102) PMID: [15618392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15618392/)
76. Groth-Pedersen L, Ostefeld MS, Høyer-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M. Vincristine Induces Dramatic Lysosomal Changes and Sensitizes Cancer Cells to Lysosome-Destabilizing Siramesine. *Cancer Res.* 2007; 67 (5): 2217–25. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-06-3520](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3520) PMID: [17332352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17332352/)
77. Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 3778–3786. PMID: [12950261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12950261/)
78. Zhao M, Brunk UT, Eaton JW. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.* 2001; 509 (3): 399–404. PMID: [11749963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11749963/)

Research Article

Physicochemical Characterization, Microbiological Quality and Safety, and Pharmacological Potential of *Hancornia speciosa* Gomes

Uilson Pereira dos Santos,¹ Georgina S. Tolentino,² Jorge Sá Morais,²
Kely de Picoli Souza ¹, Leticia M. Estevinho ² and Edson Lucas dos Santos ¹

¹Research Group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

²CIMO-Mountain Research Centre, Agricultural College of Bragança, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Santa Apolónia, Bragança, Portugal

Correspondence should be addressed to Edson Lucas dos Santos; edsonsantosphd@gmail.com

Received 24 November 2017; Revised 13 March 2018; Accepted 16 April 2018; Published 28 June 2018

Academic Editor: Aramati B. M. Reddy

Copyright © 2018 Uilson Pereira dos Santos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hancornia speciosa Gomes is a fruit tree, commonly known as the mangaba tree, which is widespread throughout Brazil. The leaves of this plant are used in traditional medicine for medicinal purposes. Thus, the objective of this study was to perform a physicochemical characterization, identify the lipophilic antioxidants and fatty acids, and determine the microbiological quality and safety of *H. speciosa* leaves. In addition, the antioxidant, antimutagenic, and inhibitory activities of the ethanolic extract of *H. speciosa* leaves (EEHS) against enzymes related to neurodegenerative diseases, inflammation, obesity, and diabetes were investigated. Furthermore, this study aimed at assessing the *in vivo* effects of the EEHS on the glycemia of normoglycemic and diabetic Wistar rats. Physicochemical characterization was performed by colorimetry and gas-liquid chromatography with flame ionization detection (GC-FID). The total number of colonies of aerobic mesophiles, molds, and yeasts was determined. The total coliforms and *Escherichia coli* were counted using the SimPlates kit, and sulphite-reducing *Clostridium* spores were quantified using the sulphite-polymyxin-sulfadiazine agar method. *Salmonella* spp. were detected using the 1-2 Test. The antioxidant activity of the EEHS was measured by its inhibition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride- (AAPH-) induced oxidative hemolysis of human erythrocytes. The antimutagenic activity was determined using the Ames test. The acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase, hyaluronidase, lipase, α -amylase, and α -glycosidase enzyme-inhibiting activities were assessed and compared with commercial controls. The *in vivo* effects of the EEHS were assessed using the oral glucose tolerance test in normoglycemic Wistar rats and measuring the blood glucose levels in diabetic rats. The results demonstrated physical-chemical parameters of microbiological quality and safety in the leaves of *H. speciosa*, as well as antioxidant and antimutagenic activities and inhibition of enzymes related to neurodegenerative diseases, inflammation, obesity, and diabetes. In *in vivo* assays, it was shown that the normoglycemic rats challenged with glucose overload show significantly decreased blood glucose levels when treated with the EEHS. Taken together, the results ensure the microbiological quality and safety as well as showing the contents of carotenoids and polyunsaturated fatty acids of *H. speciosa* leaves. Additionally, the antioxidant, antimutagenic, anti-inflammatory, anti-Alzheimer's disease, anti-Parkinson's disease, antiobesity, and antihyperglycemic activities of the EEHS were demonstrated.

1. Introduction

In different cultures worldwide, medicinal plants are used for therapeutic purposes. Although the microbiological quality

of these materials is still rarely discussed, it is essential to achieve the expected pharmacological outcomes. Plant materials for medicinal purposes need to have acceptable microbial contamination levels and no deterioration or

pathogenic microorganisms [1]. These basic criteria must be assessed and followed to obtain plant samples with quality, safety, and therapeutic efficacy [2, 3].

In Brazil, several plants are used in traditional medicine, including *Hancornia speciosa* Gomes (*H. speciosa*). This fruit tree, commonly known as the mangaba tree, belongs to the Apocynaceae family, and its leaves are sold as tea [4]. This species is native to Brazil and is found in the Amazonia, Caatinga, and Atlantic forests as well as the Cerrado (Brazilian savannah) biomes.

The antioxidant, antimicrobial, cytotoxic [4], anti-inflammatory [5, 6], wound-healing [6], vasodilation [7, 8], antihypertensive [9, 10], antidiabetic [11], and acetylcholinesterase-inhibiting [12] activities of *H. speciosa* leaves have been described. Previously reported phytochemical studies with *H. speciosa* leaf extracts showed a complex chemical composition. The identified chemical constituents that were related to the biological activities include L-(+)-bornesitol, quinic acid, chlorogenic acid, and kaempferol, quercetin, isoquercetin, rutin, and catechin flavonoids [4, 5, 11, 13, 14]. Recently, Bastos et al. [15] identified other phenolic compounds, including caffeic acid, protocatechuic acid isomers, epicatechin, quercetin isomers, type-B and type-C procyanidins, coumaroylquinic acid isomers, phlorizin, phloretin, eriodictyol, luteolin, and apigenin. Natural extracts and phenolic derivatives with pharmacological potential may serve as a safe and cost-effective treatment strategy as an alternative to synthetic drugs [16–19].

Plants are sources of biologically active compounds that are used by approximately 80% of the world's population, either as tea or as pharmaceutical drugs [20]. Furthermore, natural products or derivatives play a key role in the process of the development and discovery of new compounds or drugs [21]. Over the past three decades, drugs developed from natural products have been prominent because among the drugs available for treatment, 50% for Alzheimer's disease, 8% for Parkinson's disease, 27% for inflammation, 16% for obesity, and 57% for diabetes are derived directly or indirectly from natural products [21].

Thus, the objective of this study was to perform a physicochemical characterization, identify the lipophilic antioxidants and fatty acids, and determine the microbiological quality and safety of *H. speciosa* leaves. In addition, the antioxidant, antimutagenic, and inhibitory activities against enzymes related to neurodegenerative diseases, inflammation, obesity, and diabetes of the ethanolic extract of *H. speciosa* leaves (EEHS) were investigated. Furthermore, this study aimed to assess the *in vivo* effects of the EEHS on the glycemia of normoglycemic and diabetic Wistar rats.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Ethanol Extract Preparation. *H. speciosa* leaves were collected after identifying the plant and receiving permission from the Brazilian Biodiversity Authorization and Information System (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, SISBIO; number 54470-1).

The plant material was collected in Dourados, Mato Grosso do Sul State (21° 59' 41" south and 55° 19' 24" west), Brazil, dried in a convection oven at a temperature of 45 ± 5°C, and ground in a Wiley knife mill. A voucher specimen was deposited in the herbarium of the Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil, under record number 4774. The extract was prepared by macerating the plant material in 96% ethanol (1:10, *w/v*). The mixture was kept at room temperature for 14 days. Subsequently, the extract was filtered, concentrated in a rotary evaporator under vacuum (Gehaka, São Paulo, SP, Brazil), and freeze-dried. The EEHS had a final yield of 28% and was stored at -20°C in the dark. The flavonoids rutin, catechin, and isoquercetin, previously identified in the EEHS by high-performance liquid chromatography with diode-array detection-tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-MS/MS) [4] and used in this study, were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Physicochemical Analysis

2.2.1. Ash Content. The method used to determine the ash content of *H. speciosa* leaves consisted of desiccating 250 mg of leaf samples. The test was performed in triplicate, and the result is expressed as g/100 g of sample [22].

2.2.2. Total Protein Content. The protein content was determined using the Kjeldahl method (230-Kjeltec Analyzer, Foss Tecator, Höganäs, Sweden), as described by Nogueira et al. [23]. The protein concentration was determined by multiplying the value of the total nitrogen by the factor 5.75 ($P_{\text{protein}} = N_{\text{nitrogen}} \times 5.75$). The test was performed in triplicate, and the result is expressed as g/100 g of sample.

2.2.3. Total Lipids. The crude fat was determined by gravimetry after extraction with petroleum ether using an automatic Soxtec device (FOSS, Soxtec™ 2050, Höganäs, Sweden) [22]. The test was performed in triplicate, and the result is expressed as g/100 g of sample.

2.2.4. Carbohydrates and Energy. The carbohydrate content of the sample was calculated by the following difference: 100 - (g proteins + g lipids + g ash). The total energy was calculated using the following equation: energy (kcal) = 4 × (g proteins + g carbohydrates) + 9 × (g lipids). The tests were performed in triplicate, and the results are expressed as g/100 g of sample for carbohydrates and as kcal/100 g of sample for energy.

2.2.5. Lipophilic Antioxidants. The lipophilic antioxidants β -carotene, lycopene, and chlorophyll a and b were determined using dried and powdered leaf samples (150 mg) vigorously stirred in 10 mL of an acetone-hexane mixture (4:6, *v/v*) for 1 min and filtered through a Whatman® Grade 4 qualitative filter paper. The absorbance of the filtrate was measured at 453, 505, 645, and 663 nm. The β -carotene, lycopene, and chlorophyll a and b contents were calculated using the following equations: β -carotene (mg/100 mL) = 0.216 × A₆₆₃ - 1.220 × A₆₄₅ - 0.304 × A₅₀₅ + 0.452 × A₄₅₃; lycopene (mg/100 mL) = -0.0458 × A₆₆₃ +

$0.204 \times A645 + 0.304 \times A505 - 0.0452 \times A453$; chlorophyll a (mg/100 mL) = $0.99 \times A663 - 0.0989 \times A645$; and chlorophyll b (mg/100 mL) = $-0.328 \times A663 + 1.77 \times A645$. The results are expressed as mg/100 g of sample [23].

2.2.6. Fatty Acid Composition. The total lipids extracted from dried and powdered leaf samples of *H. speciosa* were subjected to transesterification with 2.5 mL of methanol, 1.25 mL of sulfuric acid, and 1.25 mL of toluene (2:1:1 ratio (v/v)) for at least 12 h in a water bath at 50°C and 160 rpm. After this period, 3 mL of deionized water and 3 mL of diethyl ether were added. The mixture was stirred and left to stand until phase separation. The upper phase of fatty acid methyl esters (FAMES) was recovered using an anhydrous sodium sulfate microcolumn and transferred to a glass vial using a 0.2 µm Millipore nylon filter before injection into the device [24]. The sample FAMES were determined by gas chromatography with flame-ionization detection (GC-FID) in a capillary column of the DANI GC 1000 chromatograph (Izasa, Barcelona, Spain), which is equipped with a split/splitless injector, a flame ionization detector, and a Macherey-Nagel column (30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm d_f). The initial temperature of the column was 50°C for 2 min, followed by a 30°C/min increase until 125°C, a 5°C/min increase until 160°C, a 20°C/min increase to 180°C, and a 3°C/min increase until 200°C. Lastly, the temperature was increased at 20°C/min until the limit of 220°C, where it was held for 15 min. The total analysis time was 35.16 min. The gas (hydrogen) was maintained at a flow rate of 4.0 mL/min (0.61 bar) at 50°C. The injection (1:40) was performed at 220°C. For each analysis, 1 µL of sample was injected into the GC. The fatty acids were identified by comparing the retention times of the peaks of standard FAMES (Supelco 37 Component FAME mix) with those of the sample FAMES. The results were processed using CSW 1.7 software (DataA-pex 1.7, Prague, Czech Republic), and the data are expressed as the relative percentage of each fatty acid.

2.3. Microbiological Tests. The following parameters were assessed: mesophilic microorganisms, molds, yeasts, total coliforms, *Escherichia coli*, sulphite-reducing *Clostridium* spores, and *Salmonella* spp. All microbiological tests were performed in triplicate.

2.3.1. Sample Preparation. The samples were prepared as previously described by Gomes et al. [25]. For this, 25 g of dried and powdered leaves of *H. speciosa* were aseptically weighed and homogenized using Stomacher Lab-Blender (Seward type 400, London, UK) for 3 minutes with 225 mL of sterile peptone physiological saline solution (0.1% peptone + 0.85% NaCl in sterile deionized water, pH = 7.0 ± 0.05). After 24 hours, serial dilutions were prepared from this homogenate (initial dilution) with the same sterile diluents that were used for quantification of the different microorganisms.

2.3.2. Total Mesophilic Count. The mesophilic aerobic microorganisms were counted by adding 1 mL of each dilution of the leaves of *H. speciosa* to plate count agar (PCA) media (Himedia, Mumbai, India), in accordance with Portuguese

law 3788 [26]. Microbial counts are expressed as colony-forming units per gram (cfu/g) of sample.

2.3.3. Mold and Yeast Counts. Molds and yeasts were counted by adding 1 mL of the dilution of the leaves of *H. speciosa* in yeast peptone dextrose agar (PDA) media (Himedia, Mumbai, India) incubated at 25°C for 5 days [27]. Microbial counts are expressed as colony-forming units per gram (cfu/g) of sample.

2.3.4. Staphylococcus aureus Count. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was quantified according to protocol NP 4400-1 [28]. Serial dilutions of the leaves of *H. speciosa* were inoculated in Baird-Parker broth with egg yolk tellurite emulsion (Himedia) for 24 h (37°C). Subsequently, three to five typical colonies were selected to control for the presence of coagulase and catalase. Microbial counts are expressed as cfu/g of sample.

2.3.5. Total Coliform and Escherichia coli Counts. The total coliform and *Escherichia coli* (*E. coli*) were counted using the SimPlate method [29], according to the manufacturer's instructions and procedures.

For this, 1 mL aliquots of the serial dilutions of the leaves of *H. speciosa* were mixed with 9 mL of a blue solution supplied by the manufacturer and dispensed into the center of the SimPlate device. The SimPlate has undergone slight rotations to disperse the sample and remove the air bubbles. Samples were incubated at 37 ± 1°C for 24 to 48 h. The positive count of total coliforms was based on the change in color from blue to pink, and the positive count of *E. coli* was based on the change in color and UV fluorescence. Coliforms and *E. coli* were quantified by counting the number of positive wells, followed by the correlation with the conversion table, and the results are expressed as cfu/g of sample.

2.3.6. Enumeration of Sulphite-Reducing Clostridium Spores. To the enumeration of sulphite-reducing *Clostridium* spores, 0.1, 1, 5, and 10 mL aliquots of the initial dilution were added to empty tubes, which were heated to 80°C for 5 min and incubated with iron sulphite agar (ISA) media [30] in anaerobic conditions at 37°C for 5 days. The results are determined based on the enumeration of sulphite-reducing *Clostridium* spores in 0.01 g of sample and expressed as cfu/g of sample.

2.3.7. Salmonella spp. Detection. *Salmonella* spp. were detected using the immunodiffusion 1-2 test [29]. The test was performed by adding 100 µL of sample (initial dilution) pre-enriched in buffered peptone water and 50 µL of specific antibody included in the test kit. To confirm immunoband formation, the test samples were read after 16 to 20 h of incubation at 37°C.

2.4. Antioxidant Activity Assessment

2.4.1. Preparation of Human Erythrocyte Suspensions. The protocol of human peripheral blood collection was approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)) of the University Centre of the Grande Dourados (Centro Universitário da Grande Dourados), Brazil (process CEP number 123/12). Peripheral

blood was collected from healthy human donors after they signed the informed consent form. The samples were transferred into tubes with sodium citrate as an anticoagulant and centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C to separate the hemocomponents. Blood plasma and the thin layer of leukocytes were removed. The erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH=7.4) and centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C in each washing. Lastly, a 2% hematocrit suspension was prepared in PBS.

2.4.2. Antihemolytic Activity. The assays were conducted with an erythrocyte suspension (2%) preincubated at 37°C for 30 minutes with 20 µg/mL EEHS or with the flavonoid rutin, catechin, or isoquercetin individually, solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; final concentration up to 0.08%). After this period, 50 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) solution was added to the groups subjected to hemolysis induction. This mixture was incubated at 37°C for 4 h with frequent stirring. Erythrocytes incubated with PBS, the extract, and flavonoids only were used as negative controls. After every 60 min of incubation, the samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and an aliquot was collected from the supernatant, followed by dilution in PBS. Then, the samples were read at 545 nm. The percentage of hemolysis was calculated using the formula $A/B \times 100$, where A represents the sample absorbance and B represents the total hemolysis (erythrocytes incubated in distilled water). The assays were performed in triplicate. Percentage values were set for the third hour of incubation. The percentage of inhibition of hemolysis as a function of the sample concentration was also determined from the concentration-response curve.

2.5. Antimutagenic Activity. The antimutagenic activity was assessed using the Ames test, with some modifications [31]. Two strains were used for the assay, *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, genetically modified with a mutation in the histidine operator gene, which causes the strains to grow in a histidine-dependent manner. The activities of the direct mutagens sodium azide (SAZ) and 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) and the indirect mutagen aflatoxin (AFB1) were assessed. The rates of inhibition of the mutagenic activity induced by the EEHS (5–15 µg/mL) and flavonoids (0.1–0.5 µg/mL) were calculated using the following equation: rate of inhibition (%) = $(A - B)/A \times 100$, where A is the number of revertants in the presence of mutagens and B is the number of revertants in the presence of mutagens and samples after subtracting the number of spontaneous revertants. Values >80% viable cells were considered nontoxic compared with the negative control viability. The antimutagenic effect was considered moderate when the inhibitory effect ranged from 25 to 40% and high when it was greater than 40%. Effects lower than 25% were considered irrelevant and were disregarded.

2.6. Enzyme-Inhibiting Activity Assessment

2.6.1. Cholinesterase-Inhibiting Activity. The acetylthiocholinesterase- (AChE-) and butyrylthiocholinesterase- (BChE-)

inhibiting activities were assessed based on the spectrophotometric method described by Senol et al. [32] using acetylthiocholine and butyrylthiocholine as substrates. Aliquots of 50 µL of the EEHS or flavonoids (200–700 µg/mL) diluted in EtOH/buffered phosphate (0.1 mM, pH=8) were incubated with 25 µL acetylcholinesterase (AChE) from *Electrophorus electricus* (Type-VI, EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich, USA) and 125 µL of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (0.01 M) (DTNB, Sigma-Aldrich, USA) for 15 minutes at 25°C. The same procedure was performed to evaluate the activity of butyrylcholinesterase (BChE) from horse serum (EC 3.1.1.8, Sigma-Aldrich, USA). Subsequently, the reactions were initiated with the addition of 25 µL of the substrates acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (0.075 M, Sigma-Aldrich, USA), respectively, diluted in EtOH/phosphate buffer (0.1 mM, pH=8). The hydrolysis of substrates was monitored by the formation of the yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as a result of the reaction with the 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (0.01 M) (DTNB, Sigma-Aldrich, EUA) at 412 nm. All tests were performed in triplicate. Eserine (0.001–0.01 µg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) was used as a reference compound. The percentages of AChE/BChE enzyme inhibition were determined comparing the reaction rates of the samples compared with the blank (ethanol in phosphate buffer (0.1 mM, pH=8)) using the following formula: $(E - S)/E \times 100$, where E is the enzymatic activity without test samples and S is the enzymatic activity with test samples. The IC_{50} values were calculated.

2.6.2. Tyrosinase-Inhibiting Activity. The tyrosinase-inhibiting activity was assessed using the method described by Orhan and Khan [33], with some modifications. Aliquots of 25 µL of the EEHS or flavonoids (50–1000 µg/mL) were mixed with 40 µL of the tyrosinase solution (EC 1.14.1.8.1, 30 U mushroom tyrosinase, Sigma-Aldrich, 200 U/mL) and 100 µL of buffer phosphate solution (pH 6.8) in a 96-well microplate, incubated for 15 min at 37°C. Subsequently, 40 µL of L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) was added to the mixture which was incubated for 10 min at 37°C. The reading of the absorbance was performed at 492 nm. Kojic acid (2.5–20 µg/mL) was used as the reference compound.

All tests were performed in triplicate. The percentage of tyrosinase inhibition was calculated using the following formula: % inhibition = $[(\text{blank absorbance} - \text{sample absorbance})/\text{blank absorbance}] \times 100$. The IC_{50} values were calculated.

2.6.3. Hyaluronidase-Inhibiting Activity. The assay was performed as described by Ling et al. [34], with some modifications. For this, a mixture of 80 U of the enzyme hyaluronidase in 100 µL of 20 mM sodium phosphate buffer and 25 µL of EEHS or flavonoids (35 µg/mL) dissolved in 25% (v/v) DMSO was incubated for 10 min at 37°C. Afterwards, 100 µL of hyaluronic acid (0.03% in 300 mM sodium phosphate buffer, pH 5.35) was added and incubated for 45 min at 37°C. The undigested hyaluronic acid was precipitated with 1 mL of acidic albumin solution (0.1% bovine

albumin in 24 mM sodium acetate and 79 mM acetic acid at pH 3.75). Posteriorly, the samples were incubated at room temperature for 10 min. The reading of the absorbance was performed at 600 nm. Absorbance in the absence of enzyme was used as a reference for maximal inhibition. Epigallocatechin (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as the reference compound. The tests were performed in triplicate. The inhibitory activity of the test sample was calculated using the following formula: inhibition (%) = A_t (test sample)/ A_{ref} (reference sample) \times 100.

2.6.4. α -Amylase-Inhibiting Activity. The α -amylase-inhibiting activity was assessed as described by Gao et al. [35]. Blue starch (Sigma-Aldrich; 2.0 mg) was used as the substrate in 50 mM Tri-HCl buffer at a pH of 6.9 containing 10 mM CaCl_2 and boiled for 5 min at 100°C. Then, the starch azure solution was preincubated for 10 min at 37°C. The samples of the EEHS or flavonoids (20–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were dissolved in 25% DMSO, and 200 μL of porcine pancreatic α -amylase solution (Sigma-Aldrich, A-6255; 2.0 U/mL; 50 mM Tri-HCl buffer containing 10 mM CaCl_2 , pH 6.9) was added into each assay. The reaction was carried out at 37°C for 10 min and stopped by adding 0.5 mL of 50% acetic acid. The reaction mixture was then centrifuged at 2000 rpm for 5 min at 4°C. The absorbance of the supernatant at 595 nm was measured. Acarbose (20–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as the reference compound. The tests were performed in triplicate. The α -amylase-inhibiting activity was calculated using the following formula: %inhibition = $(A_{c+}) - (A_{c-}) - (A_s - A_b) / (A_{c+}) - (A_{c-}) \times 100$, where A_{c+} is the activity in the presence of 100% enzyme (solvent with enzyme), A_{c-} is the activity in the presence of 0% enzyme (solvent without enzyme), A_s is the enzyme-inhibiting activity of the test sample (sample with enzyme), and A_b is the blank (test sample without enzyme). The IC_{50} values were calculated.

2.6.5. α -Glucosidase-Inhibiting Activity. The α -glucosidase-inhibiting activity was assessed according to Mayur et al. [36], with minor modifications. The reaction mixture contained 50 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), 25 μL of 0.5 mM 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, 10 μL of the EEHS or flavonoids (25–85 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 25 μL of α -glucosidase solution (0.2 unit/mL). The mixture was then incubated at 37°C for 30 min, and the reaction was terminated by adding 100 μL of 0.2 M sodium carbonate solution. The enzymatic hydrolysis of substrate was monitored through the amount of p-nitrophenol released in the reaction mixture at 410 nm. Individual blanks were prepared for correcting background absorbance, being the enzymes replaced by 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). In controls, the plant extract or flavonoids were replaced by methanol. Acarbose (25–85 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as a positive control. The inhibition percentage of α -glucosidase was calculated through the formula: % inhibition = $[1 - (\text{sample absorbance}/\text{control absorbance})] \times 100$. The IC_{50} values were compared; analyses were carried out in triplicate.

2.6.6. Lipase-Inhibiting Activity. The porcine pancreatic lipase (PPL) (type II-inhibiting, Sigma-Aldrich) activity was assessed using the spectrophotometric method described by

Roh and Jung [37]. EEHS or flavonoids (final concentrations of 2.5–35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were preincubated with PPL (1 mg/mL) for 1 h in a potassium phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.2, 0.1% Tween 80) at 30°C before assaying the PPL activity. 0.1 μL p-nitrophenil Butirato (Sigma-Aldrich) was then added as a substrate. After incubation at 30°C for 5 min, the amount of p-nitrophenol released in the reaction was measured at 405 nm using a UV-visible spectrophotometer. The activity of the negative control (DMSO) was also evaluated with and without an inhibitor. All tests were performed in triplicate. Orlistat (0.003–0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as the reference compound. The PPL-inhibiting activity was calculated using the following formula: inhibitory activity (%) = $100 - ((B - b) / (A - a)) \times 100$, where A is the activity without an inhibitor, a is the negative control without an inhibitor, B is the activity with an inhibitor, and b is the negative control with an inhibitor. The IC_{50} values were calculated.

2.7. In Vivo Studies

2.7.1. Animals. All experimental procedures with animals were submitted to and approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Brasília (permission-UNBDOC number 47926/2010) and conducted in accordance with the norms of the National Council for the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA)). 120-day-old adult male Wistar rats were obtained from the animal house of the School of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. The animals were kept in polyethylene boxes at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and in a controlled light-dark cycle (12/12 h). All animals were fed ad libitum.

2.7.2. Oral Glucose Tolerance Test in Normoglycemic Wistar Rats. The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed after 12 hours of fasting in adult 120-day-old male normoglycemic Wistar rats. The animals were challenged with glucose overload by oral gavage (2 g/kg body mass). After 30 minutes, the vehicle control dimethyl sulfoxide (6% DMSO) and EEHS (200 and 400 mg/kg body mass) treatments were performed. Rat glycemia was measured at 0, 30, 60, 120, and 180 min after delivering the glucose overload according to Aragão et al. [38] using the Accu-Chek Active (Roche) blood glucose meter and disposable strips.

2.7.3. Diabetes Induction. Diabetes was induced in adult 120-day-old male Wistar rats with a single intraperitoneal injection of alloxan monohydrate (120 mg/kg body mass) dissolved in 0.9% sterile saline, as described by Aragão et al. [38], with some modifications. Blood glucose levels were determined 96 h after the induction of diabetes using a portable Accu-Chek (Abbott) blood glucose meter and disposable strips. The animals with hyperglycemia (blood glucose levels higher than 200 mg/dL) were separated for further study.

2.7.4. Glycemic Assessment in Diabetic Wistar Rats. The treatment and glycemic assessment of diabetic male Wistar rats

were performed according to Aragão et al. [38], with some modifications. The blood glucose levels of diabetic rats submitted to acute and chronic treatment (28 days) were measured during fasting at time zero, and they were subsequently administered with the doses of vehicle control 6% DMSO, EEHS (200 mg/kg body mass), and metformin (120 mg/kg body mass). The blood glucose levels of the rats were measured at times of 0, 30, 60, 120, and 180 min using the Accu-Chek Active (Roche) blood glucose meter and disposable strips.

2.8. Statistical Analysis. The data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed to assess significant differences between groups. One-way analysis of variance was used for the total composition of FAMES as well as antihemolytic, enzyme-inhibiting, and antimutagenic activities. Differences were determined using the multiple comparison Tukey test for the results of the total composition of FAMES and antihemolytic activity. Dunnett's multiple comparison test was used to assess differences in enzyme inhibition and antimutagenicity assays. The *t*-test was used in the *in vivo* experiments to assess differences between groups. All data were obtained using the Software GraphPad Prism 5. Results were considered significant when $*P < 0.05$ or $^{\dagger}P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$ or $###P < 0.001$.

3. Results

3.1. Physicochemical Parameters. Physicochemical parameters, including the mineral (ash), protein, total lipid, and carbohydrate contents as well as the energy value of *H. speciosa* leaves, are outlined in Table 1.

3.2. Lipophilic Antioxidants. Chlorophyll a and β -carotene were the predominant antioxidants, with 1.33 ± 0.03 and 0.55 ± 0.01 mg/100 g of sample, respectively. Conversely, the concentration of chlorophyll b was 0.42 ± 0.02 mg/100 g, and the concentration of lycopene was 0.070 ± 0.01 mg/100 g.

3.3. Profile of Fatty Acid Methyl Esters. After total lipid extraction from *H. speciosa* leaves, the profiles of FAMES were analyzed by gas chromatography (Figure 1(a)). The α -linolenic acid (C18:3n3) was the predominant fatty acid identified in the sample, followed by palmitic (C16:0) and linoleic (C18:2n6) acids. In addition to these three fatty acids, 19 other compounds were identified and quantified (Figure 1(b)). The sample had a higher percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (48.82%), followed by saturated fatty acids (SFAs) (39.19%) and monounsaturated fatty acids (MUFAs) (11.86%) (Figure 1(c)). The PUFAs/SFAs and *n*-6/*n*-3 ratios assessed were 1.25 and 3.37, respectively.

3.4. Microbiological Quality and Safety. The results from the microbiological quality and safety analysis of *H. speciosa* leaves are outlined in Table 2.

3.5. Antihemolytic Activity. Figure 2 shows the results of the protective activities of the EEHS ($59.59 \pm 1.42\%$), rutin

TABLE 1: Physicochemical characterization of *Hancornia speciosa* leaf samples.

Physicochemical characterization	Results/100 g
Ash	2.2 ± 0.0123 g
Protein	14.7 ± 0.1811 g
Lipid	0.14 ± 0.0006 g
Sugars	82.9 ± 0.0174 g
Energy	392.0 ± 0.049 kcal

Values are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate.

($29.67 \pm 2.11\%$), catechin ($23.67 \pm 1.97\%$), and isoquercetin ($20.97 \pm 1.38\%$) against AAPH-induced hemolysis.

3.6. Antimutagenic Activity. The results from the study of the antimutagenic potentials of the EEHS, rutin, catechin, and isoquercetin are outlined in Table 3. In all of the EEHS concentrations tested (5–15 μ g/mL), a high antimutagenic activity was observed in the *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains exposed to different mutagens with (S9+) and without (S9-) metabolic activation. Among the flavonoids, rutin (0.1–0.25 μ g/mL) showed moderate antimutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* TA98 strain without metabolic activation.

3.7. Enzyme-Inhibiting Activity

3.7.1. Cholinesterase-Inhibiting Activity. Table 4 shows that the EEHS had higher AChE-inhibiting activity than isoquercetin (2.0 times), rutin (1.7 times), and catechin (1.5 times) and lower activity than eserine (reference AChE inhibitor). The EEHS showed higher BChE-inhibiting activity than isoquercetin (1.8 times), catechin (1.6 times), and rutin (1.4 times) and lower activity than eserine (reference BChE inhibitor) (Table 4).

3.7.2. Tyrosinase-Inhibiting Activity. The EEHS showed 4.3-, 3.8-, and 3.7-fold higher tyrosinase-inhibiting activity than catechin, isoquercetin, and rutin, respectively (Table 4). The tyrosinase-inhibiting activities of all compounds were lower than that of the reference inhibitor kojic acid (Table 4).

3.7.3. Hyaluronidase-Inhibiting Activity. The EEHS showed 1.8-fold higher hyaluronidase-inhibiting activity than rutin and catechin and 2.6-fold higher activity than isoquercetin (Table 4). However, the hyaluronidase-inhibiting activities of the EEHS and flavonoids were lower than that of the reference compound, epigallocatechin (EGC) (Table 4).

3.7.4. Pancreatic Lipase-Inhibiting Activity. Table 4 shows that the EEHS had higher pancreatic lipase-inhibiting activity than isoquercetin (8.1 times), catechin (7.4 times), and rutin (5.2 times) and lower activity than that of orlistat (reference inhibitor of pancreatic lipase).

3.7.5. α -Amylase- and α -Glucosidase-Inhibiting Activities. Table 4 shows that the EEHS had higher α -amylase-

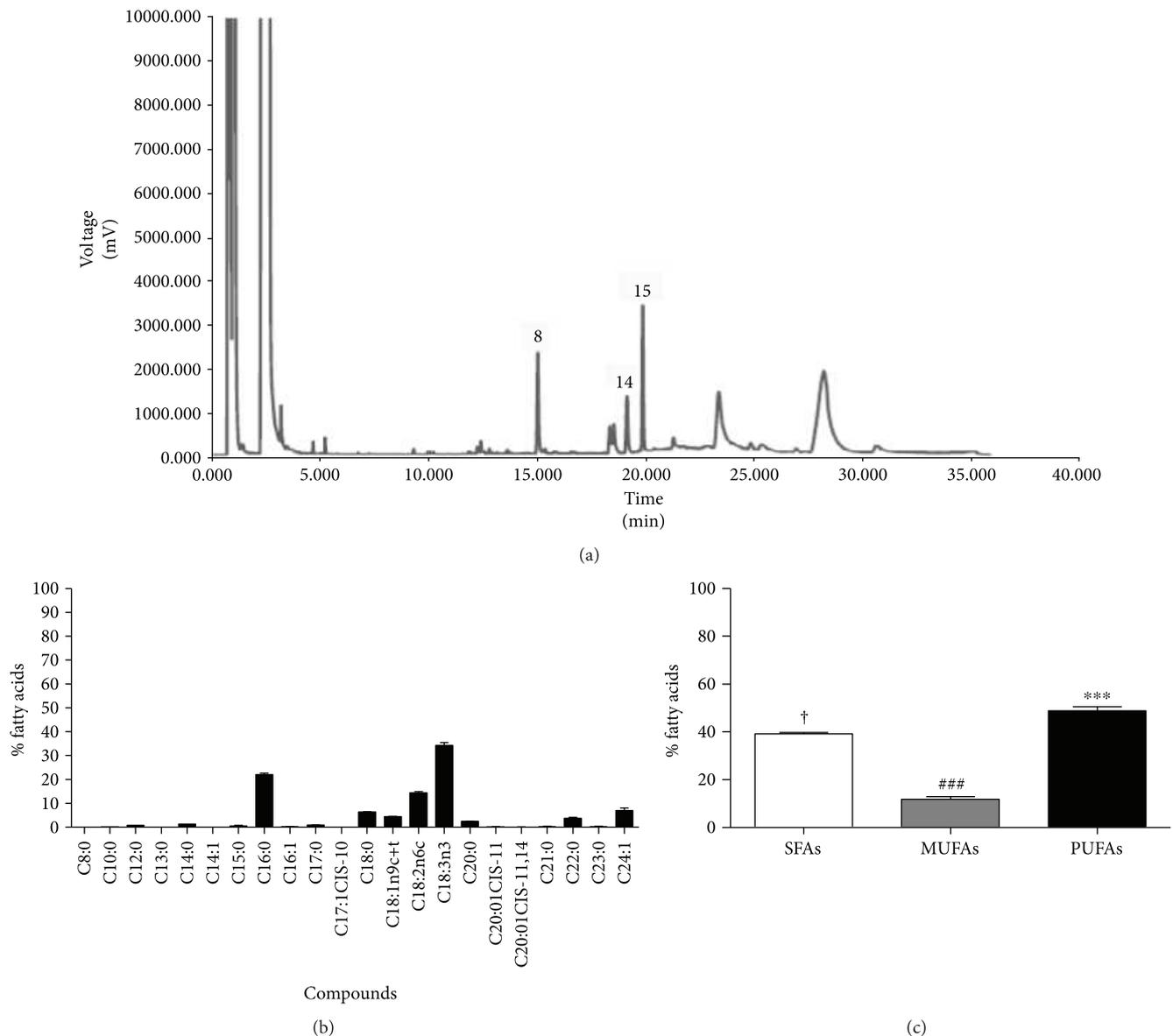


FIGURE 1: (a) Chromatographic fatty acid profile of *Hancornia speciosa* leaf samples. (b) Chemical composition of fatty acid methyl esters (FAMES): caprylic acid (C8:0), capric acid (C10:0), lauric acid (C12:0), tridecanoic acid (C13:0), myristic acid (C14:0), myristoleic acid (C14:1), pentadecanoic acid (C15:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), heptadecanoic acid (C17:0), cis-10-heptadecanoic acid (C17:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1n9c+t), linoleic acid (C18:2n6c), α -linolenic acid (C18:3n3), arachidic acid (C20:0), cis-11-eicosenoic acid (C20:1), cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2), heneicosanoic acid (C21:0), behenic acid (C22:0), tricosanoic acid (C23:0), and nervonic acid (C24:1). (c) Total composition of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of *Hancornia speciosa* leaf samples. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. † $P < 0.05$ compared with the SFA group versus the PUFA group; ### $P < 0.001$ compared with the MUFA group versus the PUFA and SFA groups; and *** $P < 0.001$ compared with the PUFA group versus the MUFA groups.

inhibiting activity than rutin (2.2 times), isoquercetin (2.0 times), catechin (1.4 times) and the reference inhibitor acarbose (1.9 times). The assessment of the α -amylase-inhibiting activity of flavonoids in comparison with the reference compound acarbose showed that catechin had a higher activity than acarbose (Table 4). The EEHS showed higher α -glucosidase-inhibiting activity than rutin (2.4 times), catechin (2.2 times), isoquercetin (1.7 times), and acarbose (1.6 times) (Table 4).

3.8. In Vivo Studies

3.8.1. Oral Glucose Tolerance Test in Normoglycemic Wistar Rats. Figure 3 shows that the normoglycemic rats challenged with glucose overload show significantly decreased blood glucose levels when treated with the EEHS (200 mg/kg).

3.8.2. Glycemic Assessment in Diabetic Wistar Rats. In the assay with diabetic rats with glycemia higher than

TABLE 2: Microbiological analysis of *Hancornia speciosa* leaf samples.

Microbiological analysis	Results
Aerobic mesophiles	$6.25 \times 10^4 \pm 0.45$ cfu/g
Molds and yeast	$6.82 \times 10^3 \pm 0.18$ cfu/g
Total coliforms	$12.4 \times 10^3 \pm 0.40$ cfu/g
<i>Escherichia coli</i>	<1 cfu/g
Sulphite-reducing <i>Clostridia</i>	Absent
<i>Salmonella</i> spp.	Absent
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10 cfu/g

Values are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate.

400 mg/dL and without glucose overload, no decreases in the blood glucose levels were observed after acute (Figure 4(a)) and chronic (Figure 4(b)) treatments with the EEHS (200 mg/kg). Only the experimental group metformin (MET, 120 mg/kg) showed decreased blood glucose levels (Figures 4(a) and 4(b)).

4. Discussion

Brazil has different biomes with high biological diversity and native species, which are often used as medicinal plants. Studying the pharmacological properties of these plants used in traditional medicine ensures its scientific record and strengthens the traditional knowledge accumulated over centuries. Among these plants, *H. speciosa* has been described as a highly versatile species. This plant is traditionally used to treat various diseases and has a high economic and biotechnological potential for drug development because its leaves and other parts are sold as tea [4, 39].

Despite the proven therapeutic effect, the increase in the consumption of natural products has become a public health problem because low-quality products without validation of raw material safety and efficiency may be purchased [3]. Natural products may contain a large number of fungi and bacteria; these microorganisms are usually from the soil, which is the natural microbiota or even introduced during inappropriate handling of harvest, drying, and storage of these products (WHO, 2007). In this sense, several studies have been carried out with the purpose of assuring the quality and microbiological safety of medicinal plants [40–42]. Although the European Community legislation does not have defined microbiological standards for aromatic dry plants, the World Health Organization (WHO), the European Spice Association (ESA), and the Codex Code of Hygienic Practice specify that aromatic dry plants need to have acceptable microbial contamination levels and absence of pathogenic microorganisms, such as *Salmonella* sp. and *Clostridium* sp. [2, 43, 44]. Thus, this study aimed to ensure that the raw material used is of high quality and safe for consumption by testing the microbiological quality and safety of *H. speciosa* leaves, which are in accordance with current standards established by the World Health Organization for products intended for human consumption [2].

After the initial quality and safety assessment as well as physicochemical analysis, including the quantification of the total lipids extracted from *H. speciosa* leaves, different fatty acids were identified. Among the fatty acids, α -linolenic acid (polyunsaturated omega-3), considered an essential fatty acid only obtained from the diet [45], was the predominant fatty acid found in *H. speciosa* leaves, followed by palmitic (saturated) and linoleic (polyunsaturated omega-6) acids. Moreover, the PUFAs/SFAs and *n*-6/*n*-3 fatty acid ratios calculated indicate good nutritional quality, including health benefits [46]. α -Linolenic acid cannot be synthesized by humans; however, dietary α -linolenic acid is the precursor of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, which are anti-inflammatory eicosanoids [47, 48].

Furthermore, the quantification of natural antioxidants, including lipophilic antioxidants as well as the total phenols and flavonoids in natural products, provides key parameters to assess the quality and biological potential of herbal products [49]. In this study, the lipophilic antioxidants chlorophyll a and b, β -carotene, and lycopene were identified and quantified in *H. speciosa* leaves. The main carotenoids include the hydrocarbons β -carotene and lycopene [50]. The great interest in these nutrients results from their biological and physiological functions [51]. Some carotenoids, in addition to vitamin A (retinol) precursors, have antioxidant properties and improve the immune response [52]. Moreover, a previous study by Santos et al. [4] with the EEHS reported higher concentrations of total phenols than those described for *H. speciosa* fruit extracts [53].

Phenolic compounds are hydrogen donors capable of directly removing free radicals and reducing oxidative damage [4, 54, 55]. Extracts from medicinal plants with phenols and flavonoids, including *H. speciosa*, are described for their ability to activate endogenous antioxidant systems and to inhibit lipid peroxidation in human erythrocytes [4, 56, 57]. Accordingly, the flavonoids rutin, catechin, and isoquercetin, previously identified by Santos et al. [4] in the EEHS, showed antioxidant activity in this study, which was confirmed by the protection against human erythrocyte hemolysis resulting from lipid peroxidation. However, the results showed a possible synergistic effect between components of the extract because the EEHS showed a higher antihemolytic activity than the flavonoids alone. Peroxyl radicals promote hemolysis by oxidizing lipids and proteins of the cell membrane [58]. *In vitro* and *in vivo* studies show that natural extracts and flavonoids have antioxidant activity by inhibiting lipid peroxidation in the erythrocytes and cardiomyocytes of rats subjected to oxidative stress [4, 59, 60]. The protection against lipid peroxidation promoted by the test samples may be associated with the direct peroxyl radical scavenging activity or with the activation of enzymatic antioxidant mechanisms, such as glutathione, catalase, and superoxide dismutase [56, 58].

Accordingly, endogenous intracellular antioxidant pathways naturally protect the human body from the frequent contact with mutagenic agents. These structures stabilize highly reactive species that damage deoxyribonucleic acid (DNA) [61]. However, natural defense mechanisms may not suffice, thus highlighting the importance of investigating

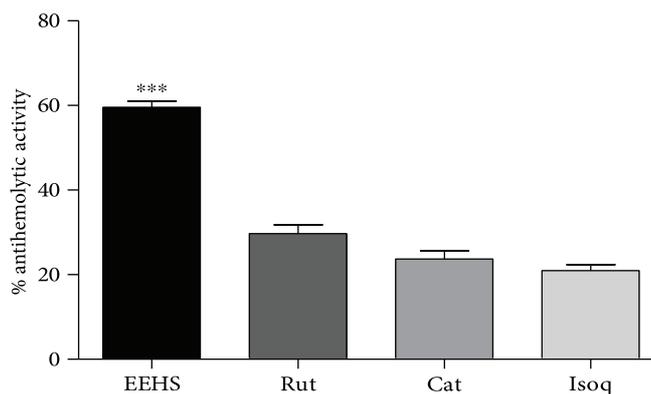


FIGURE 2: Antihemolytic activities of the ethanolic extract from *Hancornia speciosa* leaves (EEHS) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the flavonoids rutin (Rut), catechin (Cat), and isoquercetin (Isoq) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against 50 mM AAPH-induced hemolysis. Values are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate. *** $P < 0.001$ when the EEHS group is compared with the rutin, catechin, and isoquercetin groups.

TABLE 3: Antimutagenic activities of the ethanolic extract from *Hancornia speciosa* leaves (EEHS), rutin (Rut), catechin (Cat), and isoquercetin (Isoq) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains.

	$\mu\text{g}/\text{mL}$	S9–		S9+		S9–		S9+	
		TA 98	No revertants (%)	TA 98	No revertants (%)	TA 100	No revertants (%)	TA 100	No revertants (%)
NC		39.0 \pm 3.2	—	50.3 \pm 3.8	—	63.3 \pm 2.6	—	46.7 \pm 2.4	—
4-NO	3	198.6 \pm 4.6	0	—	—	—	—	—	—
SAZ	3	—	—	—	—	256.7 \pm 2.9	0	—	—
AFB1	3	—	—	231.0 \pm 6.6	0	—	—	236.3 \pm 5.9	0
	5	35.0 \pm 2.1***	82.3 \pm 0.6	18.6 \pm 0.9***	92.3 \pm 0.3	95.0 \pm 2.9***	63.0 \pm 1.0	75.0 \pm 2.9***	68.0 \pm 1.5
EEHS	10	11.3 \pm 2.3***	94.0 \pm 1.7	8.0 \pm 1.1***	96.7 \pm 0.3	70.7 \pm 2.3***	72.3 \pm 0.9	57.3 \pm 4.3***	75.7 \pm 1.4
	15	7.7 \pm 1.20***	96.0 \pm 0.6	5.6 \pm 0.3***	97.6 \pm 0.3	44.0 \pm 3.8***	82.7 \pm 1.2	36.0 \pm 3.6***	84.7 \pm 1.3
	0.1	136.0 \pm 5.5***	31.3 \pm 4.1	231.3 \pm 4.1	−0.04 \pm 0.01	269.7 \pm 4.7	−0.05 \pm 0.01	254.7 \pm 5.2	0.01 \pm 0.01
Rut	0.25	148.3 \pm 0.9***	25.3 \pm 1.2	248.6 \pm 2.0	−0.07 \pm 0.01	285.7 \pm 2.9	−0.11 \pm 0.04	269.3 \pm 0.6	−0.05 \pm 0.01
	0.5	175.0 \pm 2.9	12.3 \pm 0.6	>300	—	285.7 \pm 0.9	−0.39 \pm 0.5	275.3 \pm 2.9	0.07 \pm 0.01
	0.1	211.0 \pm 6.08	−0.06 \pm 0.01	240.0 \pm 7.1	−0.04 \pm 0.01	284.7 \pm 1.4	−0.11 \pm 0.03	285.0 \pm 3.6	−0.11 \pm 0.01
Cat	0.25	240.0 \pm 7.63	−20.6 \pm 2.2	272.3 \pm 3.6	−18.0 \pm 3.5	289.3 \pm 2.2	−0.12 \pm 0.02	280.3 \pm 4.8	−0.09 \pm 0.01
	0.5	>300	—	>300	—	291.0 \pm 5.5	−0.06 \pm 0.1	284.7 \pm 6.8	−0.11 \pm 0.02
	0.1	195.6 \pm 5.0	0.01 \pm 0.01	201.0 \pm 4.3	0.1 \pm 0.01	273.3 \pm 3.3	−0.06 \pm 0.01	281.0 \pm 7.4	0.05 \pm 0.06
Isoq	0.25	>300	—	245.3 \pm 6.6	−0.06 \pm 0.01	284.3 \pm 2.2	−0.31 \pm 0.33	279.3 \pm 5.8	−0.09 \pm 0.02
	0.5	>300	—	>300	—	289.0 \pm 2.8	−0.12 \pm 0.04	282.3 \pm 4.3	−0.37 \pm 0.03

Salmonella typhimurium TA98 and TA100 strains (CFUs) exposed to the direct mutagens 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NO) and sodium azide (SAZ) without metabolic activation (S9–). *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 (CFUs) strains exposed to the indirect mutagen aflatoxin B1 (AFB1) with metabolic activation (S9+, microsomal activation system: microsomal fraction of rat liver homogenate). Values are expressed as the mean \pm SEM of the experiment performed in triplicate. *** $P < 0.001$ when the means of the treated groups are compared with the 4-NO (TA98/without S9), SAZ (TA100/without S9), and AFB1 (TA98 and TA100 with S9) groups. —: unvalued.

exogenous antioxidant compounds with antimutagenic activity [62].

The Ames test has been recommended to assess the antimutagenic effects of several natural molecules, including plant compounds. This assay can detect frameshift or mis-sense mutations [63]. The EEHS showed antimutagenic activity when *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains were exposed to the direct mutagens 4-NO, a substitution agent that primarily acts on guanine (G) residues, inducing transitions from guanine-cytosine (GC) to adenine-thymine (AT) [64], and SAZ, which induces

mutagenesis through the production of the DNA-interacting metabolite L-azidoalanine, inducing transitions from GC to AT [65]. Moreover, the EEHS showed antimutagenic activity when *S. typhimurium* TA98 and TA100 strains were exposed to the indirect mutagen AFB1, a toxin that stimulates the release of free radicals, thereby triggering chromosomal aberrations [66]. Among the flavonoids, rutin showed moderate antimutagenic activity when *S. typhimurium* TA98 strains were exposed to 4-NO. A study using the Ames test suggests that flavonoids may show antimutagenic effects through different

TABLE 4: Acetylcholinesterase- (AChE-), butyrylcholinesterase- (BChE-), tyrosinase-, hyaluronidase-, pancreatic lipase-, α -amylase-, and α -glucosidase-inhibiting activities of the ethanolic extract from *Hancornia speciosa* leaves (EEHS), rutin (Rut), catechin (Cat), and isoquercetin (Isoq).

	AChE IC ₅₀ (μ g/mL)	BChE IC ₅₀ (μ g/mL)	Tyrosinase IC ₅₀ (μ g/mL)	Hyaluronidase % (μ g/mL)	Pancreatic lipase IC ₅₀ (μ g/mL)	α -Amylase IC ₅₀ (μ g/mL)	α -Glucosidase IC ₅₀ (μ g/mL)
EEHS	257.2 \pm 10.8***	190.3 \pm 9.8***	159.4 \pm 2.4***	22.5 \pm 1.6***	3.3 \pm 0.3***	35.8 \pm 2.9***	31.6 \pm 1.5***
Rut	437.6 \pm 9.9	272.9 \pm 8.8	583.2 \pm 12.9	12.3 \pm 0.9	17.2 \pm 0.9	77.9 \pm 0.6	74.9 \pm 2.3
Cat	379.0 \pm 8.4	312.6 \pm 6.7	679.2 \pm 11.8	12.3 \pm 0.8	24.5 \pm 0.6	50.3 \pm 2.6**	68.4 \pm 1.6
Isoq	527.8 \pm 12.1	342.8 \pm 7.6	610.7 \pm 7.1	8.8 \pm 0.8	26.7 \pm 1.6	73.2 \pm 1.5	54.9 \pm 2.3
Eserine	0.005 \pm 0.001	0.037 \pm 0.003	—	—	—	—	—
Kojic ac.	—	—	6.5 \pm 0.5	—	—	—	—
EGC	—	—	—	97.9 \pm 0.8	—	—	—
Orlistat	—	—	—	—	0.016 \pm 0.02	—	—
Acarbose	—	—	—	—	—	67.5 \pm 1.5	49.7 \pm 2.1

Values are expressed as the mean (μ g/mL), IC₅₀, and percentage \pm SEM of experiments performed in triplicate. *** P < 0.001 when comparing the treatment groups with the acarbose control groups, epigallocatechin (EGC). ** P < 0.01 compared with the catechin group versus the rutin, isoquercetin, and control groups (acarbose). *** P < 0.001 compared with the EEHS group versus the rutin, catechin, isoquercetin, and control groups (eserine, kojic acid, EGC; epigallocatechin, orlistat, or acarbose).

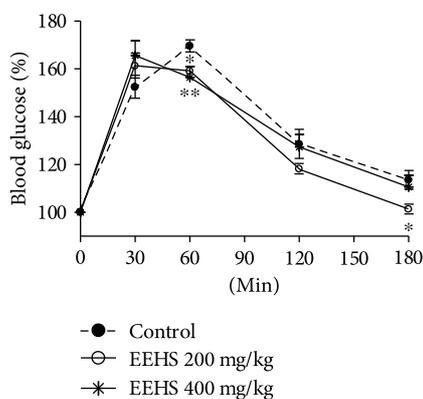


FIGURE 3: Oral glucose tolerance test in normoglycemic Wistar rats subjected to treatment with the control and ethanolic extract of *Hancornia speciosa* leaves (EEHS) at 200 and 400 mg/kg. Times assessed: 0, 30, 60, 120, and 180 min. Values are expressed as the mean \pm SEM, n = 5. ** P < 0.01 and * P < 0.05 when comparing treatment groups with the control group.

mechanisms, including scavenging bacterial mutagens, interacting with mutagenic reactive intermediates and affecting microsomal enzymes [67]. However, flavonoids may also show dual concentration-dependent effects, either mutagenic or antimutagenic [68]. Thus, the antimutagenic activity of the extract and rutin could be related to the antioxidant activity because other studies have reported that antioxidant compounds are related to the antimutagenic activity [69, 70].

The ability of flavonoids to reduce oxidative stress is also related to the decreased risk associated with neurodegenerative diseases [71]. In this context, medicinal plants and phenolic derivatives have been recognized for their inhibitory activities against enzymes involved in neurodegenerative diseases [70–72]. Alzheimer's disease is a degenerative and progressive disease and is the form of dementia most commonly found among elderly people [73]. This disease is

characterized by the presence of β -amyloid plaques with neurofibrillary complications and the degeneration or atrophy of cholinergic neurons [74, 75]. The loss of cholinergic neurons results in the reduced availability of the cholinergic neurotransmitter acetylcholine, leading to impaired cognition in Alzheimer's disease [76]. However, the level of this neurotransmitter can be increased in the brain by inhibiting the activity of cholinesterases, enzymes that break down acetylcholine [77]. In this context, AChE and BChE inhibitors are used to increase the synaptic levels of acetylcholine, which is considered the main disease treatment approach [78]. The increase in acetylcholine levels improves the communication between nerve cells that use it as the only neurotransmitter [79]. Other *in vitro* studies using the flavonoids rutin and quercetin reported findings on the AChE- and BChE-inhibiting activities [72, 80]. *In vivo* phenolic and flavonoid derivatives, such as rutin and quercetin, also show AChE- and BChE-inhibiting activities and improve the cognitive abilities of animals, including those subjected to neurotoxicity [81, 82]. Furthermore, a molecular coupling study has shown the hydrophobic interactions and strong hydrogen bonds between quercetin and the enzymes AChE and BChE, thus proposing this mechanism as the basis for the enzyme-inhibiting activity [83].

The activity of tyrosinase, another enzyme related to neurodegenerative diseases, was inhibited by the *H. speciosa* extract and flavonoids. Tyrosinase is a polyphenol oxidase enzyme involved in the synthesis of melanin (skin and hair) and neuromelanin [84], and it is considered a key target in the search for new drugs against Parkinson's disease [72]. This neurodegenerative disease results from the deficiency of dopaminergic neurons [84]. Studies suggest that tyrosinase plays a role in the formation of reactive species that oxidize dopamine, which triggers the production of more reactive oxygen species leading to neuronal death [85, 86]. Furthermore, the increase in lipid peroxidation in the brains of patients with Parkinson's disease has been reported [87, 88].

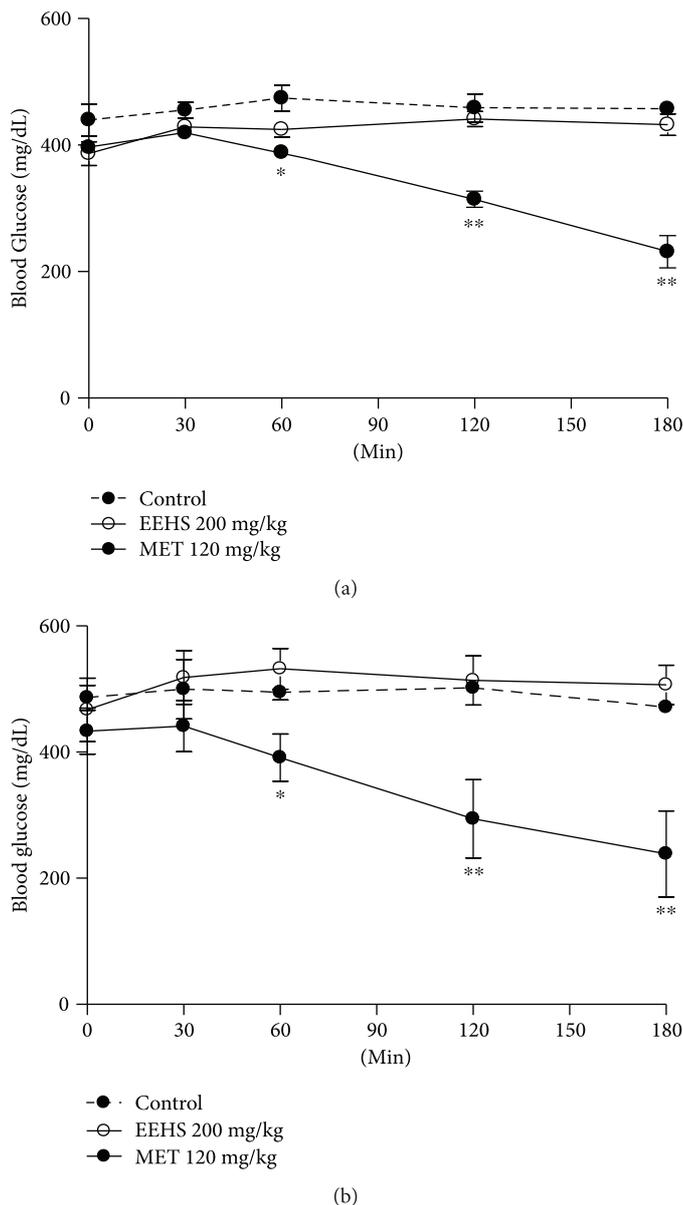


FIGURE 4: Glycemic curve without glucose overload in diabetic Wistar rats subjected to acute (a) and chronic (b) treatments with the control, EEHS (200 mg/kg) and metformin (MET, 120 mg/kg). Times tested: 0, 30, 60, 120, and 180 min. Values are expressed as the mean \pm SEM, $n = 5$. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ when comparing treatment groups with the control group.

In addition to those activities, tyrosinase also plays an enzymatic role in fruit and vegetable browning and skin hyperpigmentation [89]. Accordingly, tyrosinase inhibitors are mainly used as chemical agents to reduce food browning and human skin hyperpigmentation [90, 91]. Although melanogenesis is mainly responsible for skin coloration and the protection of skin against sun-related lesions, abnormal skin hyperpigmentation causes serious esthetic problems [92]. Kojic acid, a chemical product commonly used for skin whitening, has health adverse effects, including cytotoxic and mutagenic effects [93]. Therefore, compounds derived from natural products have become the alternative to those products, including flavonoids, which have stood out as inhibitors of this enzyme. Flavonoids are used to suppress

melanogenesis in dermatological diseases associated with skin hyperpigmentation [94]. The assessment of tyrosinase inhibition by the EEHS and flavonoids observed in this study may be related to direct interaction with tyrosinase because flavonoids, including the derivative quercetin, interact with the enzyme forming a flavonoid-copper-enzyme complex, according to Kim et al. [90].

In addition to neurodegenerative diseases and skin hyperpigmentation, inflammatory processes are also involved in the origin of other diseases [75].

In this context, *H. speciosa* has been used in traditional medicine to treat inflammatory diseases [95]. *In vitro* and *in vivo* studies with extracts from the plant and flavonoids isolated from its extracts have shown anti-inflammatory

activity through various mechanisms, including the inhibition of the enzymes nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), the proinflammatory transcriptional factor NF- κ B, and the inflammatory cytokines interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) [5, 6, 96–98].

Many commercially available anti-inflammatory drugs have harmful side effects. Therefore, the search for new therapies is extremely important [98]. Hyaluronidase-inhibiting compounds may be used as anti-inflammatory drugs [99]. The hyaluronidase enzymatic activity not only promotes chemokine and cytokine induction but may also degrade hyaluronic acid [99, 100]. Studies show that the high-molecular-weight hyaluronic acid has an anti-inflammatory activity, whereas its low-molecular-weight degradation products are potent proinflammatory molecules [101]. Hyaluronic acid is the main component of the extracellular matrix and is considered one of the main molecules involved in the tissue regeneration process. The activity of hyaluronic acid and its degradation products have been related to inflammation, cell migration, and angiogenesis through modulation of specific receptors [102]. Some of the consequences of hyaluronic acid degradation resulting from the activity of the enzyme hyaluronidase are bone loss, inflammation, and pain [103].

Another disease related to inflammation is obesity [104]. Obesity is defined as excess weight [105]. Some of the drug alternatives to treat obesity are related to the inhibition of enzymes involved in fat digestion and absorption [106]. Dietary fat digestion is necessary for its absorption, and such a process occurs through lipid hydrolysis resulting from lipase activity, thereby releasing fatty acids and glycerol [107]. The inhibition of pancreatic lipase, the main enzyme responsible for triglyceride digestion, is a strategy to reduce fat absorption and control weight that may decrease obesity [19]. In this context, many medicinal plants and phenolic derivatives have lipase-inhibiting activity [16–19]. *H. speciosa* is commonly used to treat obesity [108], and in this study, the EEHS showed higher lipase-inhibiting activity in the pancreas than flavonoids and a lower activity to orlistat, a potent commercial inhibitor of this enzyme. These results suggest that the EEHS and the flavonoids tested in this study promote interaction with the lipase enzyme because, as reported by a study, flavonoids, including rutin and quercetin derivatives, interact with lipase forming a flavonoid-enzyme complex, primarily through hydrophobic and hydrophilic bonds, thereby decreasing or inhibiting the activity of the enzyme [109].

Furthermore, obese patients have a high risk of developing diseases, including type 2 diabetes, the most prevalent form of the disease [105, 110]. Type 2 diabetes mellitus is a complex metabolic disease characterized by hyperglycemia resulting from increased insulin resistance [111, 112].

Decreasing postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes has been considered the most common therapeutic approach for disease control. Furthermore, this treatment reduces the risk of developing comorbidities and complications, including oxidative stress, obesity, and cardiovascular diseases [113]. This decrease may be achieved

by inhibiting the enzymes involved in dietary glucose release, including the enzymes α -amylase and α -glucosidase [107]. Pancreatic α -amylase breaks down starch molecules [114], and intestinal α -glucosidase catalyzes the final step of the digestion of starch and disaccharides into glucose for absorption [115]. Therefore, α -amylase and α -glucosidase inhibitors decrease the postprandial blood glucose levels of diabetic patients [116].

Accordingly, the EEHS, rutin, catechin, and isoquercetin inhibit the enzyme α -amylase, and the enzyme-inhibiting activities of the EEHS and catechin are higher than that of the commercial drug acarbose. The EEHS, rutin, catechin, and isoquercetin also showed α -glucosidase-inhibiting activity, although only the EEHS-induced α -glucosidase-inhibiting activity was higher than that of acarbose. Thus, these results demonstrate the high antidiabetic potential of the extracts and flavonoids tested because they had higher inhibitory activities than the commercial drug sold to treat diabetes. In addition, previous studies with ethanolic leaf extracts from *H. speciosa* and the flavonoid rutin, the main compound present in the EEHS that was tested in this study, have reported α -glucosidase-inhibiting activity as well as *in vitro* and *in vivo* control of the blood glucose levels [11]. Thus, the EEHS-induced α -amylase and α -glucosidase inhibition is a possible mechanism for the reduction of blood glucose levels by the EEHS in animals subjected to glucose overload because diabetic animals showed no improvement in the insulin sensitivity of these animals when compared with treatment with the insulin sensitizer metformin. Therefore, the *in vitro* and *in vivo* findings of this study confirm the role of the EEHS in controlling postprandial hyperglycemia.

Taken together, the results ensure the microbiological quality and safety of *H. speciosa* leaves, and carotenoids and polyunsaturated fatty acids in the leaves were also identified. In addition, the antioxidant, antimutagenic, anti-inflammatory, anti-Alzheimer's disease, anti-Parkinson's disease, antiobesity, and antihyperglycemic activities of the EEHS were identified.

Abbreviations

EEHS:	Ethanolic extract of <i>H. speciosa</i> leaves
GC-FID:	Gas-liquid chromatography with flame ionization detection
AAPH:	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
HPLC-DAD-MS/MS:	High-performance liquid chromatography with diode-array detection-tandem mass spectrometry
FAMES:	Fatty acid methyl esters
PDA:	Yeast peptone dextrose agar
PCA:	Plate count agar
ISA:	Iron sulphite agar
SAZ:	Sodium azide
4NQO:	4-Nitroquinoline 1-oxide
AFB1:	Aflatoxin
AChE:	Acetylthiocholinesterase
BChE:	Butyrylthiocholinesterase
PPL:	Porcine pancreatic lipase

OGTT:	Oral glucose tolerance test
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
PUFAs:	Polyunsaturated fatty acids
SFAs:	Saturated fatty acids
MUFAs:	Monounsaturated fatty acids
Rut:	Rutin
Cat:	Catechin
Isoq:	Isoquercetin
DNA:	Deoxyribonucleic acid
GC:	Guanine-cytosine
AT:	Adenine-thymine
iNOS:	Nitric oxide synthase
COX-2:	Cyclooxygenase-2
IL-6:	Interleukin 6
TNF- α :	Tumor necrosis factor alpha.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), and PRODER (24.073-Â, Portugal).

References

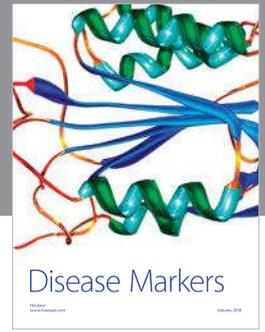
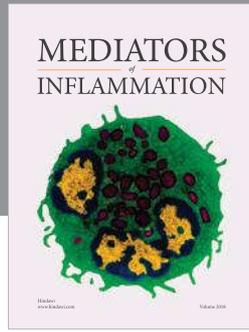
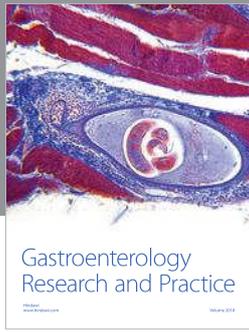
- [1] L. G. Dias, A. P. Pereira, and L. M. Estevinho, "Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 12, pp. 4246–4253, 2012.
- [2] World Health Organization (WHO), *WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2007.
- [3] D. D. M. Ghisleni, M. de Souza Braga, I. S. Kikuchi et al., "The microbial quality aspects and decontamination approaches for the herbal medicinal plants and products: an in-depth review," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 22, no. 27, pp. 4264–4287, 2016.
- [4] U. P. Santos, J. F. Campos, H. F. V. Torquato et al., "Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* gomes," *PLoS One*, vol. 11, no. 12, article e0167531, 2016.
- [5] D. C. Endringer, J. M. Pezzuto, and F. C. Braga, "NF- κ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*," *Phytomedicine*, vol. 16, no. 11, pp. 1064–1069, 2009.
- [6] F. C. Geller, M. R. Teixeira, A. B. D. Pereira et al., "Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves," *Phytotherapy Research*, vol. 29, no. 12, pp. 1887–1893, 2015.
- [7] H. C. Ferreira, C. P. Serra, D. C. Endringer, V. S. Lemos, F. C. Braga, and S. F. Cortes, "Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery," *Phytomedicine*, vol. 14, no. 7–8, pp. 473–478, 2007.
- [8] H. C. Ferreira, C. P. Serra, V. S. Lemos, F. C. Braga, and S. F. Cortes, "Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol 3-kinase," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 109, no. 1, pp. 161–164, 2007.
- [9] G. C. Silva, F. C. Braga, M. P. Lima, J. L. Pesquero, V. S. Lemos, and S. F. Cortes, "Hancornia speciosa Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, no. 1, pp. 709–713, 2011.
- [10] G. C. Silva, F. C. Braga, V. S. Lemos, and S. F. Cortes, "Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract," *Phytomedicine*, vol. 23, no. 2, pp. 214–219, 2016.
- [11] A. C. Pereira, A. B. D. Pereira, C. C. L. Moreira et al., "Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 161, pp. 30–35, 2015.
- [12] A. B. Penido, S. M. de Morais, A. B. Ribeiro et al., "Medicinal plants from Northeastern Brazil against Alzheimer's disease," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, Article ID 1753673, 7 pages, 2017.
- [13] D. C. Endringer, J. M. Pezzuto, C. M. Soares, and F. C. Braga, "L-(+)-Bornesitol," *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, vol. E63, no. 2, pp. o1067–o1068, 2007.
- [14] A. B. D. Pereira, T. M. Verissimo, M. A. d. Oliveira, I. A. d. Araujo, R. J. Alves, and F. C. Braga, "Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with *p*-toluenesulfonyl chloride," *Journal of Chromatography B*, vol. 887–888, pp. 133–137, 2012.
- [15] K. Bastos, C. Dias, Y. Nascimento et al., "Identification of phenolic compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) leaves by uhplc orbitrap-hrms," *Molecules*, vol. 22, no. 1, p. 143, 2017.
- [16] R. B. Birari and K. K. Bhutani, "Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential," *Drug Discovery Today*, vol. 12, no. 19–20, pp. 879–889, 2007.
- [17] P. Slanc, B. Doljak, S. Kreft, M. Lunder, D. Janes, and B. Strukelj, "Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition," *Phytotherapy Research*, vol. 23, no. 6, pp. 874–877, 2009.
- [18] A. de la Garza, F. Milagro, N. Boque, J. Campión, and J. Martínez, "Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment," *Planta Medica*, vol. 77, no. 8, pp. 773–785, 2011.
- [19] E. J. Jeong, J. Jegal, J. Ahn, J. Kim, and M. H. Yang, "Anti-obesity effect of *Dioscorea oppositifolia* extract in high-fat diet-induced obese mice and its chemical characterization," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 39, no. 3, pp. 409–414, 2016.
- [20] World Health Organization (WHO), 2006, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/in18/8/2006/>.
- [21] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 3, pp. 629–661, 2016.
- [22] AOAC, *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA, USA, 16th edition, 1995.
- [23] C. Nogueira, A. Iglesias, X. Feás, and L. M. Estevinho, "Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 9, pp. 11173–11187, 2012.

- [24] L. Barros, S. A. Heleno, A. M. Carvalho, and I. C. F. R. Ferreira, "Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, no. 3, pp. 544–550, 2010.
- [25] T. Gomes, X. Feás, A. Iglesias, and L. M. Estevinho, "Study of organic honey from the Northeast Portugal," *Molecules*, vol. 16, no. 7, pp. 5374–5386, 2011.
- [26] NP 3788, *Microbiologia Alimentar – Regras Gerais para a Contagem de Microrganismos a 30°C*, Instituto Português da Qualidade, Portugal, 2002.
- [27] ISO 21527–2, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds – Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95*, International Standards Organization, Geneva, Switzerland, 2008.
- [28] NP 4400–1, *Microbiologia Alimentar: Norma Portuguesa: Regras Gerais para Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva: Parte 1: Técnica com Confirmação de Colónias (Método corrente)*, Instituto Português da Qualidade, Portugal, 2002.
- [29] AOAC, *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 16th edition, 2005.
- [30] ISO 15213, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Sulfite-Reducing Bacteria Growing under Anaerobic Conditions*, International Standards Organization, Geneva, Switzerland, 2003.
- [31] P. S. Negi, G. K. Jayaprakasha, and B. S. Jena, "Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts," *Food Chemistry*, vol. 80, no. 3, pp. 393–397, 2003.
- [32] F. S. Şenol, I. Orhan, F. Celep et al., "Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities," *Food Chemistry*, vol. 120, no. 1, pp. 34–43, 2010.
- [33] I. E. Orhan and M. T. H. Khan, "Flavonoid derivatives as potent tyrosinase inhibitors - a survey of recent findings between 2008–2013," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 12, pp. 1486–1493, 2014.
- [34] S. K. Ling, T. Tanaka, and I. Kouno, "Effects of iridoids on lipoxygenase and hyaluronidase activities and their activation by β -glucosidase in the presence of amino acids," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 26, no. 3, pp. 352–356, 2003.
- [35] H. Gao, Y. N. Huang, B. Gao, P. Y. Xu, C. Inagaki, and J. Kawabata, " α -glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L.," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 3, pp. 1195–1201, 2008.
- [36] B. Mayur, S. Sandesh, S. Shruti, and S. Sung-Yum, "Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L.," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 4, no. 15, pp. 1547–1553, 2010.
- [37] C. Roh and U. Jung, "Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 2, pp. 1710–1719, 2012.
- [38] D. M. O. Aragão, L. Guarize, J. Lanini, J. C. da Costa, R. M. G. Garcia, and E. Scio, "Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 128, no. 3, pp. 629–633, 2010.
- [39] A. da Silva Arruda, R. Q. de Faria, N. Peixoto et al., "Avaliação da produção de látex em mangabeiras do cerrado goiano," *Ciência Florestal*, vol. 26, no. 3, pp. 939–948, 2016.
- [40] W. Kneifel, E. Czech, and B. Kopp, "Microbial contamination of medicinal plants - a review," *Planta Medica*, vol. 68, no. 1, pp. 5–15, 2002.
- [41] I. Sospedra, J. M. Soriano, and J. Mañes, "Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs commercialized in Spain," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 65, no. 4, pp. 364–368, 2010.
- [42] S. A. Moawad, A. H. el-Ghorab, M. Hassan, H. Nour-Eldin, and M. M. el-Gharabli, "Chemical and microbiological characterization of Egyptian cultivars for some spices and herbs commonly exported abroad," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 6, no. 7, article 56414, p. 16, 2015.
- [43] Codex Alimentarius Commission, 21st Session, "Code of hygienic practice for spices and dried aromatic herbs. CAC/RCP 42–1995. Adopted 1995. Revised 2014," 1995, May 2018, http://www.fao.org/input/download/standards/27/CXP_042e_2014.pdf.
- [44] European Spice Association (ESA) Quality Minima Document Rev. 5, "Adopted at the meeting of the Technical Commission on 27th October 2015," May 2018, <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/publications-esa>.
- [45] B. Allam-Ndoul, F. Guénard, O. Barbier, and M. C. Vohl, "Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages," *Lipids in Health and Disease*, vol. 15, no. 1, p. 69, 2016.
- [46] J. L. Guil, M. E. Torija, J. J. Giménez, and I. Rodríguez, "Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 719, no. 1, pp. 229–235, 1996.
- [47] P. C. Calder, "n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 83, no. 6, pp. 1505S–1519S, 2006.
- [48] H. F. Turk and R. S. Chapkin, "Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 88, no. 1, pp. 43–47, 2013.
- [49] L. Moreira, L. G. Dias, J. A. Pereira, and L. Estevinho, "Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 11, pp. 3482–3485, 2008.
- [50] A. El-Agamey, G. M. Lowe, D. J. McGarvey et al., "Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 430, no. 1, pp. 37–48, 2004.
- [51] H. Van den Berg, R. Faulks, H. F. Granado et al., "The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, no. 7, pp. 880–912, 2000.
- [52] J. F. Pinto, *Nutracêuticos e Alimentos Funcionais*, Lidel, Lisboa, Portugal, 1st edition, 2010.
- [53] M. M. B. Almeida, P. H. M. de Sousa, Â. M. C. Arriaga et al., "Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2155–2159, 2011.
- [54] P. dos Santos da Rocha, C. A. Carollo, W. O. Schmitz et al., "Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 7910340, 8 pages, 2016.
- [55] O. A. Wintola and A. J. Afolayan, "The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora africana* Thunb. used as antidiarrheal in Eastern

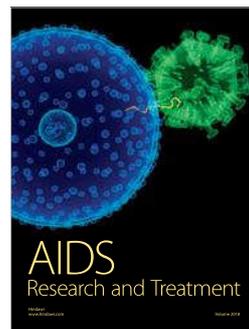
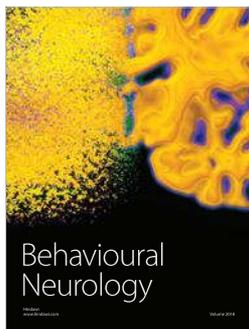
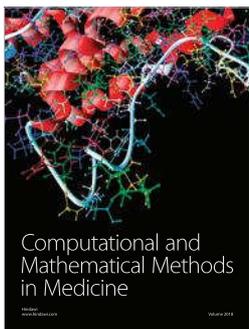
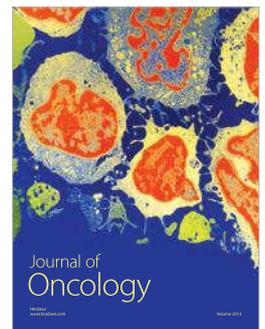
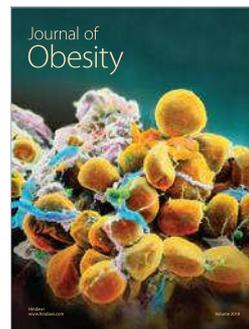
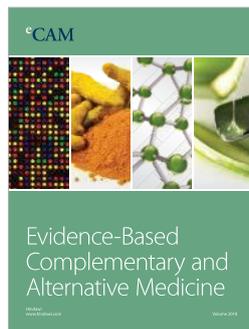
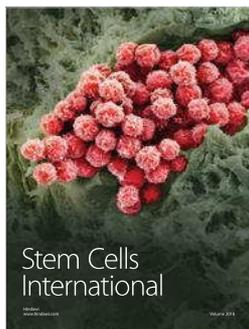
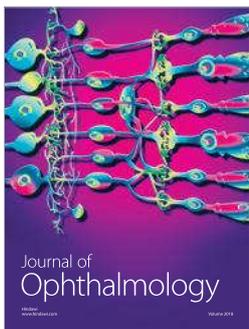
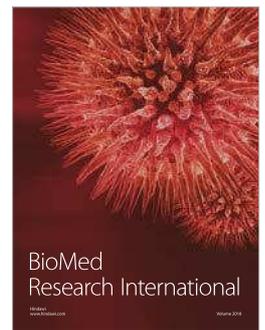
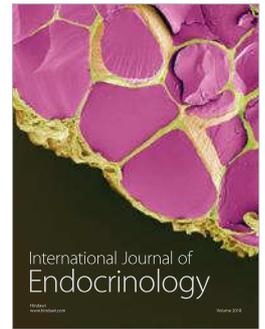
- Cape Province, South Africa," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 1, p. 307, 2015.
- [56] J. C. Casagrande, L. F. B. Macorini, K. A. Antunes et al., "Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, article e112748, 2014.
- [57] R. H. O. Lopes, L. F. B. Macorini, K. A. Antunes et al., "Antioxidant and hypolipidemic activity of the hydroethanolic extract of *Curatella americana* L. leaves," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 9681425, 6 pages, 2016.
- [58] P. dos Santos da Rocha, J. F. Campos, V. Nunes-Souza et al., "Antioxidant and protective effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi against doxorubicin-induced toxicity," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 184, no. 3, pp. 869–884, 2018.
- [59] R. Henneberg, M. F. Otuki, A. E. F. Furman, P. Hermann, A. J. d. Nascimento, and M. S. S. Leonart, "Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea," *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 35, no. 1, pp. 52–55, 2013.
- [60] V. Umarani, S. Muvvala, A. Ramesh, B. V. S. Lakshmi, and N. Sravanthi, "Rutin potentially attenuates fluoride-induced oxidative stress-mediated cardiotoxicity, blood toxicity and dyslipidemia in rats," *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 25, no. 2, pp. 143–149, 2015.
- [61] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, 2006.
- [62] L. R. Ferguson, M. Philpott, and N. Karunasinghe, "Dietary cancer and prevention using antimutagens," *Toxicology*, vol. 198, no. 1–3, pp. 147–159, 2004.
- [63] M. Arriaga-Alba, R. Montero-Montoya, and J. J. Espinosa-Aguirre, "The Ames test in XXI century," *Research & Reviews: A Journal of Toxicology*, vol. 2, pp. 23–37, 2012.
- [64] G. Fronza, P. Campomenosi, R. Iannone, and A. Abbondandolo, "The 4-nitroquinoline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions," *Nucleic Acids Research*, vol. 20, no. 6, pp. 1283–1287, 1992.
- [65] M. Gulluce, G. Agar, O. Baris, M. Karadayi, F. Orhan, and F. Sahin, "Mutagenic and antimutagenic effects of hexane extract of some *Astragalus* species grown in the eastern Anatolia region of Turkey," *Phytotherapy Research*, vol. 24, no. 7, pp. 1014–1018, 2010.
- [66] L. Alpsoy, A. Yildirim, and G. Agar, "The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 25, no. 2, pp. 121–127, 2009.
- [67] A. P. S. de Oliveira, J. F. de Sousa, M. A. da Silva et al., "Estrogenic and chemopreventive activities of xanthones and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae)," *Steroids*, vol. 78, no. 11, pp. 1053–1063, 2013.
- [68] N. J. Ruiz-Pérez, M. Arriaga-Alba, J. Sánchez-Navarrete, R. Camacho-Carranza, S. Hernández-Ojeda, and J. J. Espinosa-Aguirre, "Mutagenic and antimutagenic effects of *Heterotheca inuloides*," *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, p. 6743, 2014.
- [69] E. M. de Lima, D. S. P. Cazelli, F. E. Pinto et al., "Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity," *Pharmacognosy Magazine*, vol. 12, no. 45, pp. 42–46, 2016.
- [70] S. Uysal and A. Aktumsek, "A phytochemical study on *Potentilla anatolica*: an endemic Turkish plant," *Industrial Crops and Products*, vol. 76, pp. 1001–1007, 2015.
- [71] K. Bhullar and H. Rupasinghe, "Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 891748, 18 pages, 2013.
- [72] E. Neagu, G. Paun, C. Albu, and G. L. Radu, "Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 52, pp. 1–6, 2015.
- [73] P. Anand, B. Singh, and N. Singh, "A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 3, pp. 1175–1180, 2012.
- [74] M. R. Roberson and L. E. Harrell, "Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism," *Brain Research Reviews*, vol. 25, no. 1, pp. 50–69, 1997.
- [75] K. Blennow, M. J. de Leon, and H. Zetterberg, "Alzheimer's disease," *The Lancet*, vol. 368, no. 9533, pp. 387–403, 2006.
- [76] S. B. Dunnett and H. C. Fibiger, "Chapter 49: role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia," *Progress in Brain Research*, vol. 98, pp. 413–420, 1993.
- [77] B. Jayaprakasam, K. Padmanabhan, and M. G. Nair, "Withanamides in *Withania somnifera* fruit protect PC-12 cells from β -amyloid responsible for Alzheimer's disease," *Phytotherapy Research*, vol. 24, no. 6, pp. 859–863, 2010.
- [78] A. Contestabile, "The history of the cholinergic hypothesis," *Behavioural Brain Research*, vol. 221, no. 2, pp. 334–340, 2011.
- [79] A. K. Singhal, O. P. Bangar, and V. Naithani, "Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms," *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, vol. 2, no. 2, pp. 84–91, 2012.
- [80] A. O. Ademosun, G. Oboh, F. Bello, and P. O. Ayeni, "Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities," *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, vol. 21, no. 4, 2016.
- [81] J. K. Cho, Y. B. Ryu, M. J. Curtis-Long et al., "Cholinesterase inhibitory effects of geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 8, pp. 2595–2602, 2012.
- [82] G. N. Choi, J. H. Kim, J. H. Kwak et al., "Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure," *Food Chemistry*, vol. 132, no. 2, pp. 1019–1024, 2012.
- [83] M. T. H. Khan, I. Orhan, F. S. Şenol et al., "Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 181, no. 3, pp. 383–389, 2009.
- [84] K. Bao, Y. Dai, Z. B. Zhu, F. J. Tu, W. G. Zhang, and X. S. Yao, "Design and synthesis of biphenyl derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 18, pp. 6708–6714, 2010.

- [85] H. Fedorow, F. Tribl, G. Halliday, M. Gerlach, P. Riederer, and K. Double, "Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease," *Progress in Neurobiology*, vol. 75, no. 2, pp. 109–124, 2005.
- [86] T. Hasegawa, "Tyrosinase-expressing neuronal cell line as *in vitro* model of Parkinson's disease," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 11, no. 3, pp. 1082–1089, 2010.
- [87] D. T. Dexter, J. Sian, S. Rose et al., "Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease," *Annals of Neurology*, vol. 35, no. 1, pp. 38–44, 1994.
- [88] Z. I. Alam, A. Jenner, S. E. Daniel et al., "Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra," *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, no. 3, pp. 1196–1203, 1997.
- [89] A. Abirami, G. Nagarani, and P. Siddhuraju, "*In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits," *Food Science and Human Wellness*, vol. 3, no. 1, pp. 16–25, 2014.
- [90] D. Kim, J. Park, J. Kim et al., "Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 3, pp. 935–941, 2006.
- [91] T. Y. Lim, Y. Y. Lim, and C. M. Yule, "Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species," *Food Chemistry*, vol. 114, no. 2, pp. 594–599, 2009.
- [92] Y. K. Han, Y. J. Park, Y. M. Ha et al., "Characterization of a novel tyrosinase inhibitor, (2*RS*,4*R*)-2-(2,4-dihydroxyphenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (MHY384)," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, vol. 1820, no. 4, pp. 542–549, 2012.
- [93] K. H. Wang, R. D. Lin, F. L. Hsu et al., "Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 106, no. 3, pp. 353–359, 2006.
- [94] K. Itoh, N. Hirata, M. Masuda et al., "Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 32, no. 3, pp. 410–415, 2009.
- [95] A. Pott and V. J. Pott, *Plantas do Pantanal*, EMBRAPA, Planaltina, D.F., Brazil, 1994.
- [96] G. J. Wang, Y. M. Chen, T. M. Wang, C. K. Lee, K. J. Chen, and T. H. Lee, "Flavonoids with iNOS inhibitory activity from *Pogonatherum crinitum*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 118, no. 1, pp. 71–78, 2008.
- [97] T. Koda, Y. Kuroda, and H. Imai, "Rutin supplementation in the diet has protective effects against toxicant-induced hippocampal injury by suppression of microglial activation and pro-inflammatory cytokines: protective effect of rutin against toxicant-induced hippocampal injury," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 29, no. 4, pp. 523–531, 2009.
- [98] D. G. Marinho, D. S. Alviano, M. E. Matheus, C. S. Alviano, and P. D. Fernandes, "The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 2, pp. 530–537, 2011.
- [99] E. Harunari, C. Imada, Y. Igarashi, T. Fukuda, T. Terahara, and T. Kobayashi, "Hyaluromycin, a new hyaluronidase inhibitor of polyketide origin from marine *Streptomyces* sp.," *Marine Drugs*, vol. 12, no. 1, pp. 491–507, 2014.
- [100] A. Asari, T. Kanemitsu, and H. Kurihara, "Oral administration of high molecular weight hyaluronan (900 kDa) controls immune system via toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 32, pp. 24751–24758, 2010.
- [101] R. Prevo, S. Banerji, D. J. P. Ferguson, S. Clasper, and D. G. Jackson, "Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 22, pp. 19420–19430, 2001.
- [102] M. Litwiniuk, A. Krejner, M. S. Speyrer, A. R. Gauto, and T. Grzela, "Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration," *Wounds*, vol. 28, no. 3, pp. 78–88, 2016.
- [103] A. Pascoal, S. Rodrigues, A. Teixeira, X. Féas, and L. M. Estevinho, "Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 63, pp. 233–239, 2014.
- [104] M. A. Vazquez Prieto, A. Bettaieb, C. Rodriguez Lanzi et al., "Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and 3T3-L1 adipocytes," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 59, no. 4, pp. 622–633, 2015.
- [105] M. D. Jensen, D. H. Ryan, C. M. Apovian et al., "2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 25, Part B, pp. 2985–3023, 2014.
- [106] C. M. Apovian, L. J. Aronne, D. H. Bessesen et al., "Pharmacological management of obesity: an Endocrine Society clinical practice guideline," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 100, no. 2, pp. 342–362, 2015.
- [107] K. Sakulnarmrat and I. Konczak, "Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and *in vitro* inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndrome," *Food Chemistry*, vol. 134, no. 2, pp. 1011–1019, 2012.
- [108] V. E. G. Rodrigues and D. A. Carvalho, "Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais," *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 25, pp. 102–123, 2001.
- [109] E. B. de Oliveira, C. Humeau, L. Chebil et al., "A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 59, no. 1–3, pp. 96–105, 2009.
- [110] World Health Organization (WHO), *Global Report on Diabetes*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2016.
- [111] P. Zimmet, K. G. M. M. Alberti, and J. Shaw, "Global and societal implications of the diabetes epidemic," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 782–787, 2001.
- [112] S. Yue, J. Wu, J. Zhang, L. Liu, and L. Chen, "The relationship between betatrophin levels in blood and T2DM: a systematic review and meta-analysis," *Disease Markers*, vol. 2016, Article ID 9391837, 7 pages, 2016.
- [113] V. Beejmohun, M. Peytavy-Izard, C. Mignon et al., "Acute effect of Ceylon cinnamon extract on postprandial glycemia: alpha-amylase inhibition, starch tolerance test in rats, and

- randomized crossover clinical trial in healthy volunteers,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 14, no. 1, article 351, 2014.
- [114] R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami, and B. Chauhan, “Microbial α -amylases: a biotechnological perspective,” *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 11, pp. 1599–1616, 2003.
- [115] K. Anam, R. M. Widharna, and D. Kusriani, “ α -Glucosidase inhibitor activity of *Terminalia* species,” *International Journal of Pharmacology*, vol. 5, no. 4, pp. 277–280, 2009.
- [116] A. Fred-Jaiyesimi, A. Kio, and W. Richard, “ α -Amylase inhibitory effect of 3β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf,” *Food Chemistry*, vol. 116, no. 1, pp. 285–288, 2009.



Hindawi
Submit your manuscripts at
www.hindawi.com



CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que o EEHS apresenta qualidade e segurança microbiológica, atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antimutagênica, antiobesidade e anti-hiperglicemiante, as quais são atribuídas à composição química, incluindo carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados, ácidos fenólicos e flavonoides e/ou ao sinergismo entre os diferentes compostos presentes no extrato. Assim, EEHS apresenta potencial terapêutico na prevenção e/ou tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, bem como em doenças relacionadas ao estresse oxidativo, câncer, obesidade e diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO (2015). Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. *J Evid Based Complementary Altern Med.* Oct 4. pii: 2156587215610032.

Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, et al. (2013). “Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 72, pp. 35–45.

Aguiar Filho SP, de Bosco J, Araujo IA (1998). A mangabeira (*Hancornia speciosa*): domesticação e técnicas de cultivo. João Pessoa, Emepa-PB, p. 26.

Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L. et al. (2012). Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 18:439–448.

Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ. et al. (1997) Oxidative Dna Damage in the Parkinsonian Brain: An Apparent Selective Increase in 8-Hydroxyguanine Levels in Substantia Nigra. *J. Neurochem.* 69, 1196–1203.

Alpsoy L, Yildirim A, Agar G (2009). The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicol Ind Health*, 25:121–127.

Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA (2004) Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamses in the United States. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:533-537.

Alzheimer's A (2015). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.*, 11, 332–384.

American Câncer Society (2016). What is acute myeloid leukemia? <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-what-is-aml>. Acesso em: 01 de março de 2016

American Diabetes Association (ADA) (2012). Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care*. 35, s64 - s 71.

Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J (2015). Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15: 59 doi10.1186/s12906-015-0580-0

Antunes KA, Baldivia DD, da Rocha PD, Casagrande JC, Argandoña EJ, Vieira MD, Cardoso CA, Dos Santos EL, de Picoli Souza K (2016). Antiobesity Effects of Hydroethanolic Extract of *Jacaranda decurrens* Leaves. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016:4353604. doi: 10.1155/2016/4353604.

Anvisa (2016). Resistência microbiana. Mecanismo e impactos clínicos. http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm. Acesso em: 02 de março de 2016.

Appelbaum PC (2012) and Beyond (2012): Potential for the Start of a Second Pre-antibiotic Era? *J Antimicrob Chemother*. 67 (9): 2062–8.

Appleton J (2010). Evaluating the Bioavailability of Isoquercetin. *Nat Med J*. 2: 1-6.

Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, McDonnell ME, Murad MH, Pagotto U, Ryan DH, Still CD; Endocrine Society (2015). Endocrine Society. Pharmacological management of obesity: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 100 (2): 342-362. doi: 10.1210/jc.2014-3415.

Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM (2004). Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 52, 1124-1131.

Araldi RP, Rechiutti BM, Mendes TB, Itoh ET, Souza EB (2014). Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. *Genet Mol Res*. Jul 7;13(3):5207-20. doi: 10.4238/2014.July.7.14.

Arts IC, Sesink AL, Faassen-Peters M, Hollman PC (2004). The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides, *Br. J. Nutr.* 91, 841–847.

Arvanitidou M, Spaia S, Velegraki A, Pazarloglou M, Kanetidis D, Pangidis P, Askepidis N, Katsinas C, Vayonas G, Katsouyannopoulos V (2000). High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *The Journal Hospital Infection*, 45, 225-230.

Asari A, Kanemitsu T, Kurihara H (2010). Oral administration of high molecular weight hyaluronan (900 kDa) controls immune system via toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 285, 24751–24758.

Assumpção CF, Bachiega P, Morzelle MC, Nelson DL, Ndiaye EA, Rios AO, Souza LC (2014). Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.7, p.1297-1303, <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130855>.

Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhão TA, de Souza CP, Araujo DV (2012). The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 12:440. doi:10.1186/1471-2458-12-440.

Baker JR, Dong S, Pritchard DG (2002). The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Biochem. J.* 365, 317–322.

Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, Symoens F, Antoine N, Mignon B (2012). Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*. May; 55 (3): 218-23. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02081.x. Epub 2011 Aug 11.

Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefeuvre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P (2005). Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell*. 120: 275–285.

Bansal S, Vyas S, Bhattacharya S, Sharma M (2013). Catechin prodrugs and analogs: a new array of chemical entities with improved pharmacological and pharmacokinetic properties. *Nat Prod Rep*. Oct 11;30(11):1438-54. doi: 10.1039/c3np70038k.

Bao K, Dai Y, Zhu ZB, Tu FJ, Zhang WG, Yao XS (2010). Design and synthesis of biphenyl derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 6708–6714.

Barbeau, A (1969). Treatment of Parkinson's Disease by L-Dopa. *Union Med. Can.* 98, 183–186.

Barros IMC, Ferreira AS, Resck IS (2008). Fitotoxicidade dos extratos das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes. Instituto de Química; Instituto de Biologia. Universidade de Brasília. Dissertação, p. 194.

Barski L, Nevzorov R, Rabaev E, Jotkowitz A, Harman-Boehm I, Zektser M, Zeller L, Shleyfer E, Almog Y (2012). Diabetic ketoacidosis: clinical characteristics, precipitating factors and outcomes of care. *Isr Med Assoc J.* 14, 299-303.

Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B (1988). Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat. Res.* 202, 307–324.

Bataille D, Dalle S (2014). The forgotten members of the glucagon family. *Diabetes Res Clin Pract.* 106 (1): 1-10. doi: 10.1016/j.diabres.2014.06.010.

Batchelder RJ, Calder RJ, Thomas CP (2004). In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Camellia sinensis*. *Int J Pharm.* Sep 28;283(1-2):45-51.

Bastos KX, Dias CN, Nascimento YM, da Silva MS, Langassner SM, Wessjohann LA, Tavares JF (2017). Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. *Molecules.* Jan 15;22(1). pii: E143. doi: 10.3390/molecules22010143.

Baynes JW, Thorpe SR (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9.

Bechtel DH (1989). Molecular dosimetry of hepatic aflatoxin B1-DNA adducts: linear correlation with hepatic cancer risk, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 10, 74–81.

Bellou S, Karali E, Bagli E, Al-Maharik N, Morbidelli L, Ziche M, Adlercreutz H, Murphy C, Fotsis T (2012). The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Molecular Cancer*, 2012, 11: 35.

Benabid AL (2009). Targeting the Caudal Intralaminar Nuclei for Functional Neurosurgery of Movement Disorders. *Brain Res. Bull.* 78, 109–112.

Benabid AL, Chabardes S, Mitrofanis, J, Pollak P (2009). Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus for the Treatment of Parkinson's Disease. *Lancet Neurol.* 2009, 8, 67–81.

Ben-Yaacov R, Knoller S, Caldwell GA, Becker JM, Koltin Y (1994). *Candida albicans* Gene Encoding Resistance to Benomyl and Methotrexate Is a Multidrug Resistance Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 648-652.

Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP (2010). The Genetics of Parkinson Disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*.; 23 (4): 228-242. doi:10.1177/0891988710383572.

Birari R, Bhutani K (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*. 12: 879-889.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization journal*. ; 5 (1): 9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961). The L-3,4-Dioxyphenylalanine (Dopa)-Effect in Parkinson-Akinesia. *Wien. Klin. Wochenschr*. 73, 787–788.

Bizerra FC, Jimenez-Ortigosa C, Souza AC, Breda GL, Queiroz-Telles F, Perlin DS, Colombo AL. Breakthrough (2014). Candidemia Due to Multidrug-Resistant *Candida glabrata* during Prophylaxis with a Low Dose of Micafungin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 58(4):2438–40. doi: 10.1128/AAC.02189-13.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368, 387–403.

Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical, *Eur. J. Pharmacol*. 585, 325–337.

Botterweck AA, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J, van den Brandt PA (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food Chem toxicol*. Jul; 38 (7): 599-605.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 25: 1025–1040.

Browlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813-820.

Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R (2001). Approval Summary: Gemtuzumab Ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. Report from FDA. *Clinical Cancer Research*. 7: 1.490-96.

Brown DG, Lister T, May-Dracka TL (2014). New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24: 413-418.

Bushman JL (1998). Green tea and cancer in humans: a review in literature. *Nutr. Cancer* 31, 151–158

Cai H, Cong WN, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B (2012). Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr. Alzheimer Res*. 9 (1), 5–17.

Calne DB, Teychenne PF, Leigh PN, Bamji AN, Greenacre JK (1974). Treatment of Parkinsonism with Bromocriptine. *Lancet* 1974, 2, 1355–1356.

Campos JF, de Castro DT, Damião MJ, Vieira Torquato HF, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, de Picoli Souza K, Dos Santos EL (2016). The Chemical Profile of *Senna velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8405957.

Campos JF, Espindola PPT, Torquato HFV, Vital WD, Justo GZ, Silva DB, Carollo CA, de Picoli Souza K, Paredes-Gamero EJ, Dos Santos EL (2017). Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. *Front Pharmacol*. 14; 8:466. doi: 10.3389/fphar.2017.00466. eCollection 2017.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.*, 2009, v. 22:291-321.

Cantón, R (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect.* Jan;15 Suppl 1:20-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x.

Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, Rossolini GM, Souli M, Giamarellou H (2010). Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 16:102–111.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature.* 180, 1200.

Carlsson A, Waldeck BA (1958). Fluorimetric Method for the Determination of Dopamine (3-Hydroxytyramine). *Acta Physiol. Scand.* 44, 293–298.

Casagrande JC, Macorini LF, Antunes KA, Santos UP, Campos JF, Dias-Júnior NM, Sangalli A, Lima Cardoso CA, do Carmo Vieira M, Rabelo LA, Paredes-Gamero EJ, Dos Santos EL, de Picoli Souza K (2014). Antioxidant and Cytotoxic Activity of Hydroethanolic Extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. *PLoS ONE.* 9 (11): e112748 doi:10.1371/journal.pone.0112748

Cassone A, Cauda R (2012). Candida and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS,* 26:1457–1472. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283536ba8>. 2.

Castanheira M, Messer SA, Jones RN, Farrell DJ, Pfaller MA. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012). worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 44(4):320–6.

Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States (2013). Available online: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>. Acessado em: 02 de março de 2016.

Cesen, M.H.; Pegan, K.; Spes, A, Turk B (2012). Lysosomal pathway to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*. 318: 1245–1251.

Chandra H, Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Mishra AP, Nautiyal AR. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review (2017). Stankovic MS, ed. *Plants*. 6 (2): 16. doi:10.3390/plants6020016.

Chelazzi C, Pettini E, Villa G, De Gaudio AR (2015). Epidemiology, associated factors and outcomes of ICU-acquired infections caused by Gram-negative bacteria in critically ill patients: an observational, retrospective study. *BMC Anesthesiol*. 2015 Sep 21;15:125. doi: 10.1186/s12871-015-0106-9.

Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 49:481-93.

Cheng AY, Fantus IG (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*. 172 (2): 213-26.

Cheng KW, Wong CC, Chao J, Lo C, Chen F, Chu IK, Che CM, Ho CT, Wang M (2009). Inhibition of mutagenic PhIP formation by epigallocatechin gallate via scavenging of phenylacetaldehyde. *Mol Nutr Food Res*. Jun; 53 (6): 716-25. doi: 10.1002/mnfr.200800206.

Cheng S, Ding L, Zhen Y, Lin P, Zhu Y, Chen Y, Hu X (1991). Progress in studies on the antimutagenicity and anticarcinogenicity of green tea epicatechins. *Chin Med Sci J. Dec*; 6 (4): 233-8.

Chessa D, Ganau G, Mazzarello V (2015). An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *J Infect Dev Ctries. 9* (6): 547-550. doi:10.3855/jidc.6923.

Chesselet MF, Richter F (2011). Modelling of Parkinson's Disease in Mice. *Lancet Neurol. 10*, 1108–1118.

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell. 137*:1112-1123 doi:10.1016/j.cell.2009.05.037.

Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeon CH, Jeong HR, Lee UK, Heo RJ (2012). Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chemistry*, vol. 132, no. 2, pp. 1019–1024.

Chopra I, Roberts M (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev. 65*: 239- 60.

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromol. Med. 12*, 1–12.

Chwieralski CE, Welte T, Uhling FB (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis. 11*: 143–149. DOI: 10.1007/s10495-006-3486-y.

Collins T (1999). Acute and chronic inflammation. In: Cotran, R.S.; Kumar R, V.; Collins, T (Eds.). *Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders. cap. 3, p. 50-88.*

Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, Nouér SA, Nucci M (2014). Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year Period. *M. Intensive Care Med.* 40(10): 1489–98

Contestabile A (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behavioural Brain Research* 221, 334–340.

Convention on Biological Diversity (CDB) (2010). Disponível em: <http://www.cbd.int/iyb/doc/prints/iyb-report-2010-04-en.pdf>. (Acesso em: 08 jun. 2012).

Cook JW, Hewett CL, Hieger I (1933). The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III, *J. Chem. Soc.* 395–405.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17:1195–1214.

Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, Pellacani C (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 2986796. doi: 10.1155/2016/2986796.

Corrodi H, Fuxe K, Hökfelt T, Lidbrink P, Ungerstedt U (1973). Effect of Ergot Drugs on Central Catecholamine Neurons: Evidence for a Stimulation of Central Dopamine Neurons. *J. Pharm. Pharmacol.* 25, 409–412.

Cory S, Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2: 647–56.

Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y (2005). The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 26:166–174.

Crino M, Sacks G, Vandevijvere S, Swinburn B, Neal B (2015). The influence on population weight gain and obesity of the macronutrient composition and energy density of the food supply. *Curr Obes Rep.* 2015; 4 (1): 1-10. doi: 10.1007/s13679-014-0134-7.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009). “Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health,” *Natural Product Reports*, vol. 26, no. 8, pp. 1001–1043.

D'Andrea G (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 106, 256–271.

Dalar A, Konczak I (2013). Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Industrial Crops and Products* 44, 383– 390.

da Silva AO, Damaceno Alves A, Almeida DA, Balogun SO, de Oliveira RG, Aires Aguiar A, Soares IM, Marson-Ascêncio PG, Ascêncio SD, de Oliveira Martins DT (2014a). Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg. *J Ethnopharmacol.* 154 (2): 319-29. doi: 10.1016/j.jep.2014.03.017.

da Silva Marcondes DB, Reichert CL, de Andrade LF, de Moraes Santos CA, Weffort-Santos AM (2014b). Cytotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. *J Ethnopharmacol.* 2014b; 157: 243-50. doi: 10.1016/j.jep.2014.09.018

Davies P, Maloney AJF (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2, 1403.

de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IM, Keijer J, Hollman PC (2005) Tissue distribution of quercetin in rats and pigs, *J. Nutr.* 135, 1718–1725.

de Duve C (2005). The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol.* 7: 847–849.

De Flora S (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.*, 402:151–158.

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albin A (2001). Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res* 480–481:9–22

Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 313–321.

De la Cruz F, García Lobo JM, Davies J (2002) Antibiotic resistance: how bacterial populations respond to a simple evolutionary force. In: Lewis KA, Salyers AA, Taber HW, Wax RG, eds. *Bacterial resistance to antimicrobial*. New York: Marcel Dekker Inc., 19–36

de la Garza AL, Milagro FI, Boque N, Campión J, Martínez JA (2011). Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med.* May; 77 (8): 773-85. doi: 10.1055/s-0030-1270924.

de Lima EM, Cazelli DS, Pinto FE, Mazuco RA, Kalil IC, Lenz D, Scherer R, de Andrade TU, Endringer DC (2016). Essential Oil from the Resin of *Protium heptaphyllum*: Chemical Composition, Cytotoxicity, Antimicrobial Activity, and Antimutagenicity. *Pharmacognosy Magazine*. 12 (Suppl 1): S42-S46. doi: 10.4103/0973-1296.176113.

Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, RodriguezBano J (2013). Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Ther Adv Infect Dis*. 1 (2): 49–69.

Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A (2001). A transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal*. 2001 Dec; 3 (6): 957-67.

Deretic V (2010). Autophagy in infection. *Current opinion in cell biology genetic*. 22 (2), pp.252–62.

Drzewiecka D (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol*. Nov; 72 (4): 741-758

Dias LG, Pereira AP, Estevinho LM (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology* 50, 4246–4253.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Participants Group (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis*. 32 (suppl 2): S114–S132.

Delcros JG, Mehlen P (2013). Dependence receptors: life or death choices. *Bull Cancer*. Dec; 100 (12): 1261-74. doi: 10.1684/bdc.2013.1858.

Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, et al (1994). Indices of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Individuals with Incidental Lewy Body Disease. *Ann. Neurol.* 35, 38–44.

Dion ME, Agler M, Milner JA (1997). S-allyl cysteine inhibits nitrosomorpholine formation and bioactivation. *Nutr Cancer.* 28:1–6.

DiNicolantonio JJ, Bhutani J, O’Keefe JH (2015). Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Open Heart.* 2 (1): e000327. doi:10.1136/openhrt-2015-000327.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassona D, Stocker P, Vidal N (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry.* 97 (4): 654-660.

Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, da Mota VP, Colombo AL (2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One.* Jan 25; 11 (1): e0146909. doi: 10.1371/journal.pone.0146909. eCollection 2016.

Dong H, Yuede CM, Coughlan CA, Murphy KM, Csernansky JG (2009). Effects of donepezil on amyloid-beta and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease. *BrainRes.* 2009, 1303, 169–178.

Dwivedi M, Ahnn J (2009). Autophagy--is it a preferred route for lifespan extension? *BMB reports,* 42(2), pp.62–71.

Dzidic S, Suskovic J, Kos B (2008). Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Food Technology Biotechnology., 46(11), 11-21.

Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C (2009). Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. Mutagenesis. 24:341–349.

Ehrenbrink G, Hakenhaar FS, Salomon TB, Petrucci AP, Sandri MR, Benfato MS (2006). Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. Exp Gerontol, 41, 368-371.

Eisenstein BI, Zaleznik DF, Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (2000). (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 5 th (ed). Vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone., pp.2294-2309.

Elmore S (2013). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35: 495–516.

El-Sayed WM, Hussin WA (2013). Antimutagenic and antioxidant activity of novel 4-substituted phenyl-2,2'-bichalcophenes and azaanalogs. Drug Des Dev Ther. 7:73–81.

El-Sayed WM, Hussin WA, Al-Faiyz YS, Ismail MA (2013). The position of imidazopyridine and metabolic activation are pivotal factors in the antimutagenic activity of novel imidazo[1,2-a]pyridine derivatives. Eur J Pharmacol, 715:212–218.

Endringer DC (2007). Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes: inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Ph.D. Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Endringer DC, Pezzuto JM, Soares CM, Braga Fc (2007). L-(+)-Bornesitol. Acta Crystallographica. Section E: Structure Reports Online. 63: o1067-o1068.

Endringer DC, Pezzuto JM, Braga FC (2009). NF-KB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia Speciosa*. Phytomedicine. 16 1064–1069.

Endringer DC, Valadares YM, Campana PR, Campos JJ, Guimarães KG, Pezzuto JM, Braga FC (2010). Evaluation of Brazilian Plants on Cancer Chemoprevention Targets *In Vitro*. Phytother. Res. 24: 928–933.

Espindola PP, da Rocha Pdos S, Carollo CA, Schmitz WO, Pereira ZV, Vieira Mdo C, Dos Santos EL, de Picoli Souza K (2016). Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of Campomanesia adamantium O. Berg Root. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7910340. doi: 10.1155/2016/7910340.

Fahn S (2005). Parkinson Study Group. Does Levodopa Slow or Hasten the Rate of Progression of Parkinson's Disease? J. Neurol. 252 (Suppl. S4), Iv37–Iv42.

Fang YS, Tsai KJ, Chang YJ, Kao P, Woods R, Kuo PH, Wu CC, Liao JY, Chou SC, Lin V, Jin LW, Yuan HS, Cheng IH, Tu PH, Chen YR (2014). Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. Nat. Commun., 5, 4824.

Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL (2005). Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 75 (2): 109–24. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.02.001.

Feghali CA, Wright TM (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci. Jan 1;2:d12-26.

Feng J, Chen Q, Yu F, Wang Z, Chen S, Jin Z, Cai Q, Liu Y, He J (2016). Body mass index and risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Medicine (Baltimore)*. 95 (8): e2859. doi: 10.1097/MD.0000000000002859.

Ferguson LR, Chavan R, Harris PJ (2001). Changing concepts of dietary fiber: implications for carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 39, 155–169

Ferguson LR (2001). The role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 112–133.

Ferguson LR, Philpot M (2008). Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr.* 28:313–329.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 136, E359-386.

Ferreira EG, Lemos EEP, Souza FX (2005). Frutíferas. In: Sampaio EVSB, Pareyn FGC, Figueiroa JM, Santos Junior AG. (Ed.). *Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial*. Recife, Associação Plantas do Nordeste, 49-100.

Ferreira HC, Serra CP, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF (2007a). Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology.* 109: 161–164.

Ferreira HC, Serra CP, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF (2007b). Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine.* 14: 473–478.

Ferrera D, Mazzaro N, Canale C, Gasparini L (2014). Resting microglia react to Aβ₄₂ fibrils but do not detect oligomers or oligomer-induced neuronal damage. *Neurobiol. Aging.*, 35, 2444–2457.

Fischer C, Speth V, Fleig-Eberenz S, Neuhaus G (1997). Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *Plant Cell*. Oct; 9 (10): 1767-1780.

Firestone Tire. Rubber, CO. (United States) (1948). Improvements in or relating to synthetic rubber compositions and methods of making same., Disponível em: http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=GB&NR=613121&KC=&FT=E&locale=en_EP. (Acesso em: 11 de maio de 2012).

Fitch A, Fox C, Bauerly K, Gross A, Heim C, Judge-Dietz J, Kaufman T, Krych E, Kumar S, Landin D, Larson J, Leslie D, Martens N, Monaghan-Beery N, Newell T, O'Connor P, Spaniol A, Thomas A, Webb B. Prevention and management of obesity for children and adolescents (2013). Bloomington (MN): Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI). Jul. 94 p. ICSI website. www.icsi.org/_asset/tn5cd5/S184_nwww.ajmc.com_nMAY2016ReportObesityChildhood.pdf. Published July 2013. Accessed March 28, 2016.

Ng, M, et al (2014). Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet (London, England)*. 384 (9945): 766-781. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8.

Foris L, Snowden J. Proteus Mirabilis Infections (2017). [Updated 2017 Jul 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jun-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>

Fraga CG, Oteiza IO (2002). Iron Toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 180, 23-32.

Francis PT, Parsons CG, Jones RW (2012). Rationale for combining glutamatergic and cholinergic approaches in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. Nov; 12 (11): 1351-65. doi: 10.1586/ern.12.124

Fronza G, Campomenosi P, Iannone R, Abbondandolo A (1992). The 4-nitroquinoline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res.*, 20:1283–1287.

Frymus T, Gruffydd-Jones T, Pennisi MG, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Möstl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC (2013). Dermatophytosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*; 15: 598–604

Galustian C, Dalglish AG (2010). The power of the web in cancer drug discovery and clinical trial design: research without a laboratory? *Cancer Inform.* 9, 31-35.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation.* 14: 1237-1243 doi:10.1038/sj.cdd.4402148

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J et al (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 16: 1093–1107.

Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G (2011). Autophagy and innate immunity ally against bacterial invasion. *EMBO J.* Jul 22;30 (16): 3213-4. doi: 10.1038/emboj.2011.244.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19 (1): 107-20. doi: 10.1038/cdd.2011.96.

Garaulet M, Madrid JA (2009). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 20 (2): 127-134. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283292399.

García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and β -Amyloid. *Front Mol Neurosci.* 2011 Sep 13;4:22. doi: 10.3389/fnmol.2011.00022. eCollection 2011.

Gaschler MM, Stockwell BR (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 15; 482 (3): 419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.

Geller FC, Teixeira MR, Pereira AB, Dourado LP, Souza DG, Braga FC, Simões CM (2015). Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. *Phytother Res.* 12: 1887-93. doi: 10.1002/ptr.5438.

Gerson JE, Kaye R (2013). Formation and propagation of tau oligomeric seeds. *Front. Neurol.* 4, 93

Ghisleni DD, Braga Mde S, Kikuchi IS, Braşoveanu M, Nemţanu MR, Dua K, Pinto Tde J (2016). The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review. *Curr Pharm Des.* 22 (27): 4264-87.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 55: 178–94.

Giacobini E (2002). Long term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer' disease. *J. Neural Transm.Suppl.* 62, 181–187.

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC; Association With The LIFE Program (2016). The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses.* Mar; 59 (3): 145-50. doi: 10.1111/myc.12427.

Gill JP, Wang J, Millar DP (2011). DNA polymerase activity at the single-molecule level. *Biochem Soc Trans.* Apr; 39 (2): 595-9. doi: 10.1042/BST0390595.

Girish KS, Kemparaju K (2006). Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: Role in the management of poisonous bite. *Life Sci.* 78, 1433–1440.

Girish KS, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath BS (2009). Hyaluronidase inhibitors: A biological and therapeutic perspective. *Curr. Med. Chem.*, 16, 2261–2288.

Gomes S, Martins I, Fonseca AC, Oliveira CR, Resende R, Pereira CM (2014). Protective effect of leptin and ghrelin against toxicity induced by amyloid- β oligomers in a hypothalamic cell line. *J. Neuroendocrinol.* 26 (3), 176–185.

Gottlieb OR (1989). "The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity," *Phytochemistry*, vol. 28, pp. 2545–2558.

Grandi TMS, Trindade JÁ, Pinto MJF, Ferreira LL, Catella AC (1989). Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 3 (2): 185 – 224.

Greenamyre JT, Hastings TG (2004). Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 304 (5674): p. 1120-2.

Greenhalgh, DG (2017). Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. *Burns Trauma*. 5: 23. doi: 10.1186/s41038-017-0089-5

Greenway FL, Dunayevich E, Tollefson G, Erickson J, Guttadauria M, Fujioka K, Cowley MA; NB-201 Study Group (2009). Comparison of combined bupropion and naltrexone therapy for obesity with monotherapy and placebo. *J Clin Endocrinol Metab*. 94 (12): 4898-4906. doi: 10.1210/jc.2009-1350.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1983). Abnormal phosphorylation of the microtubule associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83, 4907–4913.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 37 (9): 1172-7.

Godwin-Austen RB, Smith NJ (1977). Comparison of the Effects of Bromocriptine and Levodopa in Parkinson's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 40, 479–482.

Gugler R, Leschik M, Dengler HJ (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses, *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 9, 229–234.

Gulluce M, Agar G, Baris O, Karadayi M, Orhan F, Sahin F (2010). Mutagenic and antimutagenic effects of hexane extract of some *Astragalus* species grown in the eastern Anatolia region of Turkey. *Phytother Res*. 24:1014–1018.

Guo Y, Bruno RS (2015). "Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, no. 3, pp. 201–210.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, 1-85.

Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. Nov; 59 (5): 1609-23.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). "The chemistry of free radicals and related reactive species", en "Free Radicals in Biology and Medicine," 3rd ed., Oxford University Press, 2, 67-70.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2000). *Free radicals in biology and medicine*. 2th.ed. Oxford: Clarendon Press.

Hamai A, Morikawa K, Horie K, Tokuyasu K (1989). Purification and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus dysgalactiae*. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2163–2168.

Harunari E, Imada C, Igarashi Y, Fukuda T, Terahara T, Kobayashi T (2014). Hyaluromycin, a new hyaluronidase inhibitor of polyketide origin from marine *Streptomyces* sp. *Mar Drugs*. Jan 21; 12 (1): 491-507. doi: 10.3390/md12010491.

Hasegawa T (2010). Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 11 (3): 1082–9. doi:10.3390/ijms11031082

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51 (4): 2-15 doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x.

Hay RJ (2017). Tinea Capitis: Current Status. *Mycopathologia*. 182(1): 87-93. doi:10.1007/s11046-016-0058-8.

He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 2009; 137: 1100–1111.

Hemminki A, Dipple DEG, Shuker FF (1994). DNA adducts: identification and biological significance, IARC Sci Publ. 135, 1–478.

Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 993–999.

Hertog MG¹, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands, *Nutr. Cancer*. 20, 21–29.

Heymsfield SB, Segal KR, Hauptman J, Lucas CP, Boldrin MN, Rissanen A, Wilding JP, Sjöström L (2000). Effects of weight loss with orlistat on glucose tolerance and progression to type 2 diabetes in obese adults. *Arch Intern Med*, 160: 1321–1326

Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J*. 2004;23:2134–45.

Hirschmann GS, Arias AR (1990). A survey of medicinal plants of Minas Gerais. Brazil. *J. Ethnopharmacol*. 29: 159-172.

Hopkins BJ, Hodgson WC (1998). Enzyme and biochemical studies of stonefish (*Synacneja trachynis*) and solidfish (*Gymnapistes marmoratus*). *Toxicon*, 791–793.

Horvitz HR (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 59:1701–6.

Hostettmann K, Marston A (2002). Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Rev*. 1, 275 - 285.

Hour TC, Liang YC, Chu IS, Lin JK (1999). Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food Chem Toxicol* 37:569–579.

Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid beta peptides in to Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16, 881–891.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010). Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009 – antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no brasil. Rio de Janeiro: IBGE.

Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada (IPEA) (2011). In: Junior, N. L. S. *Desafios da Bioprospecção no Brasil*, 1-29.

Irizarry MC, Growdon W, Gomez-Isla T, Newell K, George JM, Clayton DF, Hyman BT (1998) Nigral and Cortical Lewy Bodies and Dystrophic Nigral Neurites in Parkinson's Disease and Cortical Lewy Body Disease Contain Alpha-Synuclein Immunoreactivity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 334–337.

Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, SánchezGutiérrez M, Betanzos-Cabrera G, Sosa-Delgado SM, Sumaya-Martínez MT, Morales-González Á, Paniagua-Pérez R, Madrigal-Bujaidar E, Madrigal-Santillán E (2017). Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 1: Fruits and Polysaccharides. *Nutrients.* 9 (2): 102. doi:10.3390/nu9020102.

Izzotti A, Saccà SC, Cartiglia C, De Flora S (2003). Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *Am J Med.* 114:638–646.

Jackson MJ (1997). The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction, *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, S1–S2.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr; 58 (2): 71-96. doi: 10.3322/CA.2007.0010.

Jenner P (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 (Suppl 3), S26–S36, S36–S28.

Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, Hu FB, Hubbard VS, Jakicic JM, Kushner RF, Loria CM, Millen BE, Nonas CA, Pi-Sunyer FX, Stevens J, Stevens VJ, Wadden TA, Wolfe BM, Yanovski SZ (2014). American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; Obesity Society. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *J Am Coll Cardiol.* 63 (25 Pt B): 2985-3023. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.004.

Jeong EJ, Jegal J, Ahn J, Kim J, Yang MH (2016). Anti obesity Effect of *Dioscorea oppositifolia* Extract in High-Fat Diet Induced Obese Mice and Its Chemical Characterization. *Biol Pharm Bull.* Mar 1; 39 (3): 409-14. doi: 10.1248/bpb.b15-00849.

Kada T, Inoue T, Namiki N (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski EJ (ed) *Environmental mutagenesis and plant biology.* Praeger, New York. pp 137–151.

Kada T, Shimoi K (1987). Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *Bioessays.* 7: 113–116.

Kaduszkiewicz H¹, Zimmermann T, Beck-Bornholdt HP, van den Bussche H (2005). Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised. clinical trials. *BMJ* 331, 321–327.

Kahan S (2016). Overweight and obesity management strategies. *Am J Manag Care*. Jun; 22 (7 Suppl): s186-96.

Kanaka Padmanabham VY, Giles D (2011). Synthesis and Biological Evaluation of Pyrimidine Derivatives, Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Thesis, 1-36.

Karlowsky JA, Lagacé-Wiens PR, Simner PJ, DeCorby MR, Adam HJ, Walkty A, Hoban DJ, Zhanel GG (2011). Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*. 55:3169–3175.

Karlstam B, Ljungloef A (1991). Purification and partial characterization of a novel hyaluronic acid-degrading enzyme from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Polar Biol*. 11, 501–507.

Kayed R, Lasagna-Reeves CA (2013). Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J. Alzheimers Dis*. 33 (Suppl. 1), S67–S78.

Kemeny DM, Dalton N, Lawrence AJ, Pearce FL, Vernon CA (1984). The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *Eur. J. Biochem*. 139, 217–223.

Kershaw KN, Albrecht SS, Carnethon MR (2013). Racial and ethnic residential segregation, the neighborhood socioeconomic environment, and obesity among Blacks and Mexican Americans. *Am J Epidemiol*. 177 (4): 299-309. doi: 10.1093/aje/kws372.

Khan MT, Orhan I, Senol FS, Kartal M, Sener B, Dvorská M, Smejkal K, Slapetová T (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies,” *Chemical Biological Interactions*, vol. 181, no. 3, pp. 383–389.

Kikkawa M, Ishikawa T, Nakata T, Wakabayashi T, Hirokawa N (1994). Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J Cell Biol.*127 (6 Pt 2): 1965-71.

Kim J, Sudbery P (2011). *Candida albicans*: a Major Human Fungal Pathogen. *J Microbiol.* 49: 171-177.

Kim Y, Park CW (2016). Adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin Pract.* Jun; 35 (2): 69-77. doi: 10.1016/j.krcp.2016.02.004.

Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis *Tumour Biol.* 2016 Jul;37(7):8471-86. doi: 10.1007/s13277-016-5035-9

Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E (2003). Reactive Oxygen Species from Mitochondria Induce Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Human Mesangial Cells. *Diabetes.* 52, 2570-7.

Koehn FE, Carter GT (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*4 (3): 206-20.

Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F (2005). The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J.* 272, 5182–5190.

Korczyn AD (2003). Dopaminergic Drugs in Development for Parkinson's Disease. *Adv. Neurol.* 91, 267–271.

Kotas ME, Medzhitov R (2015). Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell.* February 26; 160 (5): 816–827. doi:10.1016/j.cell.2015.02.010.

Krishnapillai AM, Taylor KDA, Morris AEJ, Quantick PC (1999). Characterisation of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) hyaluronidase and comparison with sheep and bovine testicular hyaluronidase. *Food Chem.* 65, 515–521.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16: 3–11.

Kumar A, Schweizer HP (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1486–1513. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.004.

Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Björklund AC, Hulthenby K, Lundin J, Heyman M, Söderhäll S, Mazur J, Porwit A, Pandolfi PP, Zhivotovsky B, Panaretakis T, Grandér D (2009). Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ.* 16: 1018–1029.

Lambert JD, Hong J, Kim DH, Mishin VM, Yang CS (2004). Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *J Nutr.* Aug; 134 (8): 1948-52.

Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, Quale J (2007) Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother.* Jul; 60 (1): 78-82.

Lane RM, Potkin SG, Enz A (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 9: 101-124.

Lambeth JD (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* Mar; 4 (3): 181-9.

Lederman IE, Silva Júnior JF, Bezerra JEF (2000). Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal, São Paulo, 35.

Lederman IE, Bezerra JEF (2003). Situação atual e perspectivas da cultura da mangaba no Brasil. In: Simpósio Brasileiro sobre a Cultura da Mangaba, Aracajú. Anais... Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1 CD.

Lee J, Koo N, Min DB (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 3, 21–3.

Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Oct; 11 (10 Pt 1): 1025-32.

Lehne G (2000). P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr Drug Targets.* 1, 85-99.

Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, Janecka A, Gorlach S (2013) "Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 50, pp. 12183–12199.

Lewinsohn TM, Prado PI (2006). Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. Em: Lewinsohn TM (org.), *Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira*. Ed. MMA. Brasília, Brasil: 520 p.

Li T, Chen S, Feng T, Dong J, Li Y, Li H (2015). Rutin protects against aging-related metabolic dysfunction. *Food Funct.* 7 (2): 1147-54. doi: 10.1039/c5fo01036e.

Li W, Chen L, Li X, Jia X, Feng C, Zhang L, He W, Lv J, He Y, Li W, Qu X, Zhou Y, Shi Y (2013). Cancerrelated marketing centrality motifs acting as pivot units in the human signaling network and mediating cross-talk between biological pathways. *Mol Biosyst.* 9, 3026-3035.

Liang C, Oh BH, Jung JU (2015). Novel functions of viral anti-apoptotic factors. *Nat Rev Microbiol.* Jan; 13 (1): 7-12. doi: 10.1038/nrmicro3369.

Lindahl T, Wood RD (1999). Quality control by DNA repair, *Science* 286, 1897–1905.

Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds.* Mar; 28 (3): 78-88.

Liu, Z, Zhou, T, Ziegler, AC, Dimitrion, P, Zuo, L (2017). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications *Oxid Med Cell Longev.* 2525967. doi: 10.1155/2017/2525967.

Liu B, Xue Q, Tang Y, Cao J, Guengerich FP, Zhang H (2016). Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. *Mutation Research* 768, 53–67.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104: 487–501.

Lomovskaya O, Bostian KA (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol.* Mar 30; 71 (7): 910-8.

Lopes RH, Macorini LF, Antunes KÁ, Espindola PP, Alfredo TM, da Rocha Pdos S, Pereira ZV, Dos Santos EL, de Picoli Souza K (2016). Antioxidant and Hypolipidemic Activity of the Hydroethanolic Extract of *Curatella americana* L. Leaves. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9681425. doi: 10.1155/2016/9681425.

Lorenzi H (1998). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1, p. 28.

Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK; Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team (2014). Emerging infections program healthcare-associated infections and antimicrobial use prevalence survey team. 2014 Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.* 370(13):1198–208. doi: 10.1056/NEJMoa1306801

McGuire S (2016). World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Researchon Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr.* Mar 15; 7 (2): 418-9. doi: 10.3945/an.116.012211. Print 2016 Mar.

Malhotra JD, Kaufman RJ (2007). The Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. *Seminars in cell & developmental biology.* 18 (6): 716-731. doi:10.1016/j.semcdb.2007.09.003.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005). Remesy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230S–242S.

Manica I (2002). Mangaba. In: __. Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: técnicas de produção e mercado. Feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba. Porto Alegre: Cinco Continentes., p. 459-540.

Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F (2015) Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* 2015:905215. doi: 10.1155/2015/905215.

Marinova K, Kleinschmidt K, Weissenböck G, Klein M (2007). "Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport," *Plant Physiology*, vol. 144, no. 1, pp. 432– 444.

Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD (2011). The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol.* 135: 530-7.

Marnewick JL, Gelderblom WCA, Joubert E (2000). An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutat Res* 471:157–166

Marra AR (2016). *Advances in infection control.* Einstein (Sao Paulo). Jan-Mar;14 (1): 108-9. doi: 10.1590/S1679-45082016MD3433.

Marumoto S, Oda Y, Miyazawa M (2011). Antigenotoxic activity of naturally occurring furanocoumarins. *Environ Mol Mutagen.* Oct; 52 (8): 646-57. doi: 10.1002/em.20665.

Mattson MP (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430 (7000), 631–639.

Maurici D, Aardema M, Corvi R, Kleber M, Krul C, Laurent C, Loprieno N, Pasanen M, Pfuhler S, Phillips B, Sabbioni E, Sanner T, Vanparys P (2005). Genotoxicity and mutagenicity. *Altern Lab Anim.* 2005, 33(Suppl 1):117–130.

Mehlen P, Bredesen DE (2011). Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal.* Jan 25; 4 (157): mr2. doi: 10.1126/scisignal.2001521.

Migliore L, Coppedè F (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat Res.* 512: 135-153.

Milenković J, Vojinović J, Debeljak M, Toplak N, Lazarević D, Avčin T, Jevtović-Stoimenov T, Pavlović D, Bojanić V, Milojković M, Kocić G, Veljković A (2016). Distribution of MEFV gene mutations and R202Q polymorphism in the Serbian population and their influence on oxidative stress and clinical manifestations of inflammation. *Pediatr Rheumatol Online J*. Jul 1; 14 (1): 39. doi: 10.1186/s12969-016-0097-1.

Miller JA (1970). Carcinogenesis by chemicals: an overview, *Cancer Res*. 30, 559–576.

Minter MR, Taylor JM, Crack PJ (2016). "The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease." *Journal of neurochemistry* 136 (3): 457-474.

Mitchell AE, Hong YJ, Koh E, Barrett DM, Bryant DE, Denison RF, Kaffka S (2007). Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes, *J. Agric. Food Chem*. 55, 6154–6159.

Mitchell C, Park MA, Zhang G, Yacoub A, Curiel DT, Fisher PB, Roberts JD, Grant S, Dent P (2007). Extrinsic-pathway and cathepsin-dependent induction of mitochondrial dysfunction are essential for synergistic flavopiridol and vorinostat lethality in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. Dec; 6 (12 Pt 1): 3101-12.

Monachino JA (1945). Revision of *Hancornia* (Apocynaceae). *Lilloa, Tucumán*, 11, 19-48.

Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, Network EuSCAPE-Italy, Grundmann H, Pantosti A, Rossolini GM (2014). Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill*. 2014 Oct 23; 19 (42). pii: 20939.

Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, Brito AR, Hiruma-Lima CA (2008). *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*. 120: 161–168.

Mori M, Yoshida K, Ishigaki Y, Matsunaga T, Nikaido O, Kameda K, Kondo T (2005). "UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the blue morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 6, pp. 2015–2020, 2005.

Mucke L (2009). Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* 461, 895–897.

Mukherjee M (2003). Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 22, 369–376.

Muñoz-Torrero D (2008). Acetylcholinesterase inhibitors as disease modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr.Med.Chem.* 15, 2433–2455.

Murota K, Terao J (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Bioph.*, New York, v. 417, p. 12-17.

Murota k, Cermak R, Terao J, Wolfram S (2013). Influence of fatty acid patterns on the intestinal absorption pathway of quercetin in thoracic lymph duct-cannulated rats, *Br. J. Nutr.* 109, 2147–2153.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2005) – *Medical microbiology*. 5th ed. London : Elsevier Mosby.

Nagabukuro H, Hashimoto T, Iwata M, Doi T (2005). Effects of TAK-802, a novel acetylcholinesterase inhibitor, and tamsulosin, an alpha1- adrenoceptor antagonist, and their synergistic effects on the urodynamic characteristics in a guinea-pig model of functional bladder outlet obstruction. *BJU Int*; 95: 1071-1076.

Nagae LM, Honce JM, Tanabe J, Shelton E, Sillau SH, Berman BD (2016). Microstructural Changes within the Basal Ganglia Differ between Parkinson Disease Subtypes. *Front Neuroanat.* Feb 23;10:17. doi: 10.3389/fnana.2016.00017. eCollection 2016.

Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T (1997). Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-) epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci Biotechnol Biochem.* Dec; 61 (12): 1981-5.

Nakayama Y, Inoue T (2016). Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons. *Molecules.* May 19; 21 (5). pii: E663. doi: 10.3390/molecules21050663.

National Nosocomial Infections Surveillance System (2004). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* Dec; 32 (8): 470-85.

Neagu E, Paun G, Albu C, Radu GL (2015). Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 52, 1–6.

Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ (2014). Mycology - an update. Part 1: Dermatophytes: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* Mar; 12 (3):188-209; quiz 210, 188-211; quiz 212. doi: 10.1111/ddg.12245.

Ness-Abramof R, Apovian CM (2005). Drug-induced weight gain. *Drugs Today (Barc).* 41 (8): 547-555.

Newman DJ, Cragg GM (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*. 79 (3): 629-661.

Ng M, Fleming T, Robinson M. et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014; 384 (9945): 766-781. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.

Nweze EI, Okafor JI (2005), "Prevalence of dermatophytic fungal infections in children: a recent study in Anambra State, Nigeria," *Mycopathologia*, vol. 160, no. 3, pp. 239–243.

Nogueira PC, Andrade MS, Sampaio TS, Ribeiro AS, Moraes VRF, Machado SMF, Alves PB, Oliva G, Thiemann OH (2004). Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae do estado de Sergipe. II Seminário de Pesquisa FAP-SE, Aracajú.

Novick A, Szilard L (1952). Anti-mutagens. *Nature*. 170:926–927.

Ohya T, Kaneko Y (1970). Novel hyaluronidase from streptomyces. *Biochim. Biophys. Acta*. 198, 607–609.

Oliveira PS, Marquis RJ (2002). *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York.

Oke OO, Onayemi O, Olasode OA, Omisore AG, Oninla OA (2014). The Prevalence and Pattern of Superficial Fungal Infections among School Children in Ile-Ife, South-Western Nigeria. *Dermatol Res Pract*. 2014: 842917. doi: 10.1155/2014/842917.

O'Shea R, Moser HE (2008). Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J Med Chem*. May 22; 51 (10): 2871-8. doi: 10.1021/jm700967e.

Owa C, Messina ME Jr, Halaby R (2013). Triptolide induces lysosomal-mediated programmed cell death in MCF 7 breast cancer cells. *Int J Womens Health*. Sep 5; 5: 557-69. doi: 10.2147/IJWH.S44074. eCollection 2013.

Park SM, Ki SH, Han NR, Cho IJ, Ku SK, Kim SC, Zhao RJ, Kim YW (2015). Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition. *Biol Pharm Bull*. 38: 184-192.

Paterson DL, Doi Y (2007). A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 45: 1179–1181.

Penido AB, De Moraes SM, Ribeiro AB, Alves DR, Rodrigues AL, Dos Santos LH, de Menezes JE (2017). Medicinal Plants from Northeastern Brazil against Alzheimer's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017:1753673. doi: 10.1155/2017/1753673.

Peng Y, Jiang L, Lee DY, Schachter SC, Ma Z, Lemere CA (2006). Effects of huperzine A on amyloid precursor protein processing and beta-amyloid generation in human embryonic kidney 293 APP Swedish mutant cells. *J. Neurosci. Res*. 84, 903–911.

Peng F, Guo X, Li Z, Li C, Wang C, Lv W, Wang J, Xiao F, Kamal MA, Yuan C (2016). Antimutagenic Effects of Selenium-Enriched Polysaccharides from *Pyracantha fortuneana* through Suppression of Cytochrome P450 1A Subfamily in the Mouse Liver. *Molecules*. Dec 16; 21 (12). pii: E1731. doi: 10.3390/molecules21121731.

Pepeu G, Giovannini MG (2009). Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr. Alzheimer Res*. 6, 86–96.

Pera M, Martínez-Otero A, Colombo L, Salmona M, Ruiz-Molina D, Badia A, Clos MV (2009). Acetylcholinesterase as an amyloid enhancing factor in PrP82 146 aggregation process. *Mol Cell Neurosci.* Feb; 40 (2): 217-24. doi: 10.1016/j.mcn.2008.10.008

Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2676 –2684. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001>.

Pereira AC, Pereira AB, Moreira CC, Botion LM, Lemos VS, Braga FC, Cortes FS (2015). *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. *J Ethnopharmacol.* 161: 30-5. doi: 10.1016/j.jep.2014.11.050.

Pereira AB, Veríssimo TM, Oliveira MA, Araujo IA, Alves RJ, Braga FC (2012). Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 887-888:133-7. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.009.

Pereira VA, Pereira EBC, Silva Júnior JF, da Silva DB (2006). da Mangaba. In: *Frutas Nativas da região Centro-Oeste*. R.F. Vieira et al. (eds.). cap.12, p.188-213. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE (1977). Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1, 189.

Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes EC (2001). A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: Isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon.* 39, 1495–1504.

Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, Willman C, Nevill T, Brandwein J, Larson RA, Erba HP, Stiff PJ, Stuart RK, Walter RB, Tallman MS, Stenke L, Appelbaum FR (2013). A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*.121:4854–60.

Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M (2011). Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J. Clin. Microbiol.* 49:396–399. doi: 10.1128/JCM.01398-10

Pourcel L, Irani NG, Lu Y, Riedl K, Schwartz S, Grotewold E (2010). “The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments,”*Molecular Plant*, vol. 3, no. 1, pp. 78–90.

Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health.* 109 (7): 309-318. doi:10.1179/2047773215Y.0000000030.

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem.* 276 (22): 19420-19430.

Price RA, Gottesman II (1991). Body fat in identical twins reared apart: roles for genes and environment. *Behavior Genetics.* 21 (1): 1-7.

Parkinson J (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* Spring; 14 (2): 223-36; discussion 222.

Prindle MJ, Loeb LA (2012). DNA polymerase delta in DNA replication and genome maintenance. *Environ Mol Mutagen.* Dec; 53 (9): 666-82. doi: 10.1002/em.21745.

Raab T, Barron D, Vera FA, Crespy V, Oliveira M, Williamson G (2010). "Catechin glucosides: occurrence, synthesis, and stability," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 4, pp. 2138–2149.

Ramos S (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 52: 507-26.

Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, de Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000). A Five-Year Study of the Incidence of Dyskinesia in Patients with Early Parkinson's Disease Who Were Treated with Ropinirole or Levodopa. *N. Engl. J. Med*. 342, 1484–149.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 90(4), pp.1383–435.

Razzaghy-Azar M, Nourbakhsh M, Pourmoteabed A, Nourbakhsh M, Ilbeigi D, Khosravi M (2016). An Evaluation of Acylated Ghrelin and Obestatin Levels in Childhood Obesity and Their Association with Insulin Resistance, Metabolic Syndrome, and Oxidative Stress. *J Clin Med*. Jun 23; 5 (7). pii: E61. doi: 10.3390/jcm5070061.

Rewers M (2012). Challenges in Diagnosing Type 1 Diabetes in Different Populations. *Diabetes. Metab. J.*, 36, 90-97.

Rahman T, Yarnall B, Doyle DA (2017). Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. *Eur Biophys J*. Jul 14. doi: 10.1007/s00249-017-1238-2.

Ribeiro SS, Jesus AM, Anjos CS, Silva TB, Santos ADC, Jesus JR, Andrade M. S, Sampaio TS, Gomes WF, Alves PB, Carvalho AA, Pessoa C, Moraes MO, Pinheiro MLB, Prata APN, Blank AF, Silva-Mann R, Moraes VRS, Costa EV,

Nogueira PCL, Bezerra DP, (2012). Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. *Planta Med*, 78: 1601–1606

Rice L, Bonomo R (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. em Victor Lorian, M. D. (Eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine* (5^a ed., pp. 441-476). Nova Iorque.

Rizzetto L, Weil T, Cavalieri D (2015). Systems Level Dissection of Candida Recognition by Dectins: A Matter of Fungal Morphology and Site of Infection. *Pathogens*. Aug 21;4 (3): 639-61. doi: 10.3390/pathogens4030639.

Rizzo JA, Monteiro MSR, Bitencourt C (1990). Utilização de plantas medicinais em Goiânia. In: Congresso Nacional de Botânica, Anais. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil. 2: 691-707.

Rodrigues VEG, Carvalho DA (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Cienc. Agrotec.* 25 (1): 102 - 123.

Rodrigues CM (2007). Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Tese de Doutorado, p. 197.

Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezdard E, Obeso JA (2009). Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol*, 8 (12): p. 1128-39.

Ruutu T, Koivunen E, Nousiainen T, Pelliniemi TT, Almqvist A, Anttila P, Jantunen E, Koistinen P, Koponen A, Mikkola M, Oksanen K, Pulli T, Remes K, Sarkkinen R, Silvennoinen R, Timonen T, Vanhatalo S, Elonen E; Finnish Leukaemia Group (2004). Oral treatment of acute myeloid leukemia with etoposide, thioguanine, and idarubicin (ETI) in elderly patients: a prospective randomised comparison with intravenous cytarabine, idarubicin, and thioguanine in the second and third treatment cycle. *Eur J Haematol.* 72:38-44.

Saito J, Sakai Y, Nagase H (2006). In vitro anti-mutagenic effect of magnolol against direct and indirect mutagens. *Mutat Res.* Oct 10; 609 (1): 68-73.

Saklani A, Kutty SK (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today.* 13 (3-4): 161-71.

Sakulnarmrat K, Konczak I (2012). Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and in vitro inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndrome. *Food Chem.* 134 (2), 1011–1019.

Salvemini D, Wang Z, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol.* 118:829-38.

Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB (2002). Flavonol and flavone intakes in US health professionals, *J. Am. Diet. Assoc.* 102, 1414–1420.

Sanglard D, Odds FC (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2:73–85. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00181-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00181-0).

Santana GM, Deus MS, Sousa JM, Ferreira PM, Fernandes HB, Peron AP (2016). Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. *Braz J Biol.* Jun;76 (2): 520-5. doi: 10.1590/1519-6984.23014.

Santos EA, Sampaio TS, Feitosa JGR, Ribeiro AO, Nogueira PCL (2006). Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). 29° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, PN005.

Santos UP (2012). Avaliação da atividade antioxidante e antidiabética de *Hancornia speciosa* Gomes (1812). Dourados, MS: UFGD. 48p.

Santos UP, Campos JF, Torquato HF, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, de Picoli Souza K, Dos Santos EL (2016). Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract from *Hancornia speciosa* Gomes. PLoS One. Dec 1; 11 (12):e0167531. doi: 0.1371/journal.pone.0167531. eCollection 2016.

Sarkar S, Raymick J, Imam S (2016). Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. Int J Mol Sci. Jun 8; 17 (6). pii: E904. doi: 10.3390/ijms17060904.

Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. Nat Cell Biol. 4:842–9.

Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ (1993). Impaired antioxidant status in diabetic rat liver: effect of vanadate. Biochem Pharmacol., 45, 539-42.

Sberna G, Sáez-Valero J, Beyreuther K, Masters CL, Small DH (1997). The amyloid β -protein of Alzheimer's disease increases acetyl cholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. *J. Neu- rochem.* 69, 1177–1184.

Sbiti M, Bouhamidi B, Louzi L (2017). *Proteus mirabilis* septic arthritis. Pan Afr Med J. Apr 4;26:197. doi: 10.11604/pamj.2017.26.197.12271. eCollection 2017.

Schaffer JN, Pearson MM (2015). *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiology spectrum*. 3 (5): 10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.

Schreiner AB, Kao JY, Young VB (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 31 (1): 69-75. doi: 10.1097/MOG.000000000000139.

Scorciapino MA, D'Agostino T, Acosta-Gutierrez S, Mallocci G, Bodrenko I, Ceccarelli M (2016). Exploiting the porin pathway for polar compound delivery into Gram-negative bacteria. *Future Med Chem*. Jun; 8 (10): 1047-62. doi: 10.4155/fmc-2016-0038.

Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sørensen J, Cowley MA, Dalbøge LS, Hansen G, Grove KL, Pyke C, Raun K, Schäffer L, Tang-Christensen M, Verma S, Witgen BM, Vrang N, Bjerre Knudsen L (2014). The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest*. 124 (10): 4473-4488. doi: 10.1172/JCI75276.

Sengupta U, Nilson AN, Kaye R (2016). The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*. Apr; 6: 42-9. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.035.

Serra CP, Côrtes SF, Lombardi JA, Braga de Oliveira A, Braga FC (2005). Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plants extracts. *Phytomedicine*, 12, 424-432.

Shafer D, Grant S (2016). Update on rational targeted therapy in AML. *Blood Rev*. Feb 22. pii: S0268-960X(16)00010-2. doi: 10.1016/j.blre.2016.02.001.

Shahidi F (1997). Natural antioxidants: An overview. In *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*. Edited by: Shahidi F. Champaign: AOCS Press, 7, 1-11.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.*, 87, 4-14.

Shay J, Elbaz AH, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Hüttemann M (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2015, Article ID 181260, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/181260>

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best. Prac. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18, 385–405.

Siddiqui IA, Adhami VM, Bharali DJ, Hafeez BB, Asim M, Khwaja SI, Ahmad N, Cui H, Mousa SA, Mukhtar H (2009). Introducing nanochemoprevention as a novel approach for cancer control: proof of principle with green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* Mar 1; 69 (5): 1712-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3978.

Silva GC, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, Lemos VS, Cortes SF (2011). *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *J. Ethnopharmacol.* 137: 709-13.

Silva GC, Braga FC, Lemos VS, Cortes SF (2016). Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. *Phytomedicine.* Feb 15; 23 (2): 214-9. doi: 10.1016/j.phymed.2015.12.010.

Silveyra MX, García-Ayllón MS, de Barreda EG, Small DH, Martínez S, Avila J, Sáez- Valero J (2011a). Altered expression of brain acetylcholinesterase in FTDP-17 human tau transgenic mice. *Neurobiol. Aging.* doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.006.

Silveyra MX, García-Ayllón MS, Serra-Basante C, Mazzoni V, García-Gutierrez MS, Manzanares J, Culvenor JG, Sáez-Valero J (2011b). Changes in acetylcholinesterase expression are associated with altered presenilin-1 levels. *Neurobiol. Aging*. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.006.

Simpson K, Parker J, Plumer J, Bloom S (2012). CCK, PYY and PP: the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol*. (209): 209-230. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3_9.

Slanc P, Doljak B, Kreft S, Lunder M, Janes D, Strukelj B (2009). Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytother Res*. 23: 874-877.

Słoczyńska K, Powroźnik B (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genetics*. 55:273–285 doi: 10.1007/s13353-014-0198-9.

Smith R, Coast J (2013). The true cost of antimicrobial resistance. *British Medical Journal*. 346:f1493

Sofi FR, Raju CV, Lakshmisha IP, Singh RR (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of grape and papaya seed extracts and their application on the preservation of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during ice storage. *J Food Sci Technol*. 53 (1): 104-117. doi 10.1007/s13197-015-1983-0.

Sousa CS (2007). Descrição Botânica e Correlações entre Caracteres Relacionados a Folhas e Frutos de Mangabeiras nativas da Bahia. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, 19, 386-392.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998). Alpha-Synuclein in Filamentous Inclusions of Lewy Bodies from Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6469–6473.

Stickler DJ (2014). Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J Intern Med.* Aug; 276 (2): 120-9. doi: 10.1111/joim.12220.

Sturm R (2002). The effects of obesity, smoking, and drinking on medical problems and costs. *Health Aff (Millwood).* 21 (2): 245-253.

Subastri A, Harikrishna K, Sureshkumar M, Alshammari GM, Aristatile B, Thirunavukkarasu C (2017). Effect of troxerutin on 2-aminoanthracene and DNA interaction and its anti-mutagenic property. *Biomed Pharmacother.* Apr; 88: 325-334. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.042.

Sugiyama A, Shitan N, Yazaki K (2007). "Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-Rhizobium symbiosis," *Plant Physiology*, vol. 144, no. 4, pp. 2000–2008.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA (2010). What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Prog Brain Res.* 183: p. 59-77.

Sun T, Li X, Zhang P, Chen WD, Zhang HL, Li DD, Deng R, Qian XJ, Jiao L, Ji J, Li YT, Wu RY, Yu Y, Feng GK, Zhu XF (2015). Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nat Commun.* May 26;6:7215. doi: 10.1038/ncomms8215.

Susin SA, Dugas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192:571–80.

Szondy Z, Sarang Z, Kiss B, Garabuczi É, Köröskényi K (2017). Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Frontiers in Immunology.* 8: 909. doi:10.3389/fimmu.2017.00909.

Szymonik-Lesiuk S (2003). Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.*, 10, 309-315.

Tamura G, Gold C, Ferro-Luzzi A, Ames BN (1980). Ames, Fecalase: a model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 4961–4965.

The Diamond Project Group (2006). Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet Med*, 23, 857–66.

The Japanese Mycology Study Group (2007). Guidelines for management of deep-seated mycoses 2007. Tokyo: Kyowa Kikaku.

Thompson KS (2001). Controversies about extended-spectrum and AmpC betalactamases. *Emerg. Infect. Dis.* 7:333-336.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312–6.

Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed-Book N, Diamant S, Soreq H (2008). N- acetylcholinesterase induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 3, e3108.doi:10.1371/journal.pone.0003108

Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler Jr VG (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 28: 603–61.

Torgerson J, Hauptman J, Boldrin M, Sjström L (2004). Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care.* 27: 155–161.

Torres-Rêgo M, Furtado AA, Bitencourt MA, Lima MC, Andrade RC, Azevedo EP, Soares Tda C, Tomaz JC, Lopes NP, da Silva-Júnior AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MdeF (2016). Antiflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruitsof *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complement Altern Med.* Aug 5; 16: 275. doi: 10.1186/s12906-016-1259-x.

Tracey KJ (2002). The inflammatory reflex. *Nature.* Dec 19-26; 420 (6917):853-9.

Tripathi UN, Chandra D (2009). The plant extracts of *Momordica charantia* and *Trigonella foenum graecum* have antioxidant and anti-hyperglycemic properties for cardiac tissue during diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 290-296.

Tsai SJ, Jeng SN, Lee H (1996). Naturally occurring diallyl disulfide inhibits the formation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in boiled pork juice. *Mutagenesis* 11:235–240.

Tsao S, Rahkhoodaee F, Raymond M (2009). Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1344–1352. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00926-08>.

Tsao S, Weber S, Cameron C, Nehme D, Ahmadzadeh E, Raymond M (2016). Positive regulation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump Cdr1p function by phosphorylation of its N-terminal extension. *J Antimicrob Chemother.* Jul 7. pii: dkw252.

Tsuchiya H (2015). Membrane Interactions of Phytochemicals as Their Molecular Mechanism Applicable to the Discovery of Drug Leads from Plants. *Molecules.* 20, 18923-18966; doi:10.3390/molecules201018923.

Tu AT, Hendon RR (1983). Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 76, 377–383.

Uguz F, Sahingoz M, Gungor B, Aksoy F, Askin R (2015). Weight gain and associated factors in patients using newer antidepressant drugs. *General Hospital Psychiatry.* 37 (1): 46-48. doi: 10.1016/j.genhosppsych.2014.10.011.

Unal F, Taner G, Yuzbasioglu D, Yilmaz S (2013). Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology* 65:553–565

Uysal S, Aktumsek, A (2015). phytochemical study on *Potentilla anatolica*: An endemic Turkish plant. *Industrial Crops and Products.* 76, 1001–1007

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 700–714.

Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb; 15 (2): 135-47. doi: 10.1038/nrm3737.

Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB (2012). Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev.* 25:362–86.

Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B (2008). Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 166: 267–75

Villachica H, Carvalho JEU, Müller CH, Diaz SC, Almanza M (1996). Mangaba. In:__. *Frutales y hortalizas promisorios de la amazonia. Tratado de Cooperación Amazonica, Lima, 191-194.*

Vogt T (2010) "Phenylpropanoid biosynthesis," *Molecular Plant*, vol. 3, no. 1, pp. 2–20.

Von Schacky C (2008). Omega-3 fatty acids: antiarrhythmic, proarrhythmic or both? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 11:94–9.

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD (2017). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Front Microbiol*. Jan 12; 7:2173. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173.

Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H (2000). Synphilin-1 Is Present in Lewy Bodies in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol*. 47, 521–523.

Walle T, Walle UK, Halushka PV (2001). Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans, *J. Nutr*. 131, 2648–2652.

Wang N, Xu HL, Zhao X, Wen X, Wang FT, Wang SY, Fu LL, Liu B, Bao JK (2012). Networkbased identification of novel connections among apoptotic signaling pathways in cancer. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 621-631.

Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, Moustaid-Moussa N (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J Nutr Biochem*. Apr;25 (4) :363-76. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.002.

Aidi Wannas W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B (2010). Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (5): 1362-1370.

Weakley SM, Jiang J, Kougias P, Lin PH, Yao Q, Brunicardi FC, Gibbs RA, Chen C (2010). Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert Rev Mol Diagn* 10:173–185.

Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H (1987). Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot.* 40: 1081-1085.

West MJ, Kawas CH, Martin LJ, Troncoso JC (2000). The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 255–259.

World Health Organization (WHO) (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva).

World Health Organization (WHO) (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000; 894:i-xii, 1-253.

World Health Organization (WHO) 2006. <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/in18/8/2006/>.

World Health Organization (WHO) (2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. p. 27.

World Health Organization (WHO) (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO.

World Health Organization (WHO). 2016. [http://www.who.int/cancer/en/World Antibiotic Awareness Week](http://www.who.int/cancer/en/WorldAntibioticAwarenessWeek). Available online: <http://www.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/en/>. Acessado em: 01 de março de 2016.

Williams K, Sobol RW (2013). Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Special Issue: DNA Repair and Genetic Instability. *Mutat Res.* 0: 1–3. doi:10.1016/j.mrfmmm.2013.04.009.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011). Epidemiology and Etiology of Parkinson's Disease: A Review of the Evidence. *Eur. J. Epidemiol.* 26, S1–S58.

Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R (2009). Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 373 (9669); 1083-1096. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60318-4.

Wright GD (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1451–1470. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002.

Wung PK, Anderson T, Fontaine KR, Hoffman GS, Specks U, Merkel PA, Spiera R, Davis JC, St Clair EW, McCune WJ, Stone JH, Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group (2008). Effects of glucocorticoids on weight change during the treatment of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 59 (5):746-753. doi: 10.1002/art.23561.

Yacoubian TA, Standaert DG (2009). Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1792, 676–687.

Yamagishi S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S (2009). Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. *Curr Drug Metab.* 10: 159–163

Yamagiwa K, Ichikawa K (1915). Experimentelle studie über die pathogenese der epithelial geschwülste, *Mitt. Med. Fak. Tokio.* 15, 295–344.

Yamanaka D, Tamiya Y, Motoi M, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N (2012). The Effect of Enzymatically Polymerised Polyphenols on CD4 Binding and Cytokine Production in Murine Splenocytes. *PLoS ONE*, 7, e36025.

Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, Hseu TH, Kuo CT, Hseu YC (2006). Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Lett.* 231 (2): 215-27.

Yim S, Malhotra A, Veves A (2007). Antioxidants and CVD in Diabetes: Where Do We Stand Now? *Curr Diab Rep*, 7, 8-13.

Yu XL, Li YN, Zhang H, Su YJ, Zhou WW, Zhang ZP, Wang SW, Xu PX, Wang YJ, Liu RT (2015). Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. *Food Funct.* 6 (10): 3296-306. doi: 10.1039/c5fo00500k.

Zahar JR, Poirel L, Dupont C, Fortineau N, Nassif X, Nordmann P (2015). About the usefulness of contact precautions for carriers of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis.* Nov 12;15:512. doi: 10.1186/s12879-015-1244-x.

Zimmermann M, Borroni B, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2005). Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. *Neurobiol.Dis.* 19, 237–242.

Zimmet P (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414, 782-787.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009; 325: 332–336.

Zhang L, Gianani R, Nakayama M, Liu E, Kobayashi M, Baschal E, Yu L, Babu S, Dawson A, Johnson K, Jahromi M, Aly T, Fain P, Barker J, Rewers M, Eisenbarth GS (2008). Type 1 diabetes: chronic progressive autoimmune disease. *Novartis Found Symp.*, 292, 85–203.

Zhang Y, Li Y, Cao C, Cao J, Chen W, Zhang Y, Wang C, Wang J, Zhang Z, Zhao X (2010). Dietary flavonol and flavones intakes and their major food sources in Chinese adults. *Nutr. Cancer.* 62, 1120–1127.

Zawia NH, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F (2009). Epigenetics, Oxidative stress and Alzheimer's disease. *FreeRadicBiolMed.* 46:1241–9.

Zeng HJ, Ma J, Yang R, Jing Y, Qu LB (2015). Molecular Interactions of Flavonoidsto Hyaluronidase: Insights from Spectroscopic and Molecular ModelingStudies. *J Fluoresc.* 2015 Jul;25(4):941-59. doi: 10.1007/s10895-015-1576-3.

Zhou X, Li Y, Shi X, Ma C (2016). An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels. *Am J Transl Res.* Feb 15; 8 (2): 246-69. eCollection 2016.

Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 18: 1272–1282.

Zuo T, Zhu M, Xu W (2016). Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:8589318. doi: 10.1155/2016/8589318.