

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de
extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium
cumini* (L.) Skeels**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jefferson de Jesus Soares

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

Jefferson de Jesus Soares

Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Elton Luis Gasparatto Denardin

Uruguaiana

2013

Jefferson de Jesus Soares

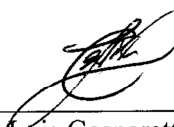
Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

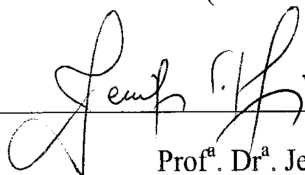
Área de concentração: Química e Bioquímica de Produtos Biologicamente Ativos

Dissertação defendida e aprovada em: 25 de abril de 2013.

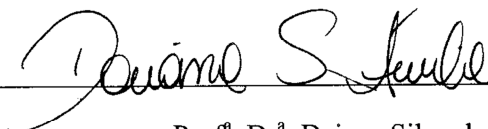
Banca examinadora:



Prof. Dr. Elton Luis Gasparatto Denardin
Orientador
(UNIPAMPA)



Prof.^a. Dr.^a. Jenifer Saffi
(UFCSPA)



Prof.^a. Dr.^a. Daiana Silva de Ávila
(UNIPAMPA)

Dedico essa dissertação a toda a minha família que sempre me incentivou em todos os momentos da minha vida.

Dedico em especial, a minha esposa Denise.
Obrigado pelo apoio, compreensão e amor.
TE AMO!

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus pais, Paulo e Ruth, e aos meus irmãos, Susana e Alexandre, por todo o incentivo e apoio mesmo estando longe. Eu não seria a pessoa que sou hoje sem a educação, o carinho e o amor de vocês. Obrigado!

Ao meu sogro e minha sogra, Abigail e Nilda. Não considero vocês meus sogros, mas sim meus pais. Sou uma pessoa de sorte por ter dois pais e duas mães. Obrigado pelos ensinamentos de vida e pelo carinho.

Um agradecimento especial à minha esposa Denise, por sempre acreditar em mim e por compreender às várias horas que eu dediquei ao mestrado. Obrigado por todo o apoio e amor. Tenha certeza de que você é à base da minha vida. TE AMO!

Ao meu orientador Elton, por ter me dado à oportunidade de realizar o mestrado. Obrigado por todos os ensinamentos e apoio.

Ao meu co-orientador Rafael, por ter estendido a mão no momento mais difícil do meu mestrado. Obrigado por me ensinar a trabalhar com as leveduras e pelas várias sugestões durante o trabalho.

As alunas de iniciação científica, Ingrid e Paola, pela ajuda durante toda a parte experimental do trabalho.

Aos meus colegas e amigos, Simone, Suzi, Luisa, Anderson e Cristiano por todo o apoio e pelo auxílio em dúvidas relacionadas com estatística, bioquímica, word e prisma. Eu sei que posso contar com a ajuda de vocês a qualquer momento e vice-versa. Um agradecimento especial ao Anderson e ao Cristiano pela ajuda na parte experimental do trabalho.

Aos professores Vanderlei, Francielli e Maristela, por terem disponibilizado seus laboratórios e reagentes para a realização de alguns experimentos deste trabalho.

A todos os professores e servidores envolvidos com o Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

AUTOR: Jefferson de Jesus Soares

ORIENTADOR: Elton Luís Gasparotto Denardin

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 25 de abril de 2013

A *Syzygium cumini* (L.) Skeels, conhecida como jambolão, é uma das plantas medicinais mais utilizadas na medicina popular. Apesar de ter origem na Índia, essa espécie é cultivada em diversos países, inclusive no Brasil. Todas as partes da espécie (folhas, sementes, frutos e casca) tem uma longa história de uso medicinal em várias culturas populares. As folhas são utilizadas para o tratamento de febre, estomalgia, gastropatia e principalmente diabetes. O presente estudo avaliou a atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* de três diferentes extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos foi avaliada por diferentes metodologias como a captura do radical DPPH, capacidade antioxidante total e poder de redução do ferro (III). Como modelo *in vivo*, utilizou-se linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes e proficientes em superóxido dismutase (SOD). O crescimento e a peroxidação lipídica das linhagens foram avaliadas após 24 horas de exposição simultânea ao paraquat (pró-oxidante) e a diferentes concentrações dos extratos. Os extratos mostraram ter atividade antioxidante *in vitro* através da habilidade de doação de elétrons e hidrogênio. Nos ensaios *in vivo*, o paraquat inibiu o crescimento e aumentou a peroxidação lipídica nas linhagens tratadas somente com paraquat. Os três extratos foram capazes de auxiliar o crescimento das linhagens e reduzir a peroxidação lipídica mesmo na presença do paraquat. O conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides podem estar correlacionados com a atividade antioxidante dos extratos. Os resultados indicam que as folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels possuem atividade antioxidante o que pode contribuir com o seu uso tradicional no tratamento de diversas doenças.

Palavras-chave: *Syzygium cumini* (L.) Skeels, atividade antioxidante, estresse oxidativo, *Saccharomyces cerevisiae*, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

Evaluation of antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of extracts prepared from leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels

AUTHOR: Jefferson de Jesus Soares

ADVISOR: Elton Luís Gasparotto Denardin

Date and Place of Defense: Uruguaiana, April 25th, 2013

Syzygium cumini (L.) Skeels, known as jambolan, is one of the most medicinal plants used in folk medicine. Although its origin is in India, this species is cultivated in many countries, including Brazil. All parts of the species (leaves, seeds, fruit and bark) have a long history of medicinal use in several popular cultures. Leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels are used for the treatment of fever, stomachalgia, gastropathy and mainly diabetes. The present study evaluated the antioxidant activity both *in vitro* and *in vivo* of three different extracts prepared from the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Antioxidant activity *in vitro* of the extracts was assessed by different methodologies such as scavenger of the DPPH radical, total antioxidant capacity and reducing power of the iron (III). As an *in vivo* model, we used *Saccharomyces cerevisiae* strains proficient and deficient in superoxide dismutase (SOD). Growth of the strains and lipid peroxidation were assessed after 24 hours exposure concomitantly to paraquat (pro-oxidant) and different concentrations of the extracts. The extracts showed to have antioxidant activity *in vitro* through the ability to donate electrons and hydrogen. In the *in vivo* assays, paraquat inhibited the growth and increased lipid peroxidation in strains treated only with paraquat. The three extracts were able to assist the growth of strains and reduce lipid peroxidation even in the presence of paraquat. The contents of phenolic compounds and flavonoids could be correlated with the antioxidant activity observed in the extracts. The results indicate that leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels possess antioxidant activity which may contribute to their traditional use in treatment of many diseases.

Key-words: *Syzygium cumini* (L.) Skeels, antioxidant activity, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*, phenolic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão bibliográfica

Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	16
Figura 2. Núcleo fundamental dos flavonóides.....	17
Figura 3. Estrutura química do ácido gálico e do ácido elágico.....	18
Figura 4. Exemplos de saponinas: (A) esteroidal e (B) triterpênica. R = açúcar.....	20
Figura 5. Estrutura química de alguns carotenóides encontrados nos vegetais.....	20
Figura 6. Exemplos de alguns tipos de alcalóides.....	22
Figura 7. Árvore, frutos e folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	23
Figura 8. Locais dentro da célula onde as ERO são produzidas.....	26
Figura 9. Representação da formação do radical OH [•] pelas reações Haber Weiss/Fenton.....	27
Figura 10. Atuação cooperativa dos sistemas antioxidantes presente nas células.....	30
Figura 11. Fases de crescimento de uma linhagem selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> quando iniciada em meio completo.....	34
Figura 12. Esquema representativo dos resultados obtidos nesse trabalho.....	68

Artigo

Figure 1 – DPPH radical scavenging capacities of AE, HAE and IE	49
Figure 2 – Reducing power of AE, HAE and IE.....	50
Figure 3 – Total antioxidant capacity of AE, HAE and IE, using phosphomolybdenum method	51
Figure 4 – The HPLC profile the extracts at 257 nm. (a) hydroalcoholic extract (HAE), (b) infusion extract (IE), (c) aqueous extract (AE) and (d) comparison between aqueous extract and gallic acid standard. The UV spectra analysis of peak ($R_t = 8,14$ min) and peak ($R_t = 9,01$ min) of the extracts exhibiting the two λ_{max} at 240–280 nm and 300–380 nm, suggesting the presence of flavonoid glycosides.....	53
Figure 5 – Growth of the SOD (WT), <i>sod1Δ</i> , <i>sod2Δ</i> and <i>sod1Δsod2Δ</i> strains in the presence of aqueous extract (AE) and paraquat	54
Figure 6 – Growth of the SOD (WT), <i>sod1Δ</i> , <i>sod2Δ</i> and <i>sod1Δsod2Δ</i> strains in the presence of hydroalcoholic extract (HAE) and paraquat	55
Figure 7 – Growth of the SOD (WT), <i>sod1Δ</i> , <i>sod2Δ</i> and <i>sod1Δsod2Δ</i> strains in the presence of infusion extract (IE) and paraquat	56
Figure 8 – MDA levels of the SOD (WT), <i>sod1Δ</i> , <i>sod2Δ</i> and <i>sod1Δsod2Δ</i> strains after 24 h treatment with AE, HAE, IE (20 mg/mL) and paraquat 1 mM	57

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1 – Principais terpenóides encontrados nas plantas. Os terpenóides são precursores de quatro classes hormonais: as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs) e os brassinoesteróides (BR).....	19
--	----

Artigo

Tabela 1 – <i>S. cerevisiae</i> strains used in this study.....	47
Tabela 2 – EC ₅₀ values (µg/mL) of the three extracts in the DPPH and reducing power assays.....	51
Tabela 3 – Phenolic, flavonoid and gallic acid contents in the extracts of the <i>Syzygium cumini</i> (L.) leaves.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA** – Ácido ascórbico
AE – Extrato aquoso (do inglês, *aqueous extract*)
AP – Sítios apurínicos e apirimidínicos
ATP – trifosfato de adenosina
BHT - Butil-hidróxitolueno
CAT – Catalase
DMAPP – Dimetilalilpirofosfato
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DPPH[•] - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERO/ROS - Espécies reativas de oxigênio/do inglês, *reactive oxygen species*
GPx – Glutaciona peroxidase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG - Glutacionadissulfeto
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HAE – Extrato hidroalcolólico (do inglês, *Hydroalcoholic extract*)
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performace Liquid Chromatography*)
IE – Extrato infuso (do inglês, *Infusion extract*)
IPP – Isopreno
L[•] - Radical centrado em carbono
LH - Molécula de lipídio
LSD – Ácido lisérgico dietilamida
MDA - Malondialdeído
NADPH -Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NO[•] - Radical Óxido nítrico
O₂ - Oxigênio molecular
O₂^{•-} - Radical ânion superóxido
OH[•] - Radical hidroxil
OMS – Organização Mundial da Saúde
pH – Potencial hidrogeniônico
PHGPx – Fosfolipídio hidroperóxido glutaciona peroxidase
PQ^{•+} - Radical paraquat
RO₂[•] - Radical peroxil
ROOH - Peróxido orgânico
R_t – Tempo de retenção (do inglês, *Retetion time*)
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SNc – Substância negra pars compacta
SOD - Superóxido dismutase
TAOC – Capacidade antioxidante total (do inglês, *Total antioxidant capacity*)
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive species*)
t-BOOH – Hidroperóxido de terc-butil
TCA - Ácido tricloroacético
Trx – Tiorredoxina
UAE – Extração assistida por ultrassom (do inglês, *Ultrasonic-assisted extraction*)
UV – Radiação ultravioleta
YPD – Meio completo para crescimento de levedura

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Plantas medicinais	15
2.2 Metabólitos secundários	16
2.2.1 <i>Compostos fenólicos</i>	16
2.2.2 <i>Terpenos/Esteróides</i>	18
2.2.3 <i>Alcalóides</i>	21
2.3 Syzygium cumini (L.) Skeels	22
2.3.1 <i>Composição fitoquímica e ação farmacológica</i>	23
2.4 Espécies reativas de oxigênio	25
2.5 Principais defesas antioxidantes	28
2.6 Estresse oxidativo	31
2.7 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	33
2.7.1 <i>Defesas antioxidantes na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	35
2.7.2 <i>O uso de <i>S. cerevisiae</i> para o estudo de substâncias com efeitos pro- e/ou antioxidantes</i>	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 ARTIGO CIENTÍFICO	40
Abstract	42
1. Introduction	43
2. Materials and Methods	44
2.1. <i>Chemicals</i>	44
2.2. <i>Plant materials</i>	44
2.3. <i>Preparation of plant extract</i>	44
2.4. <i>In vitro antioxidant activity</i>	44
2.4.1. <i>DPPH radical scavenging activity</i>	44
2.4.2. <i>Reducing power assay</i>	45
2.4.3. <i>Total antioxidant capacity (TAOC)</i>	45
2.5. <i>Determination total phenolic and flavonoid content</i>	45
2.6 <i>HPLC analysis</i>	46
2.7. <i>In vivo antioxidant activity</i>	46
2.7.1. <i>Yeast strains, media and growth conditions</i>	47
2.7.2. <i>Evaluation of antioxidant activity using yeast cells</i>	47
2.7.3 <i>Lipid peroxidation</i>	48
2.8 <i>Statistical analysis</i>	48
3. Results	48
3.1 <i>In vitro antioxidant activity</i>	48
3.2 <i>Total phenolic and flavonoid content</i>	52

3.3 HPLC analysis	52
3.4 <i>In vivo</i> antioxidant activity.....	52
3.5 Lipid peroxidation.....	57
4. Discussion	58
5. Conclusion	62
Acknowledgements	63
References	63
5 CONCLUSÕES	67
6 PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO A – Carta de submissão do artigo à revista Journal Ethnopharmacology	81

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido a base de sofisticados sistemas de medicina tradicionais que já existem há milhares de anos e continuam a dar à humanidade novos remédios. Embora algumas das propriedades terapêuticas atribuídas às plantas não têm sido comprovadas, a terapia com plantas medicinais é baseada nos resultados empíricos de centenas e milhares de anos. A grande maioria das pessoas no planeta ainda depende do uso de plantas medicinais para os seus cuidados de saúde primários. Um quarto de todas as prescrições médicas são formulações à base de substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados de plantas (Fakim, 2006).

A *Syzygium cumini* (L.) Skeels, popularmente conhecida como jambolão, é uma planta pertencente à família das Mirtáceas (Myrtaceae) nativa de países como: Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar. No Brasil, ela é cultivada em diversos estados das regiões sudeste, nordeste, norte e sul (Migliato et al., 2006). Essa espécie é conhecida por possuir diversos fitoquímicos, onde muitos parecem ser benéficos para a saúde. Todas as partes da espécie (folhas, sementes, frutos e casca) tem uma longa história de uso medicinal em várias culturas populares (Baliga et al., 2011). As folhas são utilizadas para o tratamento de febre, estomalgia, gastropatia e principalmente, diabetes. Estudos mostram que as folhas possuem propriedades anti-inflamatória (Lima et al., 2007), antibacteriana (Shafi et al., 2002), radioprotetora (Jagetia and Baliga, 2002) e antioxidante (Ruan et al., 2008).

Muitas evidências bioquímicas, biológicas e clínicas sugerem o envolvimento do estresse oxidativo induzido por radicais livres na patogênese de várias doenças e no envelhecimento acelerado (Halliwell and Gutteridge, 2007). Espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidas como subproduto do metabolismo celular aeróbico. Elas atuam como moduladoras de processos biológicos internos, incluindo a sinalização da transdução, transcrição ou morte programada (Cui et al., 2004). As células possuem muitas maneiras de controlar a produção de EROs, através de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase) e não-enzimáticos (ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e glutathione). Uma condição de estresse oxidativo ocorre quando a célula acumula um excesso de EROs. Isso ocorre quando a produção de EROs excede as defesas celulares. As EROs em excesso podem danificar as células através da oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Covarrubias et al., 2008). Por esta razão, mais atenção tem se dado

aos antioxidantes naturais que podem servir como uma medicina preventiva (Krishnaiah et al., 2011) para proteger o organismo humano contra os radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas.

As plantas possuem uma larga variedade de moléculas capturadoras de radicais livres, como flavonóides, antocianinas, carotenóides e vitaminas (Choi et al., 2002). As folhas de *S. cumini* possuem compostos como a rutina, ácido clorogênico e ácido gálico que têm sido descritos por possuir atividade antioxidante (Aliaga et al., 2011; Bona et al., 2010; Karthikesan et al., 2010; Priscilla and Prince, 2009a). Alguns estudos demonstram a atividade antioxidante *in vitro* de extratos preparados a partir das folhas de *S. cumini* (Kaneira and Chanda, 2011; Ruan et al., 2008). Entretanto na literatura, há poucos estudos que avaliam a atividade antioxidante desses extratos utilizando modelos *in vivo*.

Desta forma, o presente estudo avaliou a atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* de três diferentes extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium. cumini* (L.) Skeels.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

Desde o início da civilização o homem utiliza as plantas com fins terapêuticos. As plantas têm sido a base de medicamentos tradicionais em todo mundo por milhares de anos e continuam a fornecer novos fármacos para a humanidade (Krishnaiah et al., 2011). O uso de plantas com propriedades terapêuticas é uma prática milenar sendo uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas das plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração a geração, fazendo parte da cultura popular (Maia, 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 80% dos habitantes da terra dependem da medicina tradicional para os seus cuidados de saúde primários, e a maioria das terapias envolve o uso de extratos de plantas e seus componentes ativos (Winston, 1999).

As substâncias químicas consideradas como princípios ativos encontrados nos vegetais são, na maioria, provenientes do metabolismo secundário tendo uma função ligada ao relacionamento da planta com o ambiente que a envolve (Maia, 2008). Os compostos oriundos do metabolismo secundário são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas e apresentam grande importância ecológica, pois representam uma defesa química contra insetos e micro-organismos ou podem interferir em processos simbióticos (Mazid et al., 2011; Verpoorte and Memelink, 2002). A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1). Alguns metabólitos derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação destas vias, como é o caso dos flavonóides e taninos hidrolisáveis (Simões et al., 1999b).

A maior parte da diversidade estrutural dos metabólitos secundários é gerada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura. Essas modificações podem alterar a atividade biológica do composto derivado em relação à estrutura inicial (Kliebenstein, 2004). Os metabólitos secundários são classificados de acordo com as suas rotas biossintéticas. Três famílias de metabólitos geralmente são utilizadas para a classificação: fenólicos, terpenos/esteróides e alcalóides (Bourgaud et al., 2001).

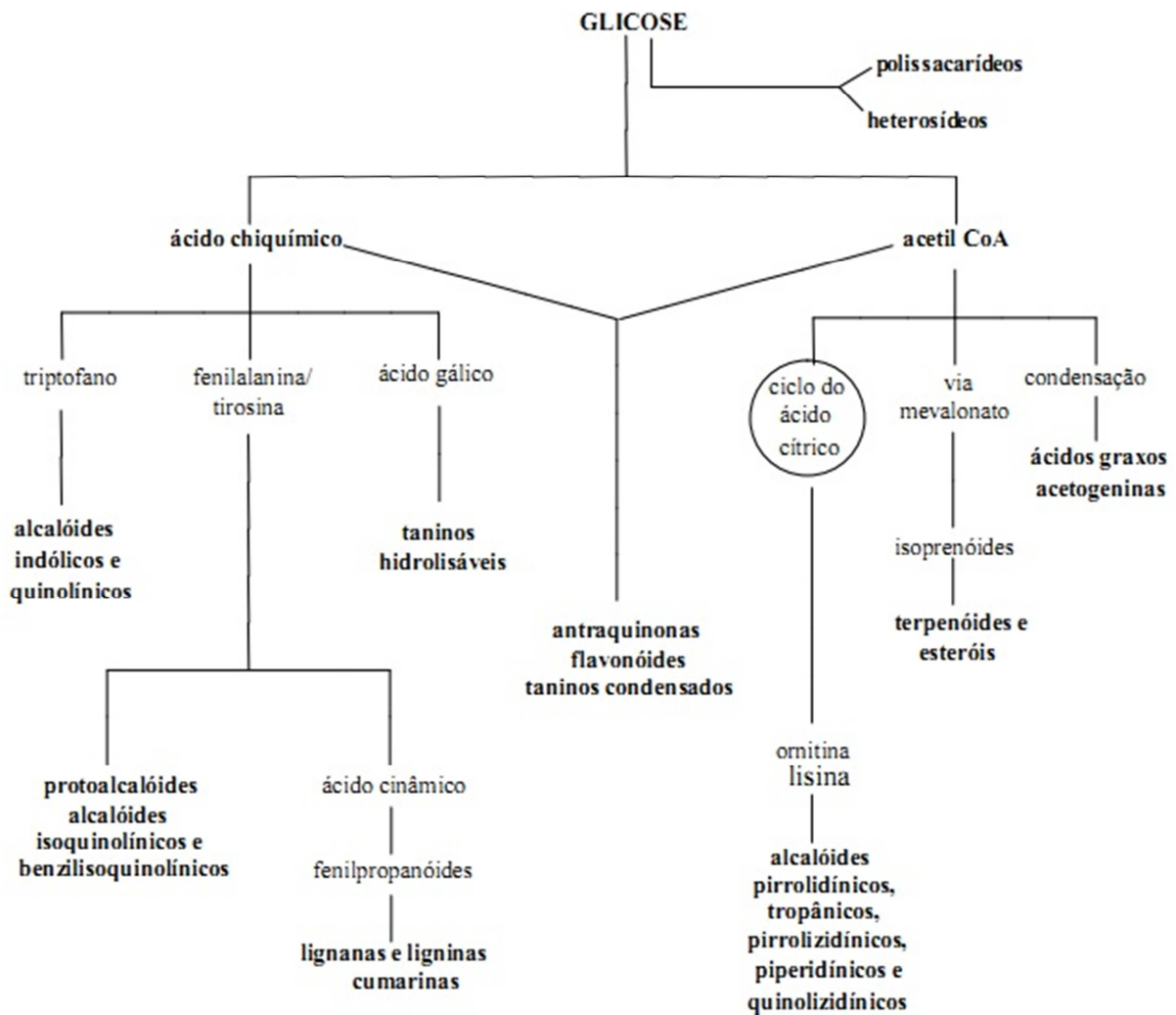


Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. FONTE: Simões et al., 1999b.

2.2 Metabólitos secundários

2.2.1 Compostos fenólicos

Entre todos os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, os compostos fenólicos são os mais difundidos no reino vegetal. Eles são caracterizados por ter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e são frequentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (Torrás-Claveria et al., 2012).

Esses compostos possuem uma variedade de funções biológicas. Por exemplo, os flavonóides são conhecidos por exibir propriedades farmacológicas como antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (Clavin et al., 2007; Ibrahim et al., 2012; Pelzer et al., 1998). Esse grupo compreende compostos polifenólicos de baixo peso molecular contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (Simões et al., 1999b). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (Figura 2.).

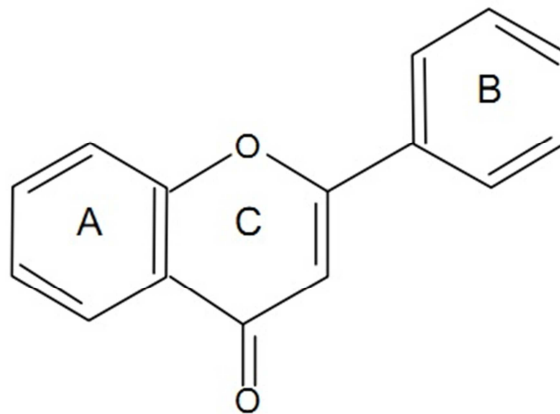


Figura 2. Núcleo fundamental dos flavonóides. FONTE: Simões et al., 1999b.

Os flavonóides são classificados de acordo com as suas estruturas químicas. As maiores classes de flavonóides incluem: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas. Esses compostos são distribuídos largamente nas folhas, sementes, raízes e flores das plantas. Mais de 10.000 estruturas de flavonoides já foram descobertas (Agati et al., 2012). A atividade bioquímica dos flavonóides e seus metabólitos dependem da estrutura química e da orientação relativa dos grupamentos na molécula. Nas plantas, os flavonóides tem a função de absorver a radiação UV prejudicial que pode induzir um dano celular (Takahashi and Ohnishi, 2004). Nos seres humanos, os flavonóides têm sido descritos por exercer efeitos benéficos em diversas doenças incluindo câncer, desordens neurodegenerativas e doenças cardiovasculares. Muitas das ações biológicas dos flavonóides têm sido atribuídas pelas suas propriedades antioxidantes, através da capacidade de redução, doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular. A atividade antioxidante parece estar diretamente relacionada com o número de grupamento hidroxila no núcleo B (Husain et al., 1987; Williams et al., 2004). Entretanto, estudos têm especulado que é pouco provável que somente a atividade antioxidante seja a única explicação

para os efeitos celulares causados pelos flavonóides (Spencer et al., 2001). Isto por que eles são intensamente metabolizados *in vivo*, resultando em uma significativa alteração no seu potencial redox. Desta forma, estudos mostram que independente da capacidade antioxidante, os flavonóides também podem atuar na cascata de sinalização de diversas proteínas quinases e lipídios quinases o que pode estar relacionado com os efeitos benéficos destes compostos (Williams et al., 2004).

Além dos flavonóides, outros compostos pertencentes à família dos fenólicos também possuem importantes atividades farmacológicas. Um exemplo é o ácido gálico que já demonstrou ter atividade antioxidante (Kim et al., 2002), anti-inflamatória (Kroes et al., 1992), antimutagênica (Gichner et al., 1987), anticâncer (Inoue et al., 1995) e cardioprotetora (Priscilla and Prince, 2009a). O ácido gálico juntamente com o ácido elágico (Figura 3) são os constituintes dos taninos hidrolisáveis, compostos fenólicos que possuem propriedades farmacológicas como antitumor, antioxidantes e neuroprotetores (Katiki et al., 2012; Larrosa et al., 2006; Tan et al., 2012).

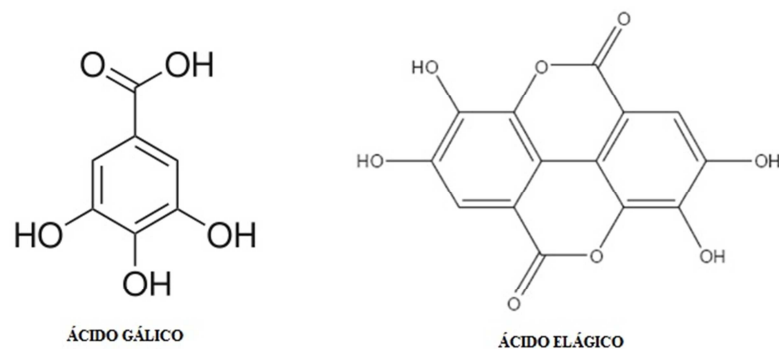


Figura 3. Estrutura química do ácido gálico e do ácido elágico.

2.2.2 Terpenos/Esteróides

Os terpenos são sintetizados a partir de dois precursores que contêm cinco carbonos, o isopentenilpirofosfato ou isopreno (IPP) e o seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP). Essas unidades fundem-se, gerando diversos compostos (Nagegowda, 2010). Desta forma, os terpenos são classificados de acordo com o número de IPP que entram em sua montagem (Tabela 1). Como podemos observar na tabela 1, muitos dos compostos vegetais importantes são terpenos ou possuem derivados de terpenos em partes de sua molécula. Entre esses

compostos encontram-se, inclusive, quatro, das seis principais classes de hormônios vegetais. Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias tanto para vegetais quanto para animais. Trata-se dos esteróides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdiesteróides) (Peres, 2004). Outras importantes classes de terpenos são as saponinas e os carotenóides.

Tabela 1. Principais terpenóides encontrados nas plantas. Os terpenóides são precursores de quatro classes hormonais: as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs) e os brassinosteróides (BR).

Nº de IPP	Nº de carbonos	Nome	Exemplos
1	5	Isopreno	Cadeia lateral das Cks
2	10	Monoterpeno	Piretróides e óleos essenciais
3	15	Sesquiterpeno	ABA, lactonas
4	20	Diterpeno	GAs, taxol
6	30	Triterpeno	Esteróides (BR), saponinas
8	40	Tetraterpeno	Carotenóides
N	N	Polisopreno	Borracha

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos (Figura 4). Esse tipo de estrutura possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares), que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes. Esse grupo de substâncias sempre tem sido de interesse farmacêutico, seja como adjuvante em formulações, componente ativo em drogas vegetais, ou ainda, como matéria para a síntese de esteróides (Simões et al., 1999b). Muitas saponinas isoladas a partir de fontes de plantas produzem uma inibição na inflamação em camundongo no ensaio de indução de edema por carragenina (Just et al., 1998; Sparg et al., 2004). Em um estudo realizado por Just et al., (1998), a saponina Fruticesaponina B isolada da espécie *Bupleurum fruticosens* L. (Apiaceae), mostrou ter elevada atividade anti-inflamatória entre todas as saponinas testadas no ensaio de edema em camundongos. Além da atividade anti-inflamatória, algumas saponinas também já mostraram ter propriedades antimicrobiana (ElSohly et al., 1999), antiviral (Simões et al., 1999a) e antitumor (Xu et al., 2012).

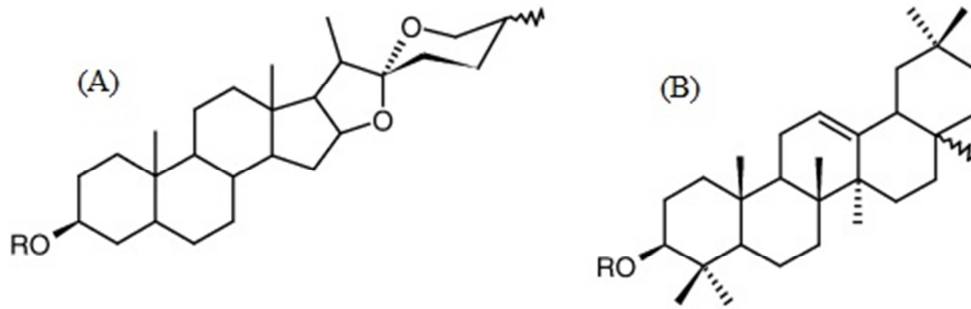


Figura 4. Exemplos de saponinas: (A) esteroidal e (B) triterpênica. R = açúcar. Adaptado Sparg et. al., 2004.

Embora os vertebrados não sejam capazes de sintetizar carotenóides, esses compostos desempenham importantes papéis no metabolismo animal. Além do β -caroteno ser precursor da vitamina A, outros carotenóides, como o licopeno são importantes dissipadores de radicais livres (Peres, 2004). Os carotenóides (Figura 5) são tetraterpenóides de 40 átomos de carbono, responsáveis pela coloração de diversos pássaros, insetos, flores, frutos e animais marinhos. Classificam-se em carotenos, hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de instauração e em xantofilas que são sintetizadas a partir dos carotenos por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. O grande interesse no estudo desses compostos é devido tanto as suas funções fisiológicas e biológicas. Além do fato de alguns carotenóides serem precursores da vitamina, eles também atuam como antioxidantes e aumentam a resposta imune (Ambrósio et al., 2006; Quirós and Costa, 2006). Tanto os carotenoides precursores da vitamina A como os não-precursoros, como a luteína, a zeaxantina e o licopeno, parecem apresentar proteção contra o câncer (Kim M. K. et al., 2001; Ziegler, 1991).

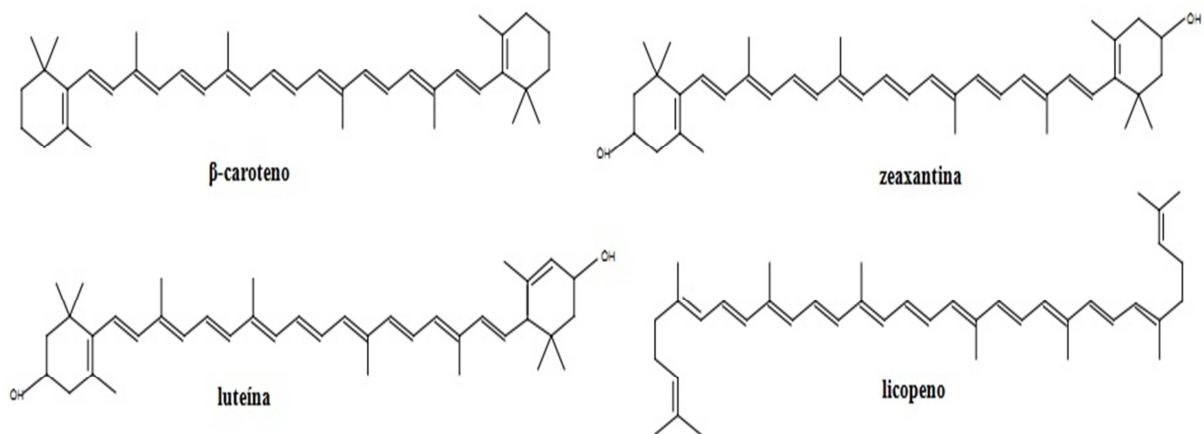


Figura 5. Estrutura química de alguns carotenóides encontrados nos vegetais.

2.2.3 Alcalóides

Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente nas angiospermas. Na sua grande maioria os alcalóides possuem caráter alcalino, porém existem alcalóides ácidos, como por exemplo, a colchicina. Uma definição para essa classe de substâncias apresenta certas dificuldades devido à ausência de uma separação precisa entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Até o momento, a definição mais abrangente foi formulada por (Pelletier, 1988): Um alcalóide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Quase a totalidade dos alcalóides é derivada de aminoácidos como a ornitina, a lisina, a tirosina e o triptofano. Essa classe de metabólitos é famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos e alucinógenos. O uso de extratos vegetais contendo alcalóides como medicamentos e venenos podem ser traçados desde o primórdio da civilização. Um exemplo foi a execução do filósofo Sócrates através da ingestão de uma bebida preparada à base de cicuta contendo o alcalóide coniina. Os índios da bacia Amazônica utilizam o extrato seco da planta conhecida como curare, contendo o alcalóide tubocurarina, para preparar dardos e flechas envenenadas. As sociedades modernas também fazem o uso dos alcalóides, inclusive em aplicações não lícitas como é o caso do LSD e da cocaína, drogas comercializadas no narcotráfico (Peres, 2004; Simões et al., 1999b).

Devido ao elevado número de atividades biológicas atribuídas aos alcalóides, estes são continuamente objetos de estudos. O isolamento da escopolamina de *Datura stramonium* L. por Landenburg em 1881 e da papaverina por G. Merck em 1848 e a sua utilização por suas propriedades antiespasmódicas são igualmente exemplos da importância desse grupo de substâncias. Outros importantes alcalóides incluem a vincristina e a vimblastina (antineoplásicos), a reserpina (antidepressivo), a galantamina (tratamento do Mal de Alzheimer) e a quinidina (depressor cardíaco). Atualmente, muitas pesquisas estão sendo realizadas para o isolamento de novos alcalóides com propriedades terapêuticas (Rao et al., 2011; Simões et al., 1999b; Tan et al., 2010)

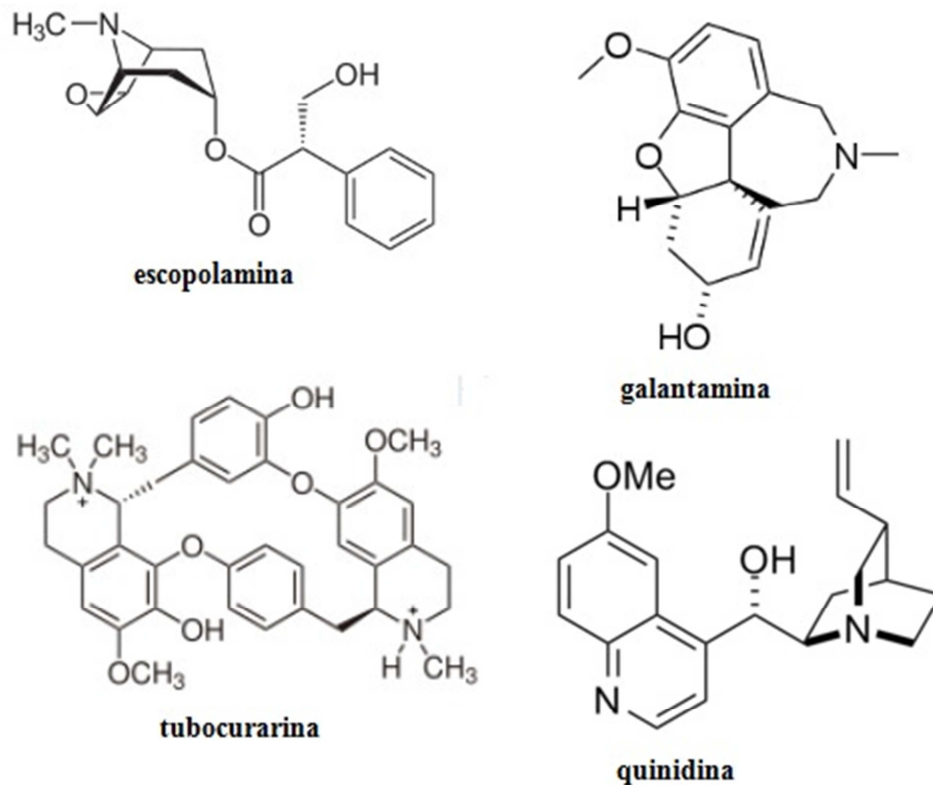


Figura 6. Exemplos de alguns tipos de alcalóides.

2.3 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

A espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels pertence à família das Mirtáceas (Myrtaceae) que compreende mais de 4.620 espécies agrupadas em 129 gêneros. Esta é uma árvore nativa das regiões dos trópicos, particularmente da Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar. A planta foi introduzida em muitas regiões tropicais como: leste e oeste da Índia e da África, bem como no Brasil, sendo encontrada em diversos estados das regiões sudeste, sul, nordeste e norte. Também é encontrada em algumas regiões subtropicais como Flórida, Califórnia, Argélia e Israel. A árvore da espécie é de grande porte (10 metros de altura), com folhas simples e frutos cor roxo–escura, com uma única semente coberta de polpa comestível, mucilaginoso, doce, mas adstringente (Figura 7). Os principais sinônimos da *Syzygium cumini* são *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Myrtus cumini* L e *Syzygium jambolanum*. Popularmente, a *Syzygium cumini* (L.) Skeels é conhecida como jambolão, cereja, azeitona, jamelão, jalão, jambol, jambu, jambul, azeitona–do–nordeste, murta e ameixa roxa (Lorenzi and Matos, 2002).



Figura 7. Árvore, frutos e folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

A casca, fruto, sementes e folhas dessa planta, são utilizadas pela população principalmente no tratamento do diabetes e administrados na forma de diferentes preparados como extrato aquoso ou decocção, extrato etanólico ou o suco da planta crua (Pepato et al., 2001).

2.3.1 Composição fitoquímica e ação farmacológica

O jambolão é rico em compostos contendo antocianidinas, glicosídeos, ácido elágico, isoquercetina, caempferol, e mirecetina. Todas as partes da espécie (folhas, sementes, frutos e casca) tem uma longa história de uso medicinal em várias culturas populares. As sementes possuem na sua composição alcalóides, como a jambosina, e glicosídeos como a jambolina e a antimelina (Ayyanar and Subash-Babu, 2012). Elas também têm sido descritas por serem ricas em flavonóides, compostos conhecidos por serem antioxidantes, que atuam capturando radicais livres e protegem as enzimas antioxidantes das células (Ravi et al., 2004). Estudos mostram que extratos preparados a partir das sementes do jambolão podem atuar como agentes quimiopreventivos contra o estresse oxidativo e o dano genômico (Arun et al., 2011), protegem contra a toxicidade sistêmica do metil-mercúrio em ratos (Abdalla et al., 2011), além de possuir efeitos anti-inflamatórios (Chaudhuri et al., 1990). Na medicinal popular, o extrato das sementes é utilizado para o tratamento da diabetes, resfriado, tosse, úlcera e problemas na pele.

Os frutos do jambolão são pequenos, de 2 a 3 centímetros de tamanho, com uma forma oval e coloração que varia de vermelho a preto quando maduros. São vendidos secos e sem sementes nos mercados dos Estados Unidos e em países da Europa. Os frutos maduros são

também usados para a produção de bebidas saudáveis, sucos e geléias (Baliga et al., 2011). Além de possuir atividade antioxidante *in vitro* (Faria et al., 2011) e atividade anti-hiperglicêmica (Sharma et al., 2006), extratos preparados a partir dos frutos demonstraram ter efeitos anti-proliferativo e pró-apoptótico contra células cancerígenas de mama, mas não contra células normais de mama (Li et al., 2009). Na sua composição, os frutos contêm vitamina C, ácido gálico, taninos, antocianidinas, incluindo cianidina, petunidina, malvidina-glicosídeo e carotenóides como a *trans*-luteína e a *trans*- β -caroteno (Banerjee et al., 2005; Faria et al., 2011). A casca da árvore é outra parte do jambolão que também é aproveitada para fins terapêuticos. Ela é utilizada no tratamento de bronquite, inflamação na garganta e asma (Ayyanar and Subash-Babu, 2012; Sultana et al., 2007). Sutana et. al, (2007) analisaram a atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos de extratos preparados a partir da casca de três árvores diferentes, entre elas a árvore do jambolão. Das três árvores, o extrato a partir da casca do jambolão foi o que teve a maior capacidade antioxidante no ensaio de inibição da oxidação do ácido linoléico. Outro estudo mostrou que o extrato etanólico da casca do jambolão possui significativa atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais (Muruganandan et al., 2001).

O Diabetes mellitus é uma desordem metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia e associada com uma absoluta ou relativa deficiência na ação ou secreção da insulina (Kim et al., 2006). Essa doença mortal afetou cerca de 285 milhões de pessoas em todo o mundo em 2010 e o número de pessoas afetadas está aumentando cada vez mais, principalmente nas populações rurais e pobres do planeta (Shaw et al., 2010). A *Syzygium cumini* (L.) Skeels tem sido intensamente estudada como um agente antidiabético e é frequentemente recomendada como um auxílio no tratamento do diabetes tipo 2 (Bona et al., 2010). No Brasil, a maioria das pessoas utiliza uma infusão ou uma decocção das folhas secas em uma diluição média de 2,5 g/L (Teixeira and Fuchs, 2006). A atividade hipoglicemiante das folhas do jambolão tem sido investigada experimentalmente através de modelos *in vivo* (Schoenfelder et al., 2010), *in vitro* (Bona et al., 2010) e em modelos clínicos (eixeira et al., 2000). Entretanto, há certa discordância entre os resultados obtidos.

Alguns dos efeitos benéficos ocasionados pelos extratos das folhas de *S. cumini* parece ser através da atividade antioxidante dos compostos bioativos presente nos extratos. No estudo desenvolvido por Bona et al., (2010), o extrato (80% etanol) das folhas reduziu significativamente os níveis de TBARS em plaquetas de pacientes diabéticos. Segundo os autores, esse efeito pode ser devido à presença de compostos fenólicos como o ácido gálico, o

ácido clorogênico e a rutina, uma vez que esses compostos são conhecidos por serem antioxidantes. Jagetia e Baliga, (2002) observaram que o extrato (diclorometano/metanol 1:1) das folhas de jambolão consegue proteger contra o dano no DNA induzido por radiação- γ em cultura de linfócitos de sangue humano e sugerem que esse efeito está relacionado com a capacidade antioxidante do extrato. Nesse trabalho, os autores também acreditam que o efeito antioxidante do extrato pode estar relacionado com o conteúdo de compostos fenólicos como os flavonóides quercetina, miricitina e kaempferol. Alguns estudos *in vitro* (Kaneira and Chanda, 2011; Ruan et al., 2008) já foram realizados para avaliar a atividade antioxidante de extratos preparados a partir das folhas do jambolão. Entretanto na literatura há poucos estudos que avaliam a atividade antioxidante desses extratos em modelos *in vivo*.

As folhas possuem outras ações farmacológicas como atividade anti-inflamatória (Lima et al., 2007) e antibacteriana (Shafi et al., 2002). Na composição das folhas estão presentes flavonóis glicosídicos acilados, quercetina, mirecetina, miricitina, miricetina-3-O-4-acetil-L-rhamnpiranosídeo, triterpenóides e taninos (Ayyanar and Subash-Babu, 2012; Mahmoud et al., 2001; Timbola et al., 2002).

2.4 Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas constantemente no corpo humano. Todos os organismos vivos aeróbios, como o homem, utilizam o oxigênio na produção de energia. A redução do oxigênio à água fornece a energia que permite a impressionante complexidade dos organismos superiores. Cerca de 95 a 98% do oxigênio consumido durante a respiração celular é para a produção de energia, o restante (2 a 5% do oxigênio metabolizado), produz ERO. Essas espécies também são geradas por outros processos catabólicos e anabólicos. Diversos locais dentro da célula podem gerar EROs (Figura 8). As mitocôndrias são consideradas como a fonte da maioria das EROs, especificamente do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). As reações que geram ATP na mitocôndria requerem elétrons de substratos reduzidos para serem passados ao longo da cadeia de transporte de elétrons. Elétrons que “vazam” deste processo reagem com o oxigênio molecular (O_2) gerando o radical ânion superóxido. Esse radical é um mediador importante em inúmeras reações oxidativas em cadeia e também é um precursor para muitas outras ERO. Outras fontes importantes de ERO intracelular são: NADPH oxidases (gera ânion superóxido), óxido nítrico sintases (gera óxido nítrico) e lipoxigenases (gera hidroperóxidos de ácidos graxos). Além de

serem geradas no metabolismo celular, as ERO podem ser produzidas em resposta a diferentes estímulos externos com radiação ionizante, poluição, agentes oxidantes e quimioterápicos (Halliwell, 1991; Halliwell and Gutteridge, 2007)

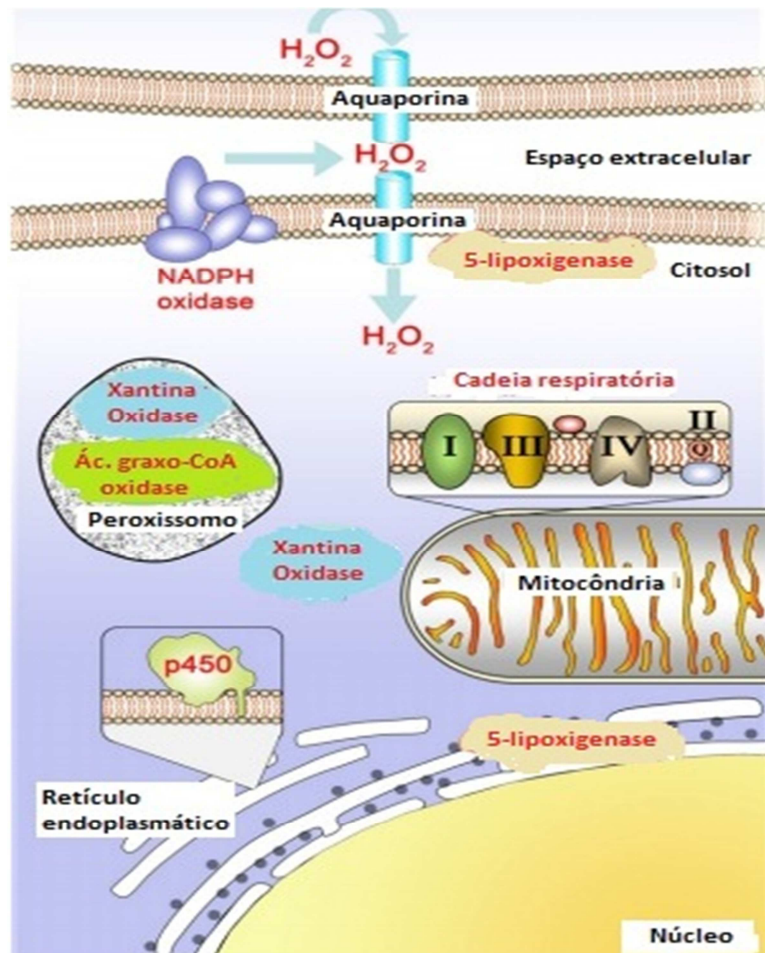


Figura 8. Locais dentro da célula onde as EROs são produzidas. (Modificado de Covarrubias et.al, 2008).

As ERO em baixos níveis e em condições normais possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Nesse processo, o oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido através do complexo da NADPH oxidase, que é usado para eliminar bactérias e partículas engolfadas pelos fagócitos, no processo chamado de fagocitose (Dröge, 2002 ; Halliwell and Gutteridge, 2007). Há evidências de que as ERO também desempenham um papel importante na sinalização celular

(Ray et al., 2012). Entretanto, devido a sua elevada reatividade, o acúmulo de ERO além das necessidades imediatas da célula pode afetar a estrutura celular e a integridade funcional, ao provocar a degradação oxidativa de moléculas críticas, tais como o DNA, proteínas e lipídios (Cui et al., 2004). As ERO incluem inúmeras moléculas quimicamente derivadas do oxigênio e abrangem espécies radiculares, como o radical hidroxil (OH^\bullet) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), bem como espécies não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Devido a sua alta reatividade, o radical OH^\bullet é provavelmente o radical capaz de causar mais danos aos sistemas biológicos do que qualquer outra ERO. Ele reage rapidamente com a maioria das biomoléculas presentes em uma célula viva: açúcares aminoácidos, fosfolipídios, DNA e ácidos orgânicos. O radical é formado pelo H_2O_2 na reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+), muitas vezes ligados em complexos com diferentes proteínas ou outras moléculas. Esta reação é conhecida como Reação de Fenton (Figura 9).

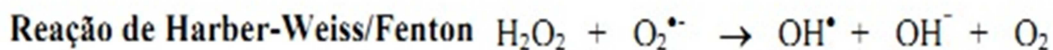
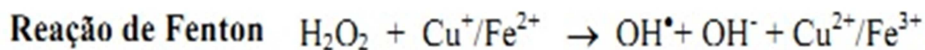
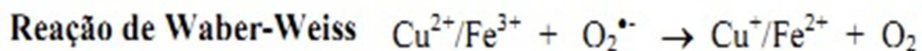


Figura 9. Representação da formação do radical OH^\bullet pelas reações de Haber Weiss/Fenton. Adaptado de Norberg & Árner, 2001.

As reações do OH^\bullet podem ser classificadas em três tipos: abstração de hidrogênio, adição ou transferência de elétrons. A reação deste radical com biomoléculas normalmente produz outro radical de menor reatividade, o qual também pode atacar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Um exemplo é o radical peroxil (RO_2^\bullet) que é formado pelo ataque do OH^\bullet a compostos orgânicos. A capacidade do OH^\bullet em lesar as células é superior às demais EROs, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra a ele. Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é evitar que o mesmo seja gerado. Por esta razão as células mantêm um rígido controle sobre a homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e os íons metálicos são mantidos em sua valência mais alta ou estão em alguma forma complexados a enzimas e proteínas onde são armazenados e/ou fazem

parte funcional das mesmas (Fridovich, 1998; Halliwell, 1991; Halliwell and Gutteridge, 2007).

O $O_2^{\bullet-}$ é formado a partir do oxigênio pela adição de um elétron e, apesar de ser um radical, não é altamente reativo. A formação de $O_2^{\bullet-}$ acontece especialmente em ambientes aeróbios ricos em elétrons, como a cadeia de transporte de elétrons, que parece ser a fonte mais importante de $O_2^{\bullet-}$ em muitas células aeróbicas. O $O_2^{\bullet-}$ também é gerado por algumas enzimas como a xantina oxidase e flavoproteínas. Em geral, o $O_2^{\bullet-}$ em solução aquosa (pH 7,4) não é altamente reativo. As taxas de reação com DNA, lipídios, aminoácidos e muitos outros metabólitos são muito lentas, e podem ser zero. O dano biológico direto causado pelo $O_2^{\bullet-}$ é altamente seletivo e frequentemente envolve reações com outros radicais (ex. NO^{\bullet}) ou com íons de ferro em proteínas ferro-enxofre. O $O_2^{\bullet-}$ pode especificamente oxidar o sítio [4Fe-4S] de enzimas importantes no metabolismo energético e de aminoácidos, de maneira a inibir certas vias metabólicas. Esse processo pode causar a liberação do íon Fe^{+2} do sítio e a inativação da enzima, bem como levar a um dano oxidativo adicional de outros componentes celulares, uma vez que o ferro livre pode promover, via reação de Fenton, a formação do OH^{\bullet} (Halliwell and Gutteridge, 2007; Kuppasamy and Zweier, 1989; Nordberg and Arnér, 2001).

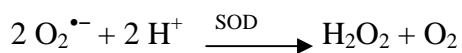
Apesar de não ser um radical livre, o H_2O_2 atua como subproduto na formação de radicais reativos via oxidação com metais de transição. O H_2O_2 pode atravessar rapidamente as membranas celulares, e uma vez dentro, pode reagir com íons de ferro e cobre gerando o OH^{\bullet} que é altamente reativo. Esse composto é produzido por enzimas como: xantina, urato e D-aminoácido oxidases. Além disso, todo sistema biológico que gera $O_2^{\bullet-}$ também gera H_2O_2 através da dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$. Outra fonte de H_2O_2 é a β -oxidação de ácidos graxos. O H_2O_2 é um agente fracamente redutor e oxidante. Por exemplo, não ocorre oxidação quando DNA, lipídios ou proteínas são incubadas com H_2O_2 , até mesmo em níveis milimolares de H_2O_2 . Entretanto, o H_2O_2 parece ser capaz de inativar algumas enzimas diretamente, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, através da oxidação de grupamentos tióis no sítio ativo (Halliwell and Gutteridge, 2007; Nordberg and Arnér, 2001).

2.5 Principais defesas antioxidantes

As células possuem muitas maneiras de responder contra as EROs, incluindo antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. O balanço entre a produção e a degradação de ERO mantém a homeostase celular (Covarrubias et al., 2008).

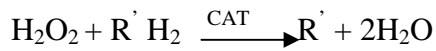
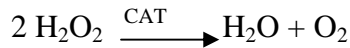
Entre os antioxidantes não-enzimáticos mais comuns estão a glutatona reduzida (GSH) e a tioredoxina (Trx). A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina) sintetizado pela ação catalítica da γ -glutamil-cisteinil-sintetase e da glutatona sintetase. Está envolvida na destoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, bem como pode interagir com outras espécies reativas como OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Holmgren et al., 2005; Lu, 1999). Uma vez que a GSH é oxidada gerando a glutatona oxidada (GSSG), a forma reduzida pode ser regenerada através da enzima GSH redutase. A GSH é utilizada por uma série de enzimas como a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona-S-transferase. O balanço entre GSH e GSSG é uma maneira de determinar o estado redox dentro da célula (Covarrubias et al., 2008). Por outro lado, tioredoxinas (Trx), assim como glutaredoxinas (Grx) são pequenas proteínas que contêm um sítio ativo com um dissulfeto redox-ativo. Essas proteínas mantêm o estado redox na célula reduzido através da redução de proteínas com grupamento tiol (Holmgren et al., 2005). A regulação redox é uma importante função em eventos biológicos como a ativação de enzimas, expressão gênica seletiva, síntese do DNA e regulação do ciclo celular. As tioredoxinas regulam as transduções de sinais extra e intra-celular, mecanismos de transcrição, crescimento celular e metabolismo de glicose e lipídios (Watanabe et al., 2010).

As enzimas antioxidantes atuam em conjunto para remover várias ERO produzidas por reações de radicais livres. As enzimas superóxido dismutases, CuZn-SOD (citosólica) e Mn-SOD (mitocondrial), são metalo-enzimas que catalizam a dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 (Covarrubias et al., 2008; Halliwell and Gutteridge, 2007) Nessa reação, duas moléculas de superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio. A reação catalisada por SOD é extremamente eficiente.

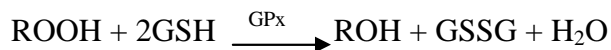


Na mitocôndria, o superóxido é formado relativamente em altas concentrações, devido à dispersão de elétrons da cadeia respiratória, sendo a MnSOD essencial (Halliwell and Gutteridge, 2007).

O H_2O_2 gerado pelas superóxido dismutases é convertido em água e oxigênio pela catalase. Essa enzima também pode destoxificar outros substratos como fenóis e álcoois através da redução acoplada do H_2O_2 (Fridovich, 1998). A catalase (CAT) é uma heme-enzima que está localizada tanto no citosol como nos peroxissomos em células eucariotas.



A glutatona peroxidase (GPx) é outra enzima que converte o H_2O_2 em água. Além disso, ela também atua na proteção contra peróxidos orgânicos. A GPx é dependente de selênio e necessita da presença de glutatona reduzida (GSH) conforme a reação abaixo:



Existem ainda as PHGPx (fosfolipídio hidroperóxido glutatona peroxidase), que são enzimas associadas a membrana, capazes de reduzir peróxidos orgânicos. Essas enzimas são as principais na reparação de peróxidos lipídicos na membrana (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Os mecanismos de sistemas antioxidantes atuam cooperativamente (Figura 10). A ausência de uma das defesas acarreta um desequilíbrio no estado redox da célula, podendo levá-la a um aumento na sensibilidade a agentes oxidantes intra ou extracelular (Dröge, 2002).

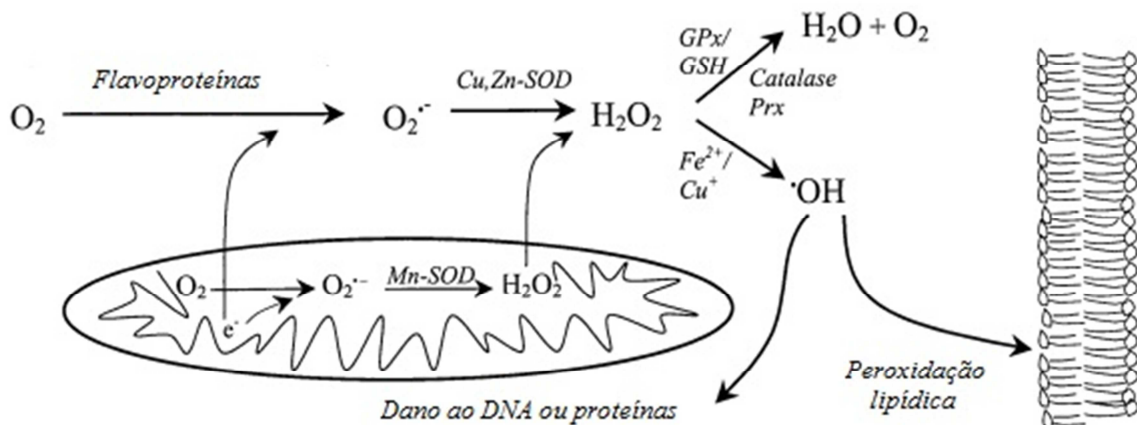
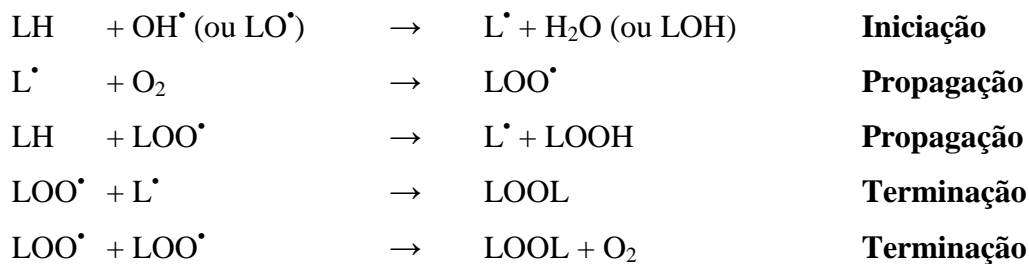


Figura 10. Atuação cooperativa dos sistemas antioxidantes presente nas células. Adaptado de Norberg & Árnér, 2001.

2.6 Estresse oxidativo

Uma condição de estresse oxidativo é gerada quando a célula acumula um excesso de ERO. Isso ocorre quando a produção de ERO excede as defesas celulares. Todas as células ativas produzem certa quantidade de ERO, mas o sistema antioxidante mantém os níveis baixos. Como um efeito passivo, as ERO podem danificar as células através do dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA (Covarrubias et al., 2008).

A peroxidação lipídica é provavelmente o tipo de dano mais explorado em pesquisas quando se trata de ERO. Os ácidos graxos poliinsaturados são, por ter múltiplas ligações duplas, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (Nordberg and Arnér, 2001). O processo de peroxidação lipídica consiste em três estágios: iniciação, propagação e terminação.



Na etapa de iniciação, há a produção de radicais centrados em carbono (L[•]) através da interação da molécula de ácido graxo poliinsaturado com um radical livre. Na fase de propagação, o radical centrado em carbono reage rapidamente com O₂ formando o radical peroxil que pode atacar outra molécula de ácido graxo poliinsaturado. Essa etapa leva a formação contínua de hidroperóxidos com o consumo de quantidade equimolar de ácidos graxos. A etapa de terminação ocorre quando não há mais ácidos graxos para reagir. Desta forma há a reação de um radical peroxil com outro radical peroxil, gerando um produto inativo (Vasudevan et al., 2011).

A oxidação dos lipídios de membrana pode causar mudanças na estrutura e na fluidez celular (Styskal et al., 2012). O produto inicial da oxidação de ácidos graxos insaturados são os hidroperóxidos lipídicos, mas outros intermediários também são formados. Um dos mais conhecidos formados na peroxidação lipídica é o malondealdeído (MDA). Esse composto reage facilmente com proteínas e DNA. Por ser solúvel em água, o MDA é suficientemente estável para se difundir do seu sítio de formação (ex. membranas) para outro sítio (ex. núcleo) podendo causar danos ao DNA (Styskal et al., 2012; Yonei and Furui, 1981). Yonei e Furui,

(1981) demonstraram que o MDA pode induzir danos no DNA responsáveis pelas ações letais e mutagênicas em células de *Escherichia coli*.

Os aminoácidos são muito sensíveis a ataques de ERO. A nível celular, quando proteínas são expostas a ERO, modificações nas cadeias laterais dos aminoácidos ocorrem e, conseqüentemente, a estrutura da proteína é alterada. Essas modificações levam a alterações funcionais que perturbam o metabolismo celular. Por exemplo, o OH^\bullet pode causar a clivagem de proteínas ao reagir com resíduos como o ácido glutâmico, triptofano, metionina e prolina, formando diversos produtos. Esse radical pode ainda inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidril (-SH) a pontes de dissulfeto (-S-S). Uma vez oxidada, as proteínas podem ser reparadas ou, se o reparo não é possível, degradadas ou excluídas da célula para minimizar os possíveis efeitos negativos dessas proteínas danificadas. Os aminoácidos contendo enxofre (cisteína e metionina) são os únicos que possuem enzimas específicas reparadoras de dano oxidativo. (Halliwell and Gutteridge, 2007; Levine and Stadtman, 2001; Styskal et al., 2012).

O DNA tanto nuclear como mitocondrial é susceptível a oxidação por ERO. As ERO reagem através da adição de duplas ligações nas bases do DNA e por abstração de um átomo de hidrogênio do grupamento metil da timina e de cada ligação C-H da 2-desoxirribose. Essas reações produzem uma série de lesões, danificando as bases nitrogenadas e desoxirriboses, causando quebra simples na cadeia, criando sítiosapurínicos e apirimidínicos (sítios AP) e modificando as bases e as ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Desta forma, os danos oxidativos no DNA podem provocar bloqueio na replicação, mutações, anormalidades cromossômicas e conseqüentemente uma grande toxicidade. A oxidação do DNA tem sido relacionada fortemente com senescência celular, a apoptose e o desenvolvimento do fenótipo de células cancerígenas. (Cooke et al., 2003; Styskal et al., 2012).

O acúmulo de danos oxidativos em lipídios, proteínas e no DNA estão relacionados com a patogênese de diversas doenças como diabetes, câncer, doença de Parkinson, doenças cardiovasculares, aterosclerose, ischemia-reperfusão e no envelhecimento acelerado. Por exemplo, no diabetes as ERO são formadas desproporcionalmente pela oxidação da glicose, glicação não-enzimática de proteínas e subsequente degradação oxidativa das proteínas glicadas. Essas proteínas podem ser enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, que são inativadas por glicação. Além disso, O estresse oxidativo gerado pelas ERO pode reduzir a expressão de genes relacionados com as enzimas antioxidantes. Os níveis anormais de ERO e o declínio das defesas antioxidantes podem levar ao dano celular de organelas e enzimas,

aumentando a peroxidação lipídica e desenvolvendo resistência a insulina (Maritim et al., 2003). A produção excessiva de ERO no diabetes pode gerar disfunções endoteliais que estão diretamente relacionadas com um aumento no risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose (Pennathur and Heinecke, 2007).

O envelhecimento é um processo inerentemente complexo que se manifesta dentro de um organismo a níveis molecular, celular, genético e em órgãos e sistema. Embora os mecanismos fundamentais sejam pouco compreendidos, há evidências de que as ERO participem como um dos principais determinantes do envelhecimento. O envelhecimento é caracterizado como um declínio progressivo nas funções biológicas com o tempo o que causa um decréscimo na resistência a múltiplas formas de estresse, bem como um aumento na susceptibilidade a muitas doenças. Um exemplo disso é a incidência de doença de Parkinson em 1 a 2% da população acima dos 65 anos de idade e de 4% na população acima dos 85 anos de idade (Bekris et al., 2010; de Rijk et al., 2000; Kregel and Zhang, 2007).

A doença de Parkinson é uma doença crônica e progressiva que está associada com a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNc), assim como com muitas mudanças neuronais que causam sintomas motor e não motor complexos (Perfeito et al., 2012). O estresse oxidativo contribui para a cascata que conduz à degeneração das células de dopamina na doença de Parkinson. Entretanto, o estresse oxidativo está intimamente ligado a outros componentes do processo degenerativo, como a disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, toxicidade do óxido nítrico e inflamação. Por isso, é difícil determinar se o estresse oxidativo leva ou é uma consequência desses eventos (Jenner, 2003).

2.7 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular que cresce tanto em condições anaeróbicas como aeróbicas. Esse organismo fermenta hexoses como a glicose e a frutose, sendo a glicose a principal fonte de carbono (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Gancedo, 1998). A *S. cerevisiae* apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. O crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (Figura 11). Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD – 2% de glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o

metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diauxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Fuge and Werner, 1997; Pringle and Hartwell, 1982).

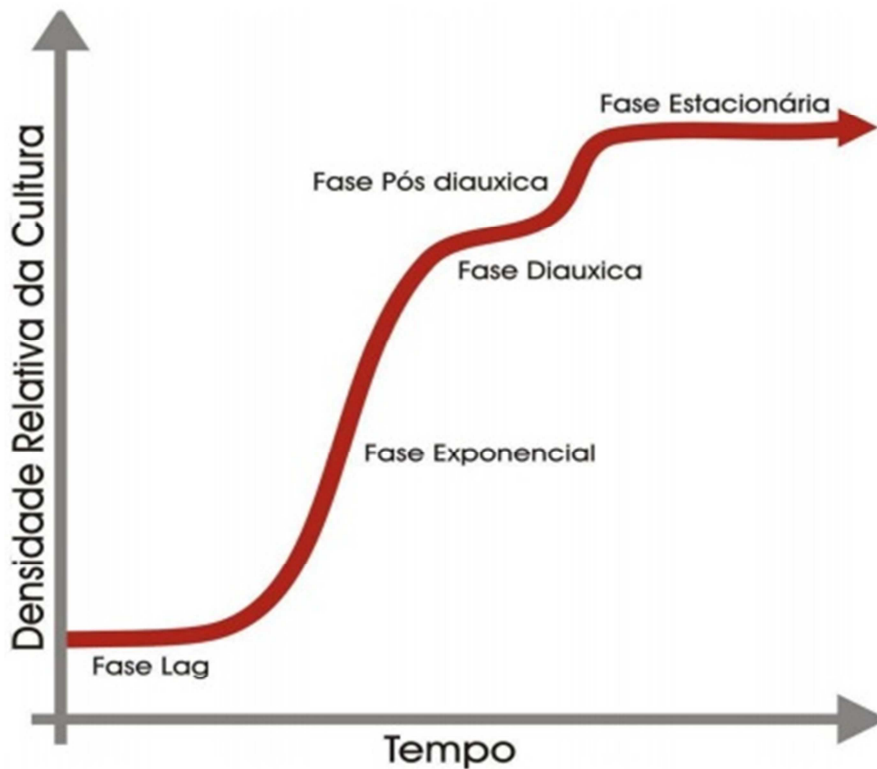


Figura 11. Fases de crescimento de uma linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* quando iniciada em meio completo. Adaptado de Fuge & Werner, 1997.

A *S. cerevisiae* tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas em razão da sua notável semelhança às células de mamíferos no que se refere às macromoléculas, organelas e um grande número de proteínas com alta homologia com proteínas humanas. Esse organismo é utilizado em pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Algumas das propriedades que tornam a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem o seu rápido crescimento, segurança, possuir um sistema genético bem definido e mais significativamente, o conhecimento da sequência completa do seu genoma. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente

sequenciado e depositado em bancos de dados especializados, permitindo a clonagem de diferentes genes, sua rápida identificação e caracterização, assim como melhor compreensão da sua função celular (Jones et al., 2008; Peña-Castillo and Hughes, 2007).

2.7.1 Defesas antioxidantes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Organismos aeróbicos enfrentam a toxicidade do oxigênio através da operação de um sistema de defesa antioxidante capaz de neutralizar e remover espécies reativas (EROs), bem como eliminar constituintes celulares danificados e reparar os danos (Halliwell, 2006). A levedura *S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesas contra danos oxidativos tanto enzimáticos como não-enzimáticos. Um elaborado mecanismo enzimático constituído de superóxido dismutases, redutases, catalases, peroxidoredoxinas, glutaredoxinas e glutathione transferases é utilizado para manter o balanço redox nesse organismo (Herrero et al., 2008). Como a maioria dos outros eucariotos, a *S. cerevisiae* possui duas superóxido dismutases intracelulares, a CuZn-SOD (produto do gene *SOD1*) localizada no citoplasma, núcleo e lisossomas e a Mn-SOD (produto do gene *SOD2*) na matriz mitocondrial (revisado por Jamieson, 1998). Fenótipos mutantes de *S. cerevisiae* com deleção para os genes *SOD1* e/ou *SOD2* fornecem importantes informações com relação à função destas enzimas. A CuZn-SOD parece ser a enzima majoritária envolvida na remoção de ânions superóxido do citoplasma e também dos peroxissomos (Jamieson et al., 1994). Linhagens deficientes em CuZn-SOD apresentam problemas de crescimento em condições aeróbicas, são muito sensíveis a hiperóxia (excesso de oxigênio) e a substâncias envolvidas em reações tipo ciclo-redox, tais como paraquat e menadiona (Srinivasan et al., 2000). O papel fisiológico da Mn-SOD parece ser proteger a mitocôndria dos superóxidos gerados durante a respiração, tendo pouca participação no combate a superóxidos gerados por compostos redox-cíclicos. Linhagens deficientes em Mn-SOD são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não-fermentáveis. A sensibilidade à hiperóxia é revertida pela mutação rho⁰ (leveduras sem mitocôndrias), confirmando o papel decisivo da mitocôndria na geração de O₂^{•-} (Guidot et al., 1993; Jamieson et al., 1994).

A levedura *S. cerevisiae* possui dois tipos de catalases denominadas catalase A e catalase T codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1*, respectivamente. A catalase A está localizada nos peroxissomos e o principal papel fisiológico dessa enzima é remover o H₂O₂ produzido pela β-oxidação de ácidos graxos. Já a catalase T está localizada no citoplasma e

seu papel fisiológico ainda não é muito claro, uma vez que mutantes deficientes nessa enzima não apresentam defeitos no crescimento nem sensibilidade aumentada a peróxidos (Jamieson, 1998).

Existem três tipos de glutathione peroxidase em levedura denominadas GPX1, GPX2 e GPX3. Linhagens deficientes em GPX3 são hipersensíveis a peróxidos, enquanto que linhagens deficientes em GPX1 e GPX2 não apresentam sensibilidade. Entretanto em condições de estresse gerado por substâncias endógenas como o paraquat, menadiona e H₂O₂ não há a indução da expressão do gene *GPX3*. A indução do gene *GPX1* ocorre quando há restrição de glicose enquanto que o gene *GPX2* é induzido em condições de estresse oxidativo (Inoue et al., 1999).

Leveduras possuem também tiorredoxina peroxidase e tiorredoxina redutase que atuam na redução de H₂O₂, hidroperóxidos de alquila e agentes que contém grupos tióis como o mercaptoetanol. Outra importante enzima dentro do mecanismo enzimático antioxidante da *S. cerevisiae* é a glutathione redutase. Essa enzima é responsável pela manutenção da elevada razão GSH/GSSH através da redução da glutathione oxidada (Jamieson, 1998). Linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em glutathione redutase, embora viáveis, acumulam um excesso de glutathione oxidada e são hipersensíveis a oxidantes (Grant et al., 1996).

Talvez o exemplo mais conhecido de defesa antioxidante não-enzimática seja a glutathione reduzida (GSH). Vários estudos têm demonstrado que a GSH é uma importante molécula antioxidante em leveduras. Além disso, em condições de restrição alimentar a GSH também pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e enxofre pela levedura (Mehdi and Penninckx, 1997). Na *S. cerevisiae* dois genes, *GSH1* e *GSH2* (codificam a γ -glutamyl-cisteinil-sintetase e a glutathione sintetase, respectivamente), estão envolvidos na biossíntese de glutathione. Mutantes deficientes em *GSH1* e *GSH2* possuem baixa taxa de crescimento, maior fase lag (adaptação) em relação à linhagem selvagem, mostram defeitos na esporulação e são sensíveis a compostos como o H₂O₂, menadiona, cádmio e metiogloxal. Outras moléculas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo em *S. cerevisiae* são: trealose, metalotioneína, tiorredoxina e glutarredoxina (Jamieson, 1998; Ohtake et al., 1990; Stephen and Jamieson, 1996; Suizu et al., 1994).

2.7.2 O uso de *S. cerevisiae* para o estudo de substâncias com efeitos pro- e/ou antioxidantes

Linhagens deficientes e proficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox celular (Brennan and Schiestl, 1998; Lee et al., 2001). Essas linhagens podem simular o ambiente redox intracelular frequentemente encontrado em condições de patologia humana (Amari et al., 2008). Por exemplo, mutações na CuZn-SOD em humanos estão ligadas a esclerose lateral amiotrófica. Além disso, cerca de 30% dos genes envolvidos em doenças humanas tem algum ortólogo em leveduras (Mager and Winderickx, 2005; Rosen et al., 1993).

Um método utilizado consiste em comparar a sensibilidade ao tratamento com um agente físico (por ex. radiação) ou químico (por ex. pró/antioxidante) de diversas mutantes deficientes em enzimas antioxidantes ou em um fator de transcrição sensível ao estado redox ou ainda deficiente na síntese de GSH, a fim de avaliar a importância de cada defesa antioxidante celular na desintoxicação do agente testado. Também é possível combinar um oxidante conhecido, como H₂O₂, t-BOOH e paraquat, com uma substância antioxidante ou com outro composto de mecanismo desconhecido, e avaliar o efeito do tratamento da substância na modulação do estresse oxidativo. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (Roehrs, 2004; Roehrs et al., 2010; Rosa et al., 2006; Silva et al., 2005)

Esta metodologia pode ser aplicada para avaliar a atividade antioxidante de extratos preparados a partir de uma determinada planta medicinal utilizada na medicina popular. Com isso, podem-se obter informações científicas relevantes da planta em estudo. Silva et al., 2005 realizaram um estudo com 22 extratos alcoólicos obtidos de diferentes partes de 14 espécies de plantas medicinais utilizando como modelo experimental *in vivo* a linhagem selvagem de levedura BY4741. Dos 22 extratos testados, 5 extratos conseguiram aumentar a tolerância celular contra o hidropéroxido de terc-butila (agente estressor). Rosa et al., (2006) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico preparado a partir das flores de *Hibiscus tiliaceus* L. utilizando linhagens deficientes em produção de GSH, superóxido dismutases, glutatona peroxidase, catalase, glutatona redutase e fator de transcrição Yap1p. Esse extrato mostrou ter ação antioxidante uma vez que aumentou a sobrevivência de todas as linhagens testadas independente da defesa antioxidante deficiente. Outros estudos também utilizam essa metodologia para avaliar a atividade antioxidante de compostos bioativos isolados, como por

exemplo, a catequina, quercetina, hisperina, resveratrol, β -caroteno, ácido ascórbico e ácido cafeico (Amari et al., 2008; Dani et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse trabalho propõe avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos.
- Analisar o conteúdo total de compostos fenólicos e flavonóides nos extratos.
- Qualificar e quantificar rutina, quercetina e ácido gálico nos extratos.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* dos extratos através do crescimento de linhagens de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em superóxido dismutase (SOD) após 24 h de exposição à paraquat (pró-oxidante) e a diferentes concentrações dos extratos.
- Avaliar a peroxidação lipídica das linhagens após 24 h de exposição ao paraquat e aos extratos.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado nas normas da Revista *Journal of Ethnopharmacology*.

***In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of the extracts from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves**

Jefferson J. Soares^a, Anderson S. Rosa^a, Cristiano C. Spiazzi^b, Paola R. Motta^a, Ingrid R. K. Motta^a, Francielli W. Santos^b, Rafael Roehrs^a, Elton L. G. Denardin^{a*}

* Campus Urugaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Urugaiana, RS, Brazil. Phone: 55-55-3413-4321/ FAX: 55-55-3413-4321. E-mail: edenardin@yahoo.com.br

^a Laboratório de Estudos Físico-Químicos e de Produtos Naturais (LEFQPN), Campus Urugaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Urugaiana, RS, Brazil.

^b Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Urugaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Urugaiana, RS, Brazil.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels are traditionally used for the treatment of fever, stomachalgia, constipation and gastropathy. This medicinal plant is widely distributed in southern Brazil and has been used mainly to treat diabetes. The aim of this study is to evaluate the antioxidant activity of the three different extracts prepared from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves using *in vitro* and *in vivo* models.

Materials and methods: Antioxidant activity *in vitro* was evaluated by different assays, including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, total antioxidant capacity (TAOC) and reducing power. As *in vivo* model, we used yeast *Saccharomyces cerevisiae* deficient in superoxide dismutase (SOD). Growth of the strains and lipid peroxidation were assessed after 24 hours exposure concomitantly to paraquat (pro-oxidant) and different concentrations of the extracts. Moreover, quantification of total phenolic content, total flavonoid content and HPLC analysis were also assessed.

Results: The extracts shown to have *in vitro* antioxidant activity through the ability to donate electrons and hydrogen. Paraquat inhibited growth and increased MDA (malondialdehyde) levels in the yeast cells treat only with paraquat. The three extracts were able to assist the growth of strains and reduce MDA levels even in the presence of paraquat. The contents of flavonoids and total phenolic compounds could be correlated with the antioxidant activity observed in the extracts.

Conclusion: The results indicate that leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels possess antioxidant activity which may contribute to their traditional use in treatment of many diseases.

Keywords: *Syzygium cumini* (L.) Skeels, antioxidant activity, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*, phenolic compounds.

1. Introduction

Syzygium cumini (L.) Skeels (synonym: *Eugenia jambolana*) belonging to the Myrtaceae family, is a medicinal plant used in the treatment of various diseases. In Brazil, most of the people use an infusion or decoction of dry leaves for the treatment of diabetes mellitus (Teixeira and Fuchs, 2006). Research shows that leaves *S.cumini* have pharmacological activities as anti-inflammatory (Lima et al., 2007), antibacterial (Shafi et al., 2002), radioprotective (Jagetia and Baliga, 2002) and antioxidant (Ruan et al., 2008).

Abundant biochemical, biological, and clinical evidence suggests the involvement of oxidative stress induced by free radicals in the pathogenesis of various diseases like diabetes, cancer, hypertension and in the accelerated aging (Halliwell and Gutteridge, 2007). Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\bullet OH$) are produced as normal by-products of aerobic cellular metabolism. They act as modulators of internal biological processes, including signal transduction, transcription, or programmed cell death (Cui et al., 2004). Cells have many ways to control the production of the ROS, including enzymatic (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase) and non-enzymatic antioxidants (ascorbic acid, α -tocopherol and glutathione). An oxidative stress condition is generated when a cell accumulates an excessive concentration of ROS. This occurs when ROS production exceeds cellular defenses. ROS can be detrimental to cells due to oxidative damage to lipids, proteins, and DNA (Covarrubias et al., 2008). For this reason, more attention has been given to natural antioxidant that can serve as a preventive medicine (Krishnaiah et al., 2011) in an effort to protect the human body against free radicals and retard the progress of many chronic diseases.

Plants contain a wide variety of free radical scavenging molecules, such as flavonoids, anthocyanins, carotenoids, dietary glutathione, vitamins and endogenous metabolites and such natural products are rich in antioxidant activities (Choi et al., 2002). Recently, the leaves of *S.cumini* has been reported to possess compounds as rutin, chlorogenic acid and gallic acid (Bona et al., 2010). These compounds have been reported to possess antioxidant and free radical scavenging activities (Aliaga et al., 2011; Karthikesan et al., 2010; Priscilla and Prince, 2009b). There are some *in vitro* studies that demonstrate antioxidant activity of extracts prepared from the leaves of *S. cumini* (Kaneira and Chanda, 2011; Ruan et al., 2008). However in the literature, there are few studies that evaluate the antioxidant activity of these extracts using *in vivo* models. Thus, the present study evaluated the antioxidant activity of

three extract, infusion extract (IE), aqueous extract (AE), and hydroalcoholic extract (HAE) prepared from *S. cumini* (L.) leaves using *in vitro* and *in vivo* models.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Gallic acid, rutin, DPPH, Thiobarbituric acid (TBA), malonaldehyde-bis-dimethyl acetal (MDA) and solvents for HPLC were purchased from Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Paraquat (Gramoxone[®]) was purchased from Bayer. All other commercial reagents used were of analytical grade.

2.2. Plant materials

Leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels were collected in the campus of Federal University of Pampa (Uruguaiana, RS, Brazil) during April-June, 2012 and identified by biologist Patricia Neves. A voucher specimen was deposited (No. 141) at herbarium Bruno Edgar Irgang of the Federal University of Pampa – Campus São Gabriel/RS.

2.3. Preparation of plant extract

Leaves of *S. cumini* were dried in a stove at 40 °C and powdered. The infusion extract (IE) was obtained adding 100 mL of distilled water at 90 °C to 5 g of leaves. The aqueous extract (AE) and hydroalcoholic extract (HAE) were prepared using 5 g of leaves and 100 mL of water and hydroalcoholic solution (50% water and 50% ethanol) respectively and sonicated in a ultrasonic bath at 40 KHz for 25 min. at 45 °C (Tabaraki and Nateghi, 2011). Solutions were filtered and the filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure in a rotator evaporator. The extracts were stored at -20 °C until use.

2.4. *In vitro* antioxidant activity

2.4.1. DPPH radical scavenging activity

The ability of AE, HAE and IE to scavenge the DPPH free radical were assayed according to Choi et al., (2002) with some modifications. Briefly, a 300 µM solution of DPPH in ethanol

was prepared. To 200 μL of this solution were added 630 μL of the Milli-Q water and 30 μL of the extracts at different concentrations. The mixture was shaken vigorously and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The reduction of the DPPH was measured by the decrease in absorption at 518 nm. Milli-Q water plus extracts solutions were used as a blank, while DPPH solution plus Milli-Q water was used as a control. Lower absorbances of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity. The DPPH radical scavenging activity was calculated by the following equation:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = (1 - A_{\text{extract } 518} / A_{\text{control } 518}) \times 100$$

The EC_{50} value is the concentration of the extract required to scavenge 50% of the DPPH free radical.

2.4.2. *Fe (III) Reducing power assay*

The reducing power of the extracts was estimated using the method by Gülçin et al., (2010). Different concentrations (50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the AE, HAE and IE in 0.75 mL of distilled water were mixed with 1.25 mL of 0.2 M, pH 6.6 sodium phosphate buffer and 1.25 mL of potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). The mixture was incubated at 50 $^\circ\text{C}$ for 20 min. After 20 min of incubation, the reaction mixture was acidified with 1.25 mL of trichloroacetic acid (10%). Finally, 0.5 mL of FeCl_3 (0.1%) was added to this solution, and the absorbance was measured at 700 nm. Ascorbic Acid (AA) and rutin (Ru) were used as reference standard. An increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power.

2.4.3. *Total antioxidant capacity (TAOC)*

The total antioxidant capacities of AE, HAE and IE were assayed according to the method of Prieto et al., (1999). Aliquots (0.30 mL) of the extracts were mixed with 2.7 mL of the reagent solution (0.6 M sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were capped with aluminium foil and incubated at 95 $^\circ\text{C}$ for 90 min. The tubes were cooled to room temperature and absorbance was measured at 695 nm against a blank. Rutin was used as reference standard. The higher absorbance value indicated higher antioxidant activity.

2.5. Determination total phenolic and flavonoid content

Total phenolic content of each extract was determined by the Folin–Ciocalteu micro-method (Slinkard and Singleton, 1977) with slight modification. Briefly, 25 μL solution (1 mg/mL) were mixed with 1.5 mL distilled water and 125 μL of Folin–Ciocalteu reagent. Reaction solution was shaken and allowed to stand for 1 min. After, was added 500 μL of Na_2CO_3 solution (15%) and solution was shaken for 30 s. Subsequently, reaction solution was incubated for 30 min and its absorbance was measured at 784 nm. Gallic acid was used as a standard for calibration curve. The phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (GAE) per mg of the extract.

The total flavonoid contents of AE, HAE and IE were determined using the aluminium chloride colorimetric method of Gülçin et al., (2010). The flavonoid content was calculated using a standard calibration of rutin solution and expressed rutin equivalents (Rue) per mg of the extract.

2.6. HPLC analysis

The HPLC profile of extracts was analysed by means of HPLC system (Young Lin 9100) with photodiode array detector (YL 9160). Samples (5 mg/ml) were filtered through a 0.22 μm PVDF-filter and injected into de HPLC column. The injection volume was 20 μL and the separation temperature was 25 $^\circ\text{C}$. The column was a Nucleosil C-18 (5 μm , 150 mm x 4.6 mm I.D). The method developed by Bona et al., (2010) was used with slight modification. For elution of the constituents, three solvents denoted as A (Milli-Q with 1% acid acetic), B (metanol) and C (acetonitrile) were employed. The solvent gradient elution program was as follows: 80% A and 20% B (0-3 min, flow: 0.8 mL/min), 50% A, 40% B and 10% C (3-10 min, flow: 1 mL/min) and 80% A and 20% B (10-15 min, flow: 0.8 mL/min). The wavelength of detection was 257 nm. Identification of gallic acid, quercetin and rutin was based on the retention time and online spectral data in comparison with authentic standard. Quantification was performed by establishing calibration curve for gallic acid, quercetin and rutin using standards.

2.7. In vivo antioxidant activity

2.7.1. Yeast strains, media and growth conditions

The relevant genotypes of the *Saccharomyces cerevisiae* strains (Dr E. Gralla, University of California, Los Angeles, CA, USA) used in this work are listed in Table 1. Strains were routinely grown and stored on solid YPD medium (1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone and 2% agar).

Table 1 – *S. cerevisiae* strains used in this study.

Strains	Genotype
EG103 (WT)	MAT α , leu2 Δ 0, his3 Δ 1, trp1-289, ura3-52
EG110 (<i>sod2</i> Δ)	Like EG103 except sod2::TRP1
EG118 (<i>sod1</i> Δ)	Like EG103 except sod1::URA3
EG133 (<i>sod1</i> Δ <i>sod2</i> Δ)	Like EG103 except sod2::TRP1, sod1::URA3

2.7.2. Evaluation of antioxidant activity using yeast cells

YPD-grown yeast cells from the early stationary phase were re-inoculated at an appropriate cell density in fresh YEL medium (1% yeast extract, 2% glucose and 2% peptone) and grown for 18 h at 30 °C. These cells in exponential phase of growth (LOG cells) with 20-30% budding cells (Roehrs et al., 2010), were harvested, washed and re-suspended in sterile Milli-Q water. The ability of the extracts to assist the cell population recover from pro-oxidant (paraquat) insult was assessed according to the method of Amari et al., (2008) with slight modification. Then, 1×10^7 cells were exposed to different concentrations (1, 10 and 20 mg/mL) of the AE, HAE and IE and 1 mM of the paraquat simultaneously in YEL medium. Cells were incubated for 24 h at 30 °C. After, the treatment was appropriately diluted and an aliquot was stained with methylene blue (0.1%) to count the living cells. Growth control was considered as 100%.

2.7.3. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation of the strains treated in 2.6.2 was performed using the method of (Drapur and Hodley, 1990) with some modifications. After 24 h, 40 μL ($0.4 - 4 \times 10^6$ cells) of each treatment was mixed with 100 μL of thiobarbituric acid (TBA) 0.8% (w/v), 100 μL of acetic acid buffer, 40 μL of sodium dodecyl sulphate (SDS) 8.1% (w/v) and 20 μL Milli-Q water. The reaction solution was incubated for 90 min at 95 °C. Samples were centrifuged for 10 min at 2,000 rpm. Next, 200 μL of the supernate were put in 96 well-microtiter plates and absorbance was measured at 532 nm. MDA levels in the treatments were determined through the standard curve of MDA. The results were express as a ratio between MDA levels of treated cells and untreated cells (control) (Dani et al., 2008).

2.8. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate and results are reported as mean \pm S.D. Data were analyzed with one-way ANOVA followed Tukey's Multiple Comparison Test. The statistical significance was determined at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *In vitro* antioxidant activity

The DPPH scavenging activities of different concentrations of AE, HAE and IE are presented in Fig. 1. AE and HAE showed more antioxidant activity than IE from the concentration 10 $\mu\text{g/mL}$. HAE obtained EC_{50} less than the AE, 164.56 and 131. 97 $\mu\text{g/mL}$ respectively. IE has not obtained EC_{50} (Table 2)

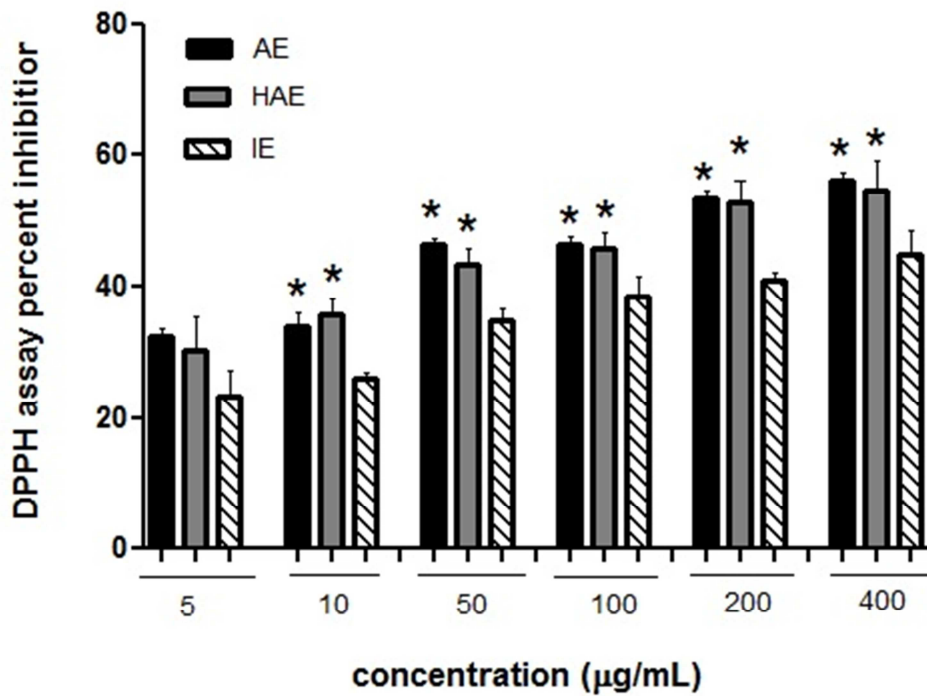


Fig. 1 DPPH radical scavenging capacities of AE, HAE and IE. (*) indicates significant difference ($P < 0,05$) when compared to IE in the same concentration.

Figure 2 shows the reducing power of the AE, HAE and IE as a function of their concentration. Reducing power is one mechanism of action of antioxidants and may serve as a significant indicator of potential antioxidant activity (Jayaprakasha et al., 2000). In this assay, the colour of test solution changes to various shades of green and blue, depending on the reducing power of each extract. The reducing power of the AA, Ru, AE, HAE and IE increased steadily with increasing concentration of the samples and followed the order : AA > Ru > AE > IE > HAE.

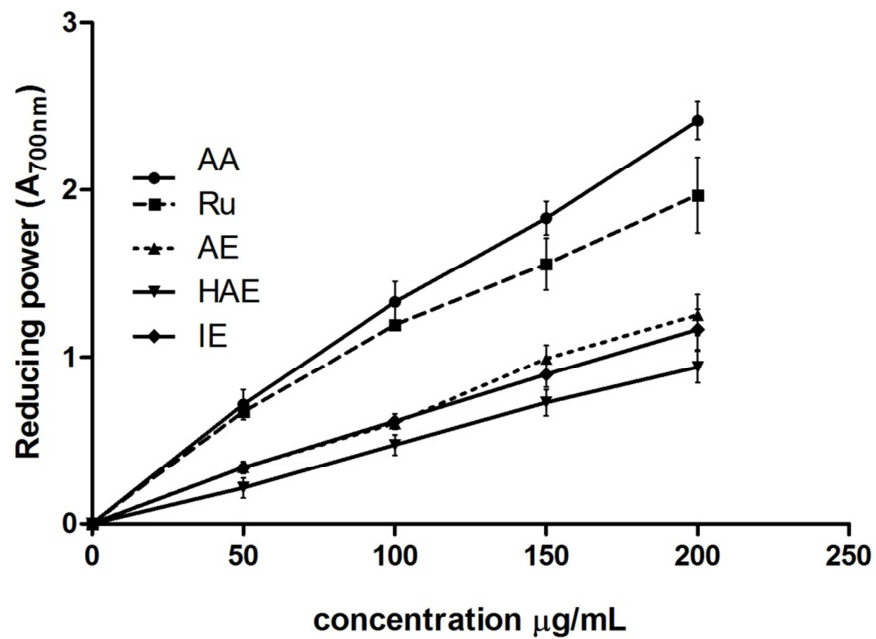


Fig.2 Reducing power of AE, HAE and IE. High absorbance indicates strong antioxidant activity. (AA) ascorbic acid; (Ru) rutin.

EC₅₀ of the extracts (Table 2) was determined by interpolation from linear regression analysis when the absorbance was 0.5 (Soares et al., 2009).

Phosphomolybdenum assay, initially developed by Prieto et al., (1999) for the measurement of antioxidant activity of vitamin E, was used for the evaluation of total antioxidant capacity of the extracts. As shown in Fig. 3 total antioxidant capacities of the extracts were equal to that of rutin at all concentrations tested. Only at a concentration of 400 µg/mL HAE was shown to have lower antioxidant capacity than rutin.

Table 2 – EC₅₀ values (µg/mL) of the three extracts in the DPPH and Fe (III) reducing power assays.

Extract	DPPH EC ₅₀	Reducing power EC ₅₀
Aqueous extract (AE)	131.97 ± 17.28	83.23 ± 7.85
hydroalcoholic extract (HAE)	164.56 ± 35.12	119.13 ± 21.54
Infusion extract (IE)	N.O	92.47 ± 21.89

Values are expressed as mean ± S. D. (n=3). EC₅₀ values: the effective concentration required to inhibit 50% of DPPH and when absorbance was 0.5 for reducing power. EC₅₀ values were obtained by interpolation from linear regression analysis. *Abbreviation:* N.O, not obtained.

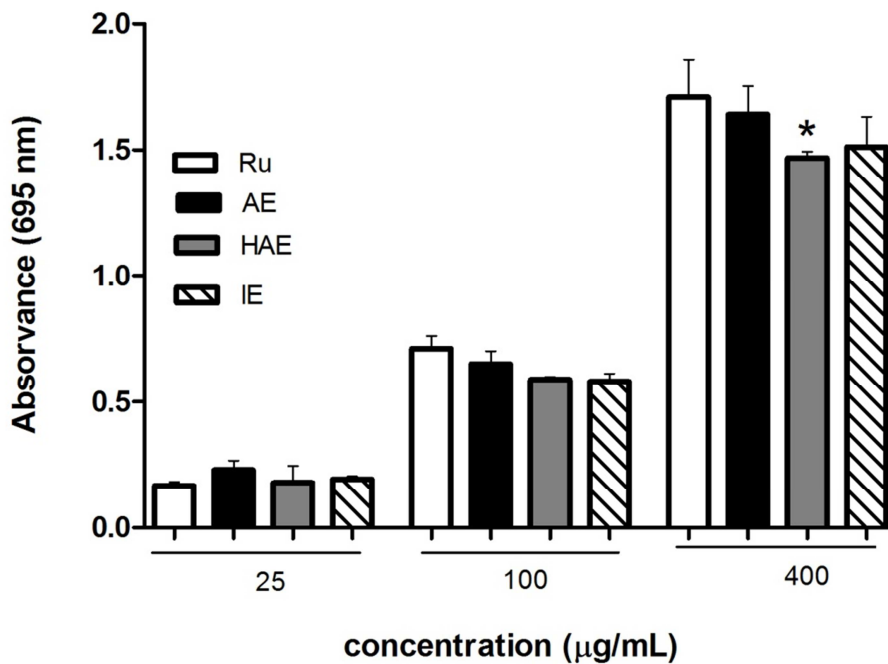


Fig. 3 Total antioxidant capacity of AE, HAE and IE, using phosphomolybdenum method, high absorbance indicates higher antioxidant activity. (*) indicates significant difference ($P < 0,05$) when compared to rutin in the same concentration.

3.2. Total phenolic and flavonoid content

The content of phenolic compounds and flavonoid in the extracts was higher in AE, followed by HAE and IE (Table 3).

Table 3 – Phenolic, flavonoid and gallic acid contents in the extracts of the *Syzygium cumini* (L.) leaves.

Extract	Total phenolic content ($\mu\text{g GAE/mg extract}$)	Total flavonoid content ($\mu\text{g RuE/mg extract}$)	Gallic acid ($\mu\text{g/mg extract}$)
Aqueous extract (AE)	$231 \pm 26.63^{\text{A}}$	30.90 ± 7.80	13.56 ± 0.71
hydroalcoholic extract (HAE)	$221 \pm 14.18^{\text{A}}$	27.31 ± 7.78	N. Q
Infusion extract (IE)	$177 \pm 16.56^{\text{B}}$	19.48 ± 7.35	N. Q

Values are expressed as mean \pm S. D. (n=3). Different letters indicates significant difference ($P < 0,05$). *Abbreviation:* RuE, rutin equivalents; GAE, gallic acid equivalents; N.Q, not quantified.

3.3. HPLC analysis

The HPLC profile of the extracts analysed at 257 nm was shown in fig 4. The extracts possess two peaks with retention time (R_t) of 8.14 min and 9.01 min. These peaks shows two λ_{max} in the region of 240–280 nm and 300–380 nm, thus, suggesting the presence of flavonoids, most probably glycosides of a flavonol (Zakaria et al., 2011). Initially we tried to perform the quantification of rutin, quercetin and gallic acid in the three extracts. However, unlike other studies (Bona et al., 2010; Timbola et al., 2002), we did not find rutin and quercetin in the extracts. Only in the aqueous extract was possible to quantify gallic acid ($R_t = 3.18$ min).

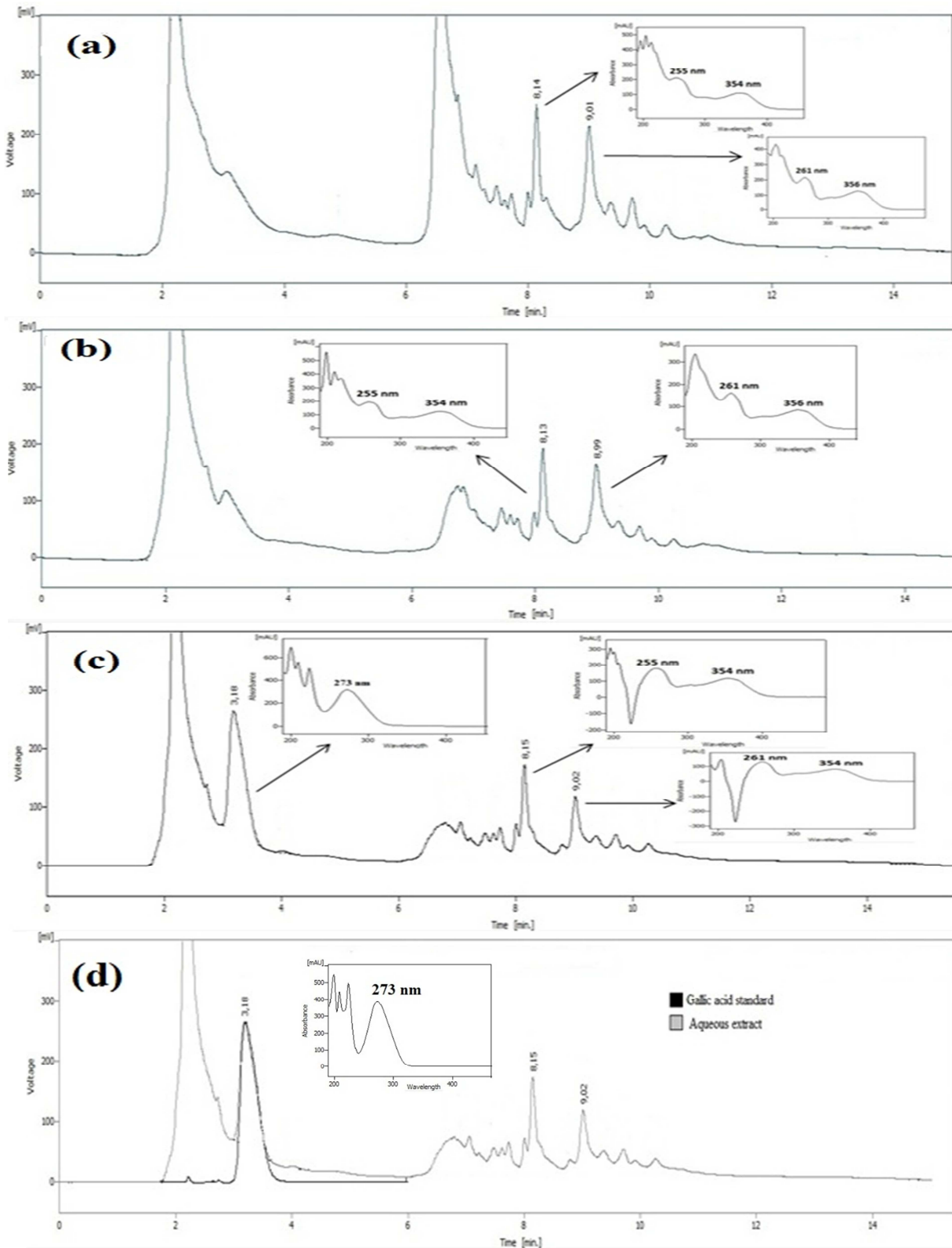


Fig. 4 The HPLC profile the extracts at 257 nm. (a) hydroalcoholic extract (HAE), (b) infusion extract (IE), (c) aqueous extract (AE) and (d) comparison between aqueous extract and gallic acid standard. The UV spectra analysis of peak ($R_t = 8,14$ min) and peak ($R_t = 9,01$ min) of the extracts exhibiting the two λ_{max} at 240–280 nm and 300–380 nm, suggesting the presence of flavonoid glycosides.

3.4. In vivo antioxidant activity

The ability of the extracts to assist in the growth of the strains treated with paraquat is shown in fig 5, 6 and 7. Paraquat inhibited the growth of four strains: *Sod1* Δ strain did not grow, *Sod2* Δ , *sod1* Δ *sod2* Δ and wild-type strains grew 37.35%, 29.98% and 44.12% respectively when treated with paraquat only. The extracts succeeded in recovering the growth of the strains mainly at a concentration of 20 mg/mL.

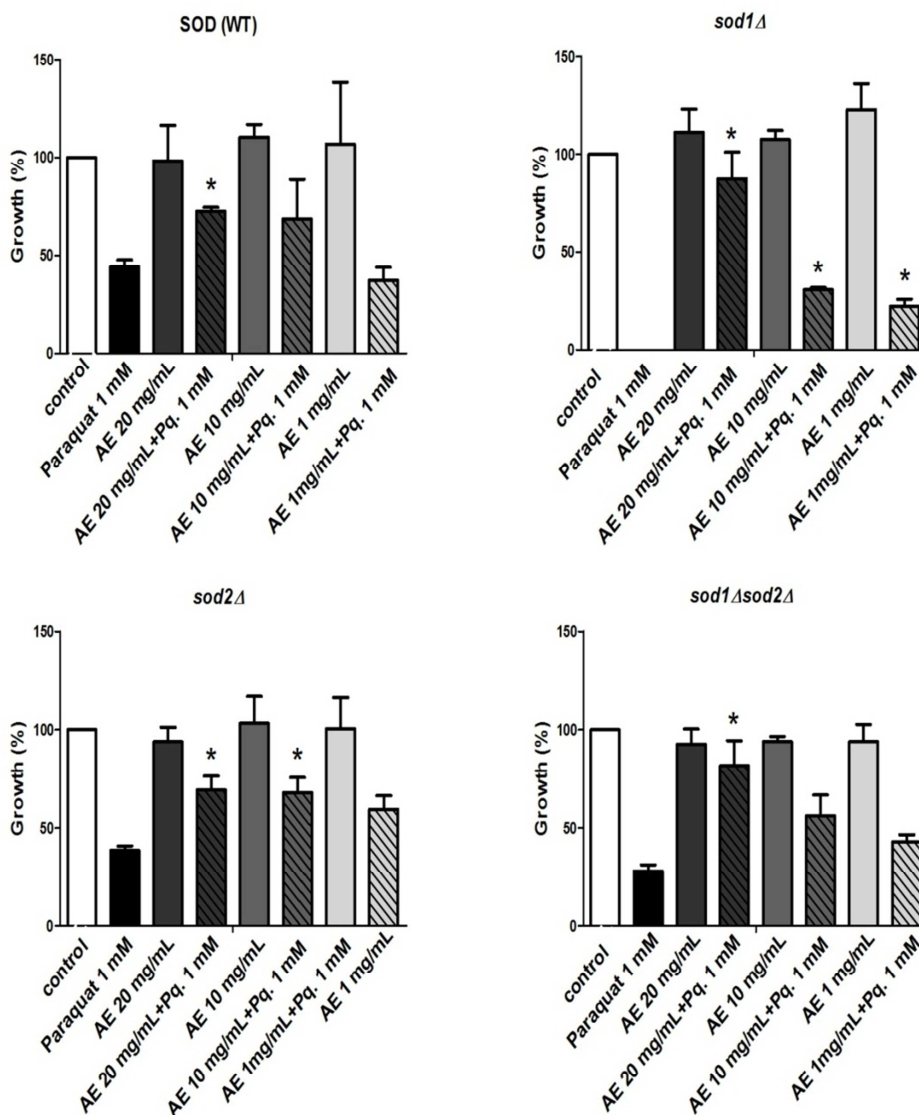


Fig. 5 Growth of the SOD (WT), *sod1* Δ , *sod2* Δ and *sod1* Δ *sod2* Δ strains in the presence of aqueous extract (AE) and paraquat. (*) indicates significant difference (P < 0,05) when compared to the paraquat 1 mM treatment.

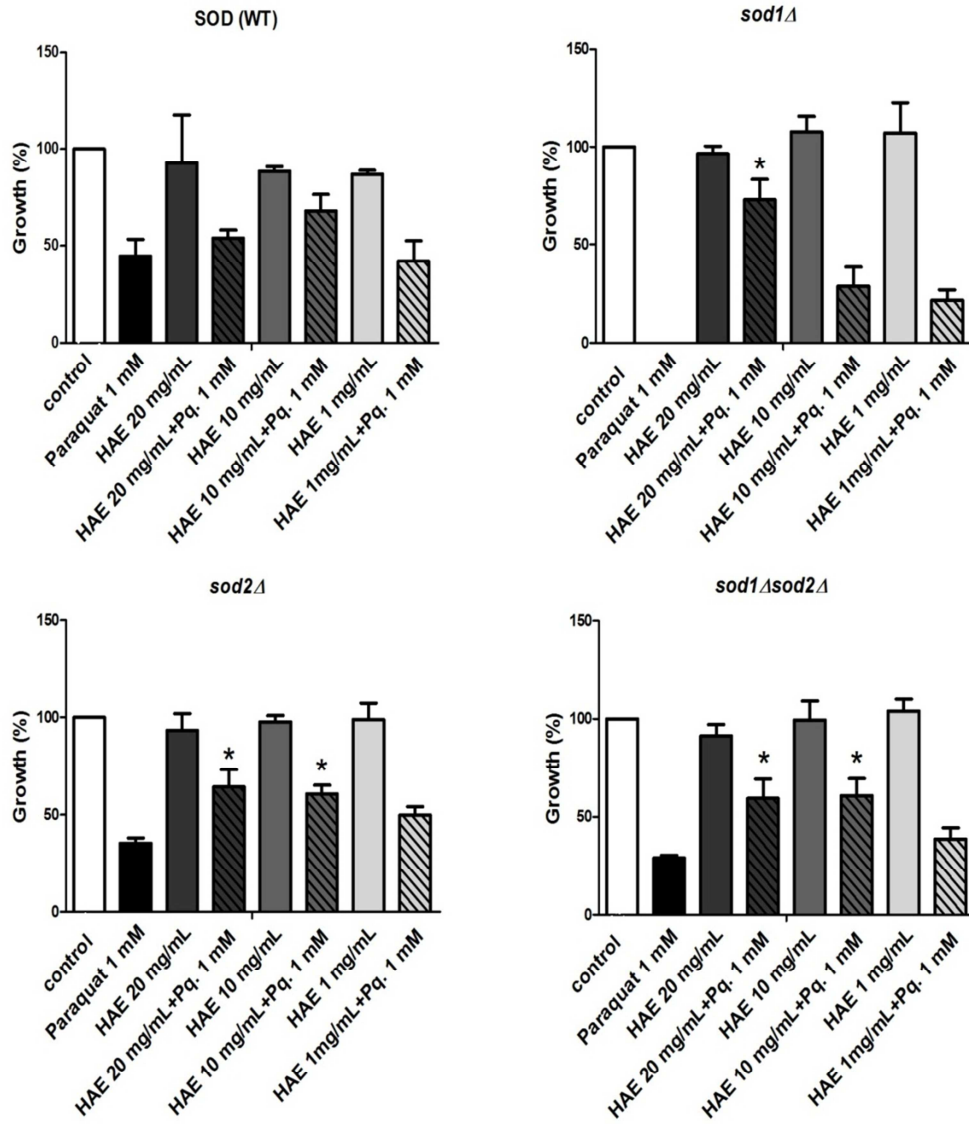


Fig.6 Growth of the SOD (WT), *sod1Δ*, *sod2Δ* and *sod1Δsod2Δ* strains in the presence of hydroalcoholic extract (HAE) and paraquat. (*) indicates significant difference ($P < 0,05$) when compared to the paraquat 1 mM treatment.

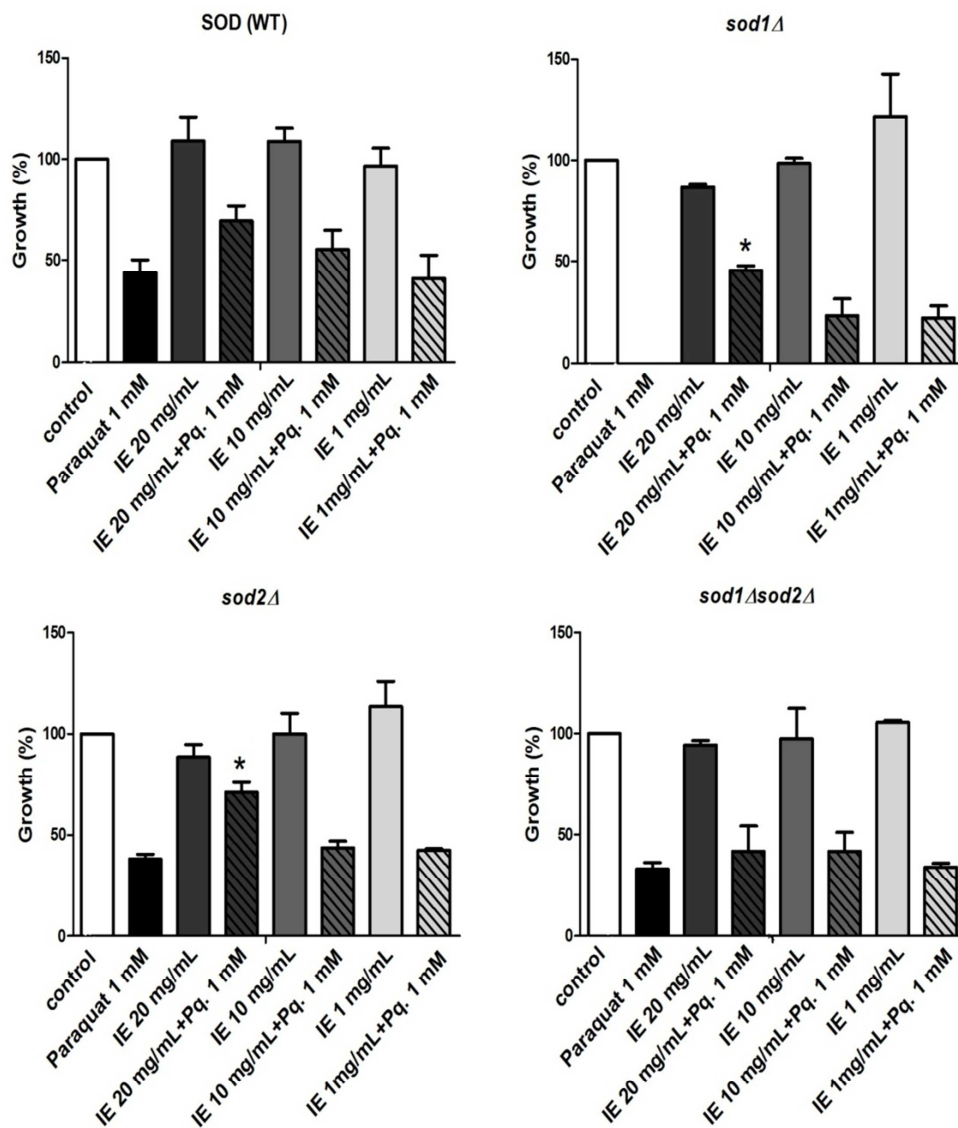


Fig.7 Growth of the SOD (WT), *sod1Δ*, *sod2Δ* and *sod1Δsod2Δ* strains in the presence of infusion extract (IE) and paraquat. (*) indicates significant difference ($P < 0,05$) when compared to the paraquat 1 mM treatment.

3.5. Lipid peroxidation

Paraquat caused increased of MDA levels in the *sod1Δ* and *sod1Δsod2Δ* strains. Treatment with extracts (20 mg/mL) decreased the MDA levels in these strains. In the *sod1Δ* strain, AE, HAE and IE decreased, respectively, in 58.62%, 76.02% and 58.92% the MDA levels compared to the group treated only with paraquat. In the *sod1Δsod2Δ* strain the decreased was 90.82% (AE), 98.89% (HAE) and 58.62% (IE).

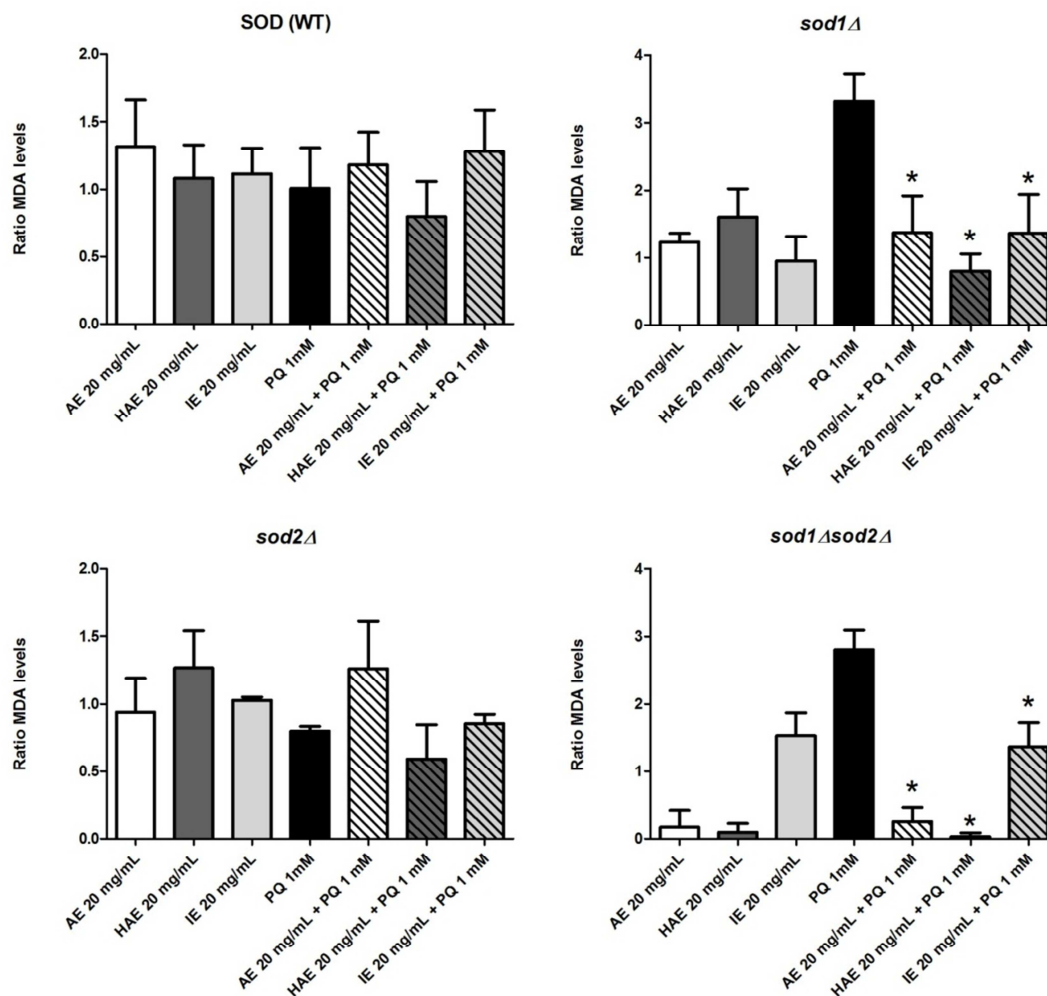


Fig. 8 MDA levels of the SOD (WT), *sod1Δ*, *sod2Δ* and *sod1Δsod2Δ* strains after 24 h treatment with AE, HAE, IE (20 mg/mL) and paraquat 1 mM. The results were express as a ratio between MDA levels of treated cells and untreated cells (control). (*) indicates significant difference ($P < 0,05$) when compared to the paraquat 1 mM treatment.

4. Discussion

Medicinal plants are widely used by the population of developing countries as alternative therapy. Extracts prepared from medicinal plants have received considerable attention owing to their potential health benefits as therapeutic agents, especially for aging and age-related diseases (Marques et al., 2011). *Syzygium cumini* (L.) Skeels has been attributed to possess several medicinal properties in the folk medicine. The leaves of *S. cumini* have been extensively used to treat diabetes, constipation, stomachalgia, fever and dermatopathy. Many of beneficial effects assigned to the leaves of *S. cumini* have a relationship with antioxidant capacity of bioactive compounds present in the leaves. In this work, we evaluated the antioxidant activity of three different extracts prepared from *S. cumini* leaves. First, we used *in vitro* models such as total antioxidant capacity (TAOC), DPPH and Fe (III) reducing power to assess the antioxidant activity of the extracts.

DPPH assay has been used widely to evaluate the radical scavenging ability of antioxidants from different plants due to its advantage of short time and sensibility (He et al., 2010). Generally, antioxidants will react with DPPH, which is a nitrogen-centered radical with a characteristic absorption at 518 nm and converted into 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine, due to its hydrogen donating ability at a very rapid rate (Girennavar et al., 2007). The scavenging effects of extracts increased with increasing concentration up to 400 µg/mL (Fig. 1). AE and HAE showed higher scavenging ability than IE. This may be related to the higher amount of phenolic compounds present in AE and HAE (Table 3). The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents and hydrogen donors. In addition, they have metal-chelating potential (Rice-Evans et al., 1995). Conventional extraction such as heating, boiling or refluxing can be made use of extracting phenolic compounds, however, the disadvantages are the loss of these compounds owing to hydrolysis, oxidation and ionization during extraction as well as the long extraction time (Zhang et al., 2011). Ultrasonic-assisted extraction is one of the important techniques for extracting the valuable compounds from the vegetal materials (Vilkhu et al., 2008). The acoustic cavitation causes disruption of the cell walls, reduction of the particle size and enhancement on contact between solvents and targeted compounds (Rostagno et al., 2003). In the present study, extract prepared in ultrasound extracted more efficiently phenolic compounds from the leaves of *S. cumini* than the extraction by infusion.

Most antioxidants isolated from higher plants are polyphenols (Tawaha et al., 2007).. Phenolic compounds can be classified as simple phenols, with a single aromatic ring bearing

at least one hydroxyl group. Polyphenols have at least two phenol subunits such as flavonoids or three or more phenol subunits called tannins. Flavonoids are the largest group of plants phenols and the most studied. They comprise compounds of low molecular weight that usually occur bound to sugar molecules (King and Young, 1999). They have been proposed to exert beneficial effects in a multitude of disease states, including cancer, cardiovascular disease, and neurodegenerative disorder. Many of the biological actions of flavonoids have been attributed to their antioxidant properties. Flavonoids possess scavenging ability due to their hydroxyl groups (Williams et al., 2004). Thus, the phenolic and flavonoid content can be directly contributing to the antioxidant activity of the extracts. Analyzing the chromatographic profile (Fig. 4) of the extracts was possible to verify the presence of at least two types of flavonoids in each of the extracts. According Zakaria et al, (2011), peaks with two λ_{\max} in the region 240-280 nm and 300-380 nm is characteristic of flavonoid glycosides. It was only possible to quantify gallic acid in AE (Table 3). Pretreatment with gallic acid in isoproterenol-induced myocardial infarction in male Wistar rats significantly increased the levels of GSH, vitamin C and E in plasma and the heart. It shows the antioxidant potential of gallic acid against injury caused by free radicals (Priscilla and Prince, 2009b). The presence of gallic acid in the AE could have contributed to a lower EC_{50} than the HAE (Table 2).

Some studies have suggested that the electron donating capacity (reflecting the reducing power) of bioactive compounds is associated with antioxidant activity (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). To evaluate de electron donation capacity of the extracts we used reducing power and total antioxidant capacity (TAOC) assays. The Fe (III) reducing power assay measures the electron-donating ability of antioxidants using the potassium ferricyanide reduction method. Antioxidants cause the reduction of the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form. Fe^{+2} formed can be measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm (Chung et al., 2002). All the three extracts showed some degree of electron-donation capacity in a concentration-dependent manner, but the capacities were inferior to that of ascorbic acid and rutin (Fig. 2). Ascorbic acid was used as reference because it is already known as a strong reducing agent. Rutin is one of the major flavonoids found in a variety of plants and also used as reference. In the total antioxidant assay, molybdenum (Mo) (VI) of ammonium molybdate gets converted into Mo (V) by reducing species of the extract and forms a green colored complex with phosphate ion present in the reaction mixture. The color intensity this complex corresponds to the amount of complex formed (Chouhan and Singh, 2011). AE, HAE and IE showed absorbances similar to the rutin at all concentrations tested (except HAE in 400

$\mu\text{g/mL}$). In other study (Yanga et al., 2008), rutin obtained similar reductive capacity to BHT (synthetic antioxidant). *In vitro* results demonstrated that the extracts possess both hydrogen donation ability as electron-donation capacity, thus they may act as radical chain terminators, transforming reactive free radical species into more stable non-reactive products (Dorman et al., 2003).

Several *in vitro* studies are conducted to evaluate the antioxidant activity of extracts from different plant species. However, the effect observed *in vitro* may not be the same in an *in vivo* model (Tang et al., 2004). For this reason, we evaluate the antioxidant activity of AE, HAE and IE using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as *in vivo* model. The single-cell eukaryote *S. cerevisiae* is a useful model to screen *in vivo* for natural antioxidants: Its entire genome sequence has been elucidated, and it is a genetically tractable organism (Dani et al., 2008). *S. cerevisiae* has similar antioxidant responses to mammals, and 30% of known genes involved in human disease have yeast orthologues, that is, functional homologues (Mager and Winderickx, 2005). Strains harboring defects in the antioxidant machinery can be used to emulate the altered intracellular redox environments, frequently encountered in human pathologic conditions (Amari et al., 2008). Like most other eukaryotes, *S. cerevisiae* contains CuZn superoxide dismutase (the product of the SOD1 gene) in the cytosol, nucleus, and lysosomes and Mn superoxide dismutase (the product of the SOD2 gene) in the mitochondrial matrix (Gralla and Kosman, 1992). In this work, we used *S. cerevisiae* mutants deficient in superoxide dismutase (SOD) genes (*sod1 Δ* , *sod2 Δ* and *sod1 Δ sod2 Δ*) and also the wild-type strain (Table 1). Strains were treated in exponential phase (namely LOG) because in this phase, yeast cells are more sensitive to oxidative stress than stationary phase (Gralla and Kosman, 1992). As expected, the mutant *S. cerevisiae* strains deficient in SOD enzymes were more sensitive to paraquat than the wild-type strain. Paraquat, a redox cycling bipyridyl herbicide, undergoes a one-electron reduction by the NADPH, which results in the generation of the paraquat radical. In the presence of oxygen, the paraquat radical rapidly auto-oxidizes to produce a superoxide anion radical and regenerates the paraquat di-cation. So, in the presence of a sufficient supply of reducing equivalents, repeated cycles of herbicide reduction and re-oxidation can occur, producing large amounts of reactive oxygen species (Melchiorri et al., 1996). The aqueous superoxide anion radical itself not attack lipid or DNA due to its relatively low reactivity. Many of the damaging effects of superoxide anion radical appear to be due to the superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals, which are much more reactive, causing indiscriminate damage

to biological systems (Richmond and Halliwell, 1982). In this study, *S. cerevisiae* strains deficient in CuZnSOD, like the *sod1Δ* and *sod1Δsod2Δ* strains, showed to be more sensitive to paraquat. In fact, CuZn superoxide dismutase is extremely important for defense against the reactive oxygen species generated by paraquat. The *sod1Δ* strain did not grow when treated with paraquat only (Fig. 5). However, concomitant treatment with extracts allowed the growth of strain. The lack of the CuZnSOD was overcome by presence of the extracts, which possibly acted as antioxidants, scavenging of the radical superoxide generated by paraquat or inhibiting the redox cyclic action of this compounds. That antioxidant activity can be especially attributed to the presence of flavonoids and other phenolic compounds in the extracts. In addition of the antioxidant activity, phenolic compounds like flavonoids also may exert modulatory action in cells through actions at protein kinase and lipid kinase signalling pathways. Inhibitory or stimulatory actions at these pathways can exert an indirect protection against oxidative stress (Williams et al., 2004). The extracts were able to recover the growth of the *sod1Δ* strain treated with paraquat especially at the highest concentration tested (20 mg/mL). AE and HAE obtained a greater capacity to recover the growth of strain than the IE, possibly due to higher amount of phenolic compounds in these extracts (Table 3). Moreover, AE and HAE also possess higher ability to hydrogen donation than IE (Fig. 1), which can contribute directly to a higher antioxidant activity of these extracts.

The *sod1Δsod2Δ* strain for not having CuZnSOD, theoretically should have the same sensitivity than the *sod1Δ* strain against to paraquat. Meanwhile, the *sod1Δsod2Δ* strain showed to be more resistant to paraquat than *sod1Δ* strain (Fig. 5). This could be associated with super expression of other antioxidant systems as a form of compensation (Dani et al., 2008). Several other studies have shown that a deficiency in one antioxidant system is overcome by an increase in the remaining defense system (Dani et al., 2008; Fernandes et al., 2007; França et al., 2005). AE was able to protect *sod1Δsod2Δ* strain against oxidative stress induced by paraquat at 20 mg/mL while HAE protect the strain from the concentration 10 mg/mL. IE did not show protective effect.

As shown in Fig. 5, the wild-type and *sod2Δ* strains had similar growth when treated with paraquat. This shows that the MnSOD play little role in countering the toxicity of superoxide anions generated by paraquat. In fact, the physiological role of MnSOD appears to protect mitochondria from the superoxide generated during respiration (Jamieson, 1998). However, the *sod2Δ* strain despite having the CuZnSOD is not able by itself to combat the toxicity of paraquat. The AE and HAE showed a protective effect of this strain from the concentration 10

mg/mL and IE in 20 mg/mL (Fig. 5 and 6). In the wild-type strain only the AE at 20 mg/mL was able to recovery the growth this strain. These results demonstrate that the extracts act as antioxidants independent of the presence of SOD enzymes.

Lipid peroxidation is one of biochemical events related to the toxicity of paraquat. One of the targets of free radical attack is the membrane, leading to lipid peroxidation, cell leakage, and death (Dani et al., 2008). It is well known that iron ions produce hydroxyl radicals by the Fenton reaction ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) which is responsible for lipid peroxidation. Physiologically, free iron exists predominantly in the ferric (Fe^{+3}) state, and the foregoing reaction does not proceed at a toxicologically significant rate. However, it has been suggested that the presence of paraquat radical ($\text{PQ}^{+\bullet}$) may facilitate the reduction of ferric (Fe^{+3}) to ferrous (Fe^{+2}) ions, thereby significantly enhancing the rate of hydroxyl radical generation as long as significant H_2O_2 is available (Van Asbeck et al., 1989). Malondialdehyde (MDA) is an end product of lipid peroxidation and is used to measure lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (Garcia et al., 2005). Paraquat increased the MDA levels mainly in *sod1Δ* and *sod1Δsod2Δ* strains (Fig. 8). These results explain the lowest growth of the two strains when treated only with paraquat. The extracts decreased the MDA levels possibly by inhibiting the action of paraquat to generate hydroxyl radicals or scavenger this radical. Polyphenols are preferentially incorporated into membrane lipid bilayers and act as hydrogen donors, trapping free radicals and inhibiting the formation of lipid radicals (Soobrattee et al., 2005). This may be related to the recovery of growth of the strains caused by extracts.

5. Conclusion

The current study showed that *Syzygium cumini* leaves extracts possesses antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. Extracts prepared in ultrasound obtained better results than the extract prepared by infusion possibly because the higher amount of phenolic compounds and flavonoids in these extracts. Aqueous extract (AE) and hydroalcoholic extract (HAE) can be tested in experimental models of diseases where oxidative stress is involved as in diabetes. These findings provide scientific support for the traditional use of *Syzygium cumini* (L.) Skeels as a medicinal plant in many diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. João Antônio Pegas Henriques (University of Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil) for kindly providing yeast strains. This work was supported by the Brazilian Funding Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Aliaga, K.J., Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., 2011. Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP_{swe} cells. *Life Sciences* 89, 939-945.
- Amari, F., Fettouche, A., Samra, M.A., Kefalas, P., Kampranis, S.C., Makris, A.M., 2008. Antioxidant small molecules confer variable protection against oxidative damage in yeast mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11740-11751.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry* 102, 1233-1240.
- Bona, K.S.D., Bellé, L.P., Sari, M.H., Thomé, G., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Boligon, A., Athayde, M.L., Pigatto, A.S., Moretto, M.B., 2010. Syzygium cumini Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. *Cellular Physiology Cellular Physiology Cellular Physiology Cellular Physiology and Biochemistry* 26, 729-738.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161-1168.
- Chouhan, H.S., Singh, S.K., 2011. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *Journal Ethnopharmacology* 137, 1337– 1344.
- Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., Chou, S.-T., 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2454-2458.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregón, S., 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology* 320, 1-11.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Murthy, M.R.V., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28, 771-799.
- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M.D., Henriques, J.A.P., Eleutherio, E., 2008. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4268-4272.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R., 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4563–4569.

- Drapur, H.H., Hodley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421-431.
- Fernandes, P.N., Mannarino, S.C., Silva, C.G., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report* 12, 236-244.
- França, M.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2005. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress & Chaperones* 10, 167-170.
- Garcia, Y.J., Rodríguez-Malaver, A.J., Peñaloza, N., 2005. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods* 144, 127-135.
- Girenavar, B., Jayaprakasha, G.K., Jadegoud, Y., Gowdab, G.A.N., Patil, B.S., 2007. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergapton and geranyl coumarin from grapefruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 3684-3691.
- Gralla, E.B., Kosman, D.J., 1992. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Advances in Genetics* 30, 251-319.
- Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M.H., Bilsel, M., Goren, A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2227-2238.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition ed. Clarendon, Oxford.
- He, C., Ji, X., Pan, Y., Wang, H., Wang, K., Liang, M., Yang, L., 2010. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Medicinal Chemistry Research* 19, 448-461.
- Jagetia, G.C., Baliga, M.S., 2002. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicology Letters* 132, 19-25.
- Jamieson, D.J., 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Sikder, S., Mohanrao, L.J., Sakariah, K.K., 2000. Antibacterial activity of Citrus reticulate peel extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C—A Journal of Biosciences* 55, 1030-1034.
- Kaneira, M., Chanda, S., 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of *Syzygium cumini* leaves extracted sequentially in different solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 1-9.
- Karthikesan, K., Pari, L., Menon, V.P., 2010. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *Journal of Functional Food* 2, 134-142.
- King, A., Young, G., 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99, 213-218.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Technology* 4, 217-233.
- Lima, L.A., Siani, A. C., Brito, F. A., Sampaio, A. L. F., Henriques, M. G. M.O., Riehl, C. A. 2007. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). *Química Nova* 30, 860-864.
- Mager, W.H., Winderickx, J., 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 26, 265-273.

- Marques, F., Azevedo, F., Johansson, B., Oliveira, R., 2011. Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by *Ginkgo biloba* leaf extract. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1361-1366.
- Melchiorri, D., Reiter, R.J., Sewerynek, E., Hara, M., Chen, L., Nistico, G., 1996. Paraquat toxicity and oxidative damage: reduction by melatonin. *Biochemical Pharmacology* 51, 1095-1099.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.
- Priscilla, D.H., Prince, P.S.M., 2009. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 179, 118-124.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375-382.
- Richmond, R., Halliwell, B., 1982. Formation of hydroxyl radicals from the paraquat radical cation, demonstrated by a highly specific gas chromatographic technique. The role of superoxide radical anion, hydrogen peroxide, and glutathione reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 17, 95-107.
- Roehrs, R., Freitas, D.R.J., Masuda, A., Henriques, J.A.P., Guecheva, T.N., Ramos, A.L.L.P., Saffi, J., 2010. Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains. *Archives of Microbiology* 192, 221-228.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* 1012, 119-128.
- Ruan, Z.P., Zhang, L.L., Lin, Y.M., 2008. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* leaves. *Molecules* 13, 2545-2556.
- Shafi, P.M., Rosamma, M.K., Kaiser Jamil, P.S., Reddy, 2002. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils *Fitoterapia* 73, 414-416.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28, 49-55.
- Soares, A.A., Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S., M. G., Peralta, R.M., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei Murri*) in two stages of maturity. *Food Chemistry* 112, 775-781.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200-213.
- Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 1279-1286.
- Tang, S.Y., Whiteman, M., Jenner, A., Peng, Z.F., Halliwell, B., 2004. Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of *Cratogeomys cochinchinense* (YCT) in Jurkat T cells: the role of reactive oxygen species and calcium. *Free Radical Biology & Medicine* 36, 1588-1611.
- Tawaha, K., Alali, F.Q.A., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* 104, 1372-1378.

- Teixeira, C.C., Fuchs, F.D., 2006. The efficacy of herbal medicines in clinical models: The case of jambolan. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 16-19.
- Timbola, A.K., Szpoganicz, B., Branco, A., Monache, F.D., Pizzolatti, M.G., 2002. A new flavonoid from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia* 73, 174-176.
- Van Asbeck, S.W., Hillen, F.C., Boonen, H.C., de Jung, Y., Dormans, J.A., Vander Wal, N.A., Marx, J.J., Sangster, B., 1989. Continuous intravenous infusion of desferrioxamine reduces mortality by paraquat in vitamin E-deficient rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 139, 769-773.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 161-169.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: Antioxidant or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 36, 838-849.
- Yanga, J., Guoa, J., Yuan, J., 2008. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT* 41, 1060-1066.
- Zakaria, Z.A., Abdul Hisam, E.E., Rofiee, M.S., Norhafizahc, M., Somchit, M.N., Teh, L.K., Salleh, M.Z., 2011. *In vivo* antiulcer activity of the aqueous extract of *Bauhinia purpurea* leaf. *Journal Ethnopharmacology* 137 1047-1054.
- Zhang, G., He, L., Hu, M., 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 18-25.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels possuem atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Os extratos mostraram ter a habilidade de doação de elétrons e doação de hidrogênio nos ensaios *in vitro*.

Nos ensaios *in vivo*, os três extratos conseguiram auxiliar o crescimento das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mesmo na presença de paraquat. Esse auxílio pode estar relacionado com a atividade antioxidante dos extratos. Através da análise dos resultados foi possível verificar que a atividade antioxidante dos extratos é independente da presença das enzimas superóxido dismutases. O mecanismo de ação dos extratos é desconhecido, entretanto, a habilidade de doação de elétrons e de hidrogênio podem ter ajudado na captura do radical paraquat e do radical ânion superóxido gerados pelo paraquat. O paraquat também parece gerar o radical hidroxil, uma vez que ele aumentou a peroxidação lipídica das linhagens mais sensíveis (linhagens *sod1Δ* e *sod1Δsod2Δ*). Os três extratos diminuíram a peroxidação lipídica nas linhagens mais sensíveis, possivelmente através da captura do radical hidroxil ou evitando a formação do mesmo.

Nos ensaios de DPPH e crescimento das linhagens, os extratos preparados no ultrassom obtiveram resultados melhores do que o extrato preparado por infusão. Isto pode estar relacionado com a maior quantidade de compostos fenólicos presentes nestes extratos. A técnica de extração por ultrassom através da cavitação acústica causa a ruptura da parede celular das folhas, reduzindo o tamanho de partícula e aumentando o contato entre o solvente de extração e os compostos presentes nas folhas. Desta forma, há uma melhor condição de extração de compostos fenólicos do que a técnica por infusão.

Muitos estudos já demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo na manifestação de diversas doenças. A atividade antioxidante das folhas de *Syzygium cumini* (L.) pode de certa forma, explicar o seu amplo uso na medicinal popular. Uma proposta representativa dos resultados está representada na Figura 12.

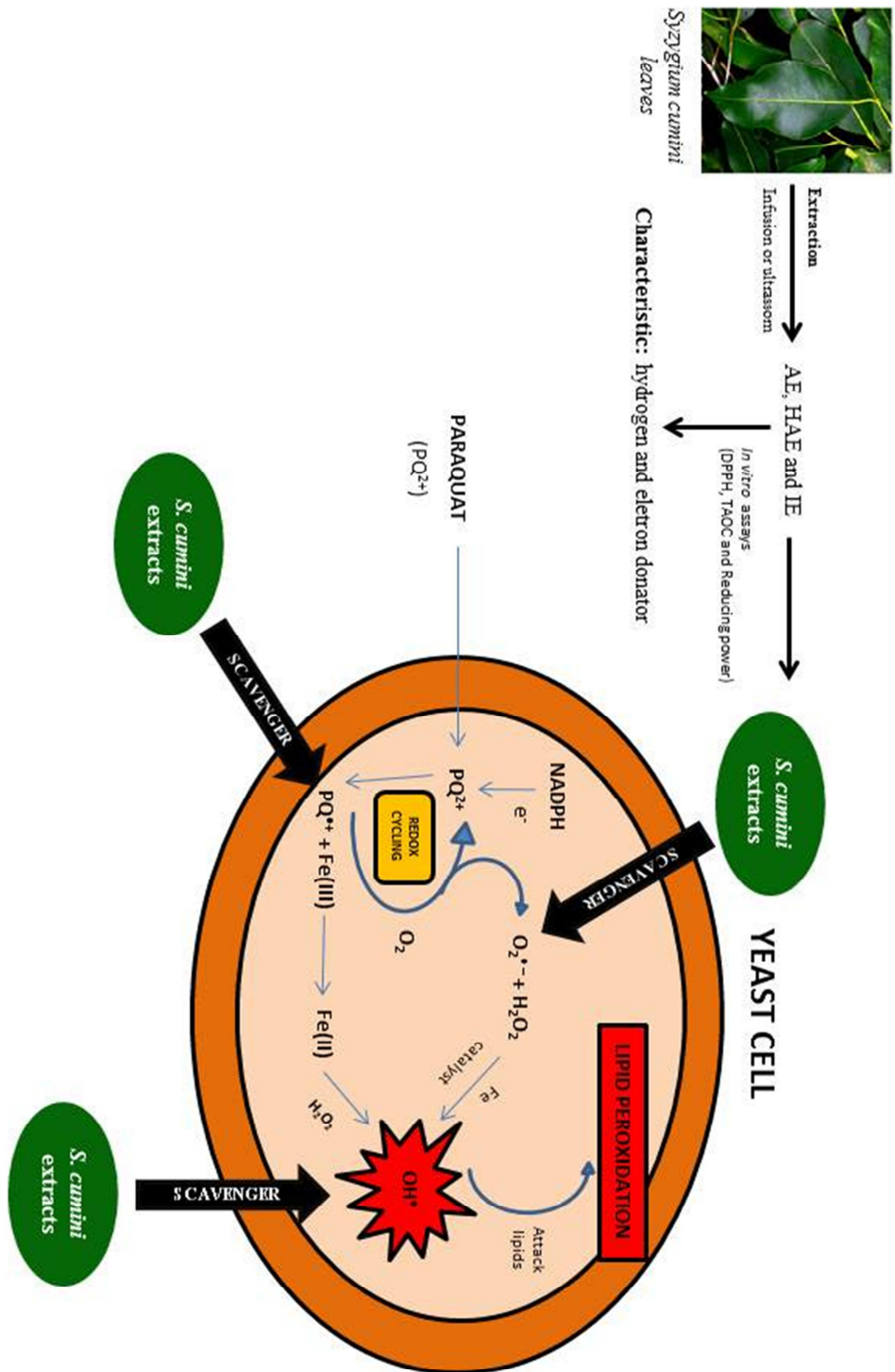


Figura 12. Esquema representativo dos resultados obtidos nesse trabalho.

6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Otimizar o processo de extração com ultrassom visando a extração de um maior conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides.
- Realizar o fracionamento e análise em equipamentos mais específicos (ex: LC-MS) dos três extratos para uma melhor caracterização dos componentes principais.
- Avaliar os efeitos dos extratos em linhagens de leveduras deficientes em: mecanismo de reparo de DNA, catalase, glutathione peroxidase e no fator de transcrição Yap1.
- Avaliar os efeitos dos extratos preparados no ultrassom em modelos experimentais de doenças onde há um envolvimento do estresse oxidativo como, por exemplo, o diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, F.H., Bellé, L.P., Bitencourt, P.E.R., De Bona, K.S., Zanette, R.A., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Pigatto, A.S., Moretto, M.B., 2011. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. *Biometals* 24, 349-356.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. 196, 67-76.
- Aliaga, K.J., Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., 2011. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells. *Life Sciences* 89, 939-945.
- Amari, F., Fettouche, A., Samra, M.A., Kefalas, P., Kampranis, S.C., Makris, A.M., 2008. Antioxidant small molecules confer variable protection against oxidative damage in yeast mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11740-11751.
- Ambrósio, C.L.B., Campos, F.A.C.S., Faro, Z.P., 2006. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição* 19, 233-243.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry* 102, 1233-1240.
- Arun, R., Prakash, M.V.D., Abraham, S.K., Premkumar, K., 2011. Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of *in vivo* genomic damage and oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 329-333.
- Ayyanar, M., Subash-Babu, P., 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1, 240-246.
- Baliga, M.S., Bhat, H.P., Baliga, B.R.V., Wilson, R., Palatty, P.L., 2011. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. *Food Research International* 44, 1776-1789.
- Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B., 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry* 90, 727-733.
- Bekris, L.M., Mata, I.F., Zabetian, C.P., 2010. The genetics of Parkinson disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23, 228-242.
- Bona, K.S.D., Bellé, L.P., Sari, M.H., Thomé, G., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Boligon, A., Athayde, M.L., Pigatto, A.S., Moretto, M.B., 2010. *Syzygium cumini* Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. *Cellular Physiology Cellular Physiology Cellular Physiology Cellular Physiology Cellular Physiology and Biochemistry* 26, 729-738.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839-851.

- Brennan, R.J., Schiestl, R.H., 1998. Free radicals generated in yeast by the Salmonella test-negative carcinogens benzene, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research* 403, 65-73.
- Chaudhuri, A.K.N., Gomes, S.P.A., Bhattacharya, S., 1990. Anti-inflammatory and related actions of *Syzygium cumini* seed extract. *Phytotherapy Research* 4, 5-10.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161-1168.
- Chouhan, H.S., Singh, S.K., 2011. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *Journal Ethnopharmacology* 137, 1337– 1344.
- Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., Chou, S.-T., 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2454-2458.
- Clavin, M., Gorzalczy, S., Macho, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V., 2007. Antiinflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 585-589.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17, 1195-1214.
- Costa, V., Moradas-Ferreira, P., 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 217-246.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregón, S., 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology* 320, 1-11.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Murthy, M.R.V., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28, 771-799.
- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M.D., Henriques, J.A.P., Eleutherio, E., 2008. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4268-4272.
- de Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A., 2000. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54, 21-23.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R., 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4563–4569.

- Drapur, H.H., Hodley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421-431.
- Dröge, W., 2002 Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- eixeira, C.C., Rava, C.A., Mallman da Silva, P., Melchior, R., Argenta, R., Anselmi, F., Almeida, C.R., Fuchs, F.D., 2000. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *Journal Ethnopharmacology* 71, 341-347.
- ElSohly, H.N., Danner, S., Li, X.-C., Nimrod, A.C., Clark, A.M., 1999. New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. *Journal of Natural Products* 62, 1341-1342.
- Fakim, A.G., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- Faria, A.F., Marques, M.C., Mercadante, A.Z., 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry* 126, 1571-1578.
- Fernandes, P.N., Mannarino, S.C., Silva, C.G., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report* 12, 236-244.
- França, M.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2005. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress & Chaperones* 10, 167-170.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology* 201, 1203-1209.
- Fuge, E.K., Werner, M., 1997. Yeast Stress response in: Hohmann & Mayer, W.H. (Ed.). Springer - Verlag, Heidelberg.
- Gancedo, J.M., 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 334-361.
- Garcia, Y.J., Rodríguez-Malaver, A.J., Peñaloza, N., 2005. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods* 144, 127-135.
- Gichner, T., Pospíšil, F., Velemínský, J., Volkeová, V., Volke, J., 1987. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiologica (Praha)* 32, 55-62.
- Girenavar, B., Jayaprakasha, G.K., Jadegoud, Y., Gowdab, G.A.N., Patil, B.S., 2007. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranyl coumarin from grapefruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 3684-3691.
- Gralla, E.B., Kosman, D.J., 1992. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Advances in Genetics* 30, 251-319.

- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H., Dawes, I.W., 1996. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology* 21, 171-179.
- Guidot, D.M., McCord, J.M., Wright, R.M., Repine, J.E., 1993. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 268, 26699-26703.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91, 14-22.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141, 312-322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition ed. Clarendon, Oxford.
- He, C., Ji, X., Pan, Y., Wang, H., Wang, K., Liang, M., Yang, L., 2010. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Medicinal Chemistry Research* 19, 448-461.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G., Cabisco, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1217-1235.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M.E., Hudemann, C., Lillig, C.H., 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions* 33, 1375-1377.
- Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P., 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26, 2489-2491.
- Ibrahim, B., Sowemimo, A., Van Rooyen, A., Van de Venter, M., 2012. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 141, 282-289.
- Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B.Y., Chen, Y., 1995. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18, 1523-1530.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., Kimura, A., 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 27002-27009.
- Jagetia, G.C., Baliga, M.S., 2002. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicology Letters* 132, 19-25.
- Jamieson, D.J., 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Jamieson, D.J., Rivers, S.L., Stephen, D.W.S., 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 140, 3277-3283.

- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Sikder, S., Mohanrao, L.J., Sakariah, K.K., 2000. Antibacterial activity of Citrus reticulate peel extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C—A Journal of Biosciences* 55, 1030–1034.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 53, 26-38.
- Jones, G.M., Stalker, J., Humphray, S., West, A., Cox, T., Rogers, J., Dunham, I., Prelich, G., 2008. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Methods* In press.
- Just, M.J., Recio, M.C., Giner, R.M., Cuéllar, M.J., Mañez, S., Bilia, A.R., Rios, J.R., 1998. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Medica* 64, 404-407.
- Kaneira, M., Chanda, S., 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of *Syzygium cumini* leaves extracted sequentially in different solvents *Journal of Food Biochemistry*, 1-9.
- Karthikesan, K., Pari, L., Menon, V.P., 2010. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *Journal of Funcional Food* 2, 134-142.
- Katiki, L.M., Ferreira, J.F., Gonzalez, J.M., Zajac, A.M., Lindsay, D.S., Chagas, A.C., Amarante, A.F., 2012. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. *Veterinary Parasitology* Article in press.
- Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3713-3717.
- Kim M. K., Ahn, S.H., Lee-Kim, Y.C., 2001. Relationship of serum α -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. *Nutrition Research* 21, 797-809.
- Kim, S.H., Hyun, S.H., Choung, S.Y., 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal Ethnopharmacology* 104, 119–123.
- King, A., Young, G., 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99, 213-218.
- Kliebenstein, D.J., 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell and Environment* 27, 675-684.
- Kregel, K.C., Zhang, H.J., 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292, R18-36.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing* 89, 217-233.
- Kroes, B.H., Van den Berg, A.J., Quarles van Ufford, H.C., Van Dijk H., Labadie, R.P., 1992. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica* 58, 499-504.

- Kuppusamy, P., Zweier, J.L., 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 9880-9884.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2006. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 611-625.
- Lee, J.H., Choi, I.Y., Kil, I.S., Kim, S.Y., Yang, E.S., Park, J.W., 2001. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526, 191-198.
- Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* 36, 1495-1502.
- Li, L., Adams, L.S., Chen, S., Killian, C., Ahmed, A., Seeram, N.P., 2009. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(3), 826-831.
- Lima, L.A., Siani, A. C., Brito, F. A., Sampaio, A. L. F., Henriques, M. G. M.O., Riehl, C. A. S., Siani, A.C., Brito, F.A., Sampaio, A.L.F., Henriques, M.G.M.O., Riehl, C.A.S., 2007. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). *Química Nova* 30, 860-864.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo.
- Lu, S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal* 13, 1169-1183.
- Mager, W.H., Winderickx, J., 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 26, 265-273.
- Mahmoud, H., Marzouk, M.S., Moharram, F.A., El-Gindi, M.R., Hassan, A.M., 2001. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 58, 1239-1244.
- Maia, C.N., 2008. Análise fitoquímica e atividade antibacteriana "in vitro" de extrato de plantas do Cerrado, Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros/MG.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17, 24-38.
- Marques, F., Azevedo, F., Johansson, B., Oliveira, R., 2011. Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by *Ginkgo biloba* leaf extract. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1361-1366.
- Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants *Biology and Medicine* 3, 232-249.

- Mehdi, K., Penninckx, M.J., 1997. An important role for glutathione and glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. . Microbiology, 1885-1889.
- Melchiorri, D., Reiter, R.J., Sewerynek, E., Hara, M., Chen, L., Nistico, G., 1996. Paraquat toxicity and oxidative damage: reduction by melatonin. . Biochemical Pharmacology 51, 1095-1099.
- Migliato, K.F., Baby, A.R., Zague, V., Velasco, M.V.R., Corrêa, M.A., Sacramento, L.V.S., Salgado, H.R.N., 2006. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Acta Farmaceutica Bonaerense 25, 310-314.
- Muruganandan, S., Srinivasan, K., Chandra, S., Tandan, S.K., Lal, J., Raviprakash, V., 2001. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. Fitoterapia 72, 369-375.
- Nagegowda, D.A., 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. FEBS Letters 584, 2965-2973.
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology & Medicine 31, 1287-1312.
- Ohtake, Y., Satou, A., Yabuuchi, S., 1990. Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. Agricultural and biological chemistry 54, 3145-3150.
- Pelletier, S.W., 1988. Alkaloids chemical and biological perspectives, New York.
- Pelzer, L.E., Guardia, T., Juarez, A.O., Guerreiro, E., 1998. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plants flavonoids. II Farmaco 53, 421-424.
- Peña-Castillo, L., Hughes, T.R., 2007. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? Genetics 176, 7-14.
- Pennathur, S., Heinecke, J.W., 2007. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. Antioxidants & Redox Signaling 9, 955-969.
- Pepato, M.T., Folgado, V.B.B., Kettelhut, I.C., Brunetti, I.L., 2001. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 34, 389-395.
- Peres, L.E.P., 2004. Metabolismo Secundário., Piracicaba - São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz., pp. 1-10.
- Perfeito, R., Cunha-Oliveira, T., Rego, A.C., 2012. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease--resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. Free Radical Biology and Medicine 53, 1791-1806.
- Pringle, J.R., Hartwell, L.H., 1982. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, life cycle and inheritance., Cold Spring Harbor, New York.
- Priscilla, D.H., Prince, P.S., 2009a. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in

- experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chemico-biological interactions* 179.
- Priscilla, D.H., Prince, P.S.M., 2009b. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 179, 118-124.
- Quirós, A.R.-B., Costa, H.S., 2006. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 97-111.
- Rao, V.R.S., Suresh, G., Babu, K.S., Raju, S.S., Vishnu Vardhan, M.V.P.S., Ramakrishna, S., Rao, J.M., 2011. Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. *Tetrahedron* 67, 1885-1892.
- Ravi, K., Ramachandran, B., Subramanian, S., 2004. Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Science* 75 2717-2731.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24, 981-990.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375-382.
- Richmond, R., Halliwell, B., 1982. Formation of hydroxyl radicals from the paraquat radical cation, demonstrated by a highly specific gas chromatographic technique. The role of superoxide radical anion, hydrogen peroxide, and glutathione reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 17, 95-107.
- Roehrs, R., 2004. Vitamina A e a resposta celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*., Centro de biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- Roehrs, R., Freitas, D.R.J., Masuda, A., Henriques, J.A.P., Guecheva, T.N., Ramos, A.L.L.P., Saffi, J., 2010. Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains. *Archives of Microbiology* 192, 221-228.
- Rosa, R.M., Melecchi, M.I., Da Costa Halmenschlager R., Abad, F.C., Simoni, C.R., Caramão, E.B., Henriques, J.A., Saffi, J., De Paula Ramos, A.L., 2006. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus Tiliaceus* L. methanolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7324-7330.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* 1012, 119-128.

- Ruan, Z.P., Zhang, L.L., Lin, Y.M., 2008. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* leaves. *Molecules* 13, 2545-2556.
- Schoenfelder, T., Warmlin, C.Z., Manfredini, M.S., Pavei, L.L., Réus, J.V., Tristão, T.C., Fernandes, M.S., Costa-Campos, L., 2010. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20, 222-227.
- Shafi, P.M., Rosamma, M.K., Kaiser Jamil, P.S., Reddy, 2002. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. *Fitoterapia* 73, 414-416.
- Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., 2006. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 367-373.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimme, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 203. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87, 4-14.
- Silva, C.G., Herdeiro, R.S., Mathias, C.J., Panek, A.D., Silveira, C.S., Rodrigues, V.P., Rennó, M.N., Falcão, D.Q., Cerqueira, D.M., Minto, A.B.M., 2005. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research* 52, 229-233.
- Simões, C.M.O., Amoros, M., Girre, L., 1999a. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research* 13, 323-328.
- Simões, C.M.O., Schenckel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., 1999b. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6ª Edição ed. Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 49-55.
- Soares, A.A., Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S., M. G., Peralta, R.M., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei Murri*) in two stages of maturity. *Food Chemistry* 112, 775-781.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200-213.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219-243.
- Spencer, J.P.E., Schroeter, H., Crossthwaithe, A.J., Kuhnle, G., Williams, R.J., Rice-Evans, C., 2001. Contrasting influences of glucuronidation and o-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 1139-1146.
- Srinivasan, C., Liba, A., Imlay, J.A., Valentine, J.S., Gralla, E.B., 2000. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29187-29192.

- Stephen, D.W., Jamieson, D.J., 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology letters 141, 207-212.
- Styskal, J., Remmen, H.V., Richardson, A., Salmon, A.B., 2012. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? Free Radical Biology & Medicine 52, 46-58.
- Suizu, T., Tsutsumi, H., Ohtake, Y., Kawado, A., Imayasu, S., Kimura, A., Murata, K., 1994. Absolute glutathione requirement for sporulation of a yeast *Saccharomyces cerevisiae*. . Biochemistry and Biophysical Research Communication 205, 1151-1155.
- Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R., 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. Food Chemistry 104, 1106-1114.
- Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry 18, 1279-1286.
- Takahashi, A., Ohnishi, T., 2004. The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the internal space station. . Biological Sciences in Space 18, 255-260.
- Tan, H.P., Wong, D.Z., Ling, S.K., Chuah, C.H., Kadir, H.A., 2012. Neuroprotective activity of galloylated cyanogenic glucosides and hydrolysable tannins isolated from leaves of *Phyllagathis rotundifolia*. Fitoterapia 83, 223-229.
- Tan, M.A., Kitajima, M., Kogure, N., Nonato, M.G., Takayama, H., 2010. Isolation and total syntheses of two new alkaloids, dubiusamines-A, and -B, from *Pandanus dubius*. Tetrahedron 66, 3353-3359.
- Tang, S.Y., Whiteman, M., Jenner, A., Peng, Z.F., Halliwell, B., 2004. Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of *Cratogeomys cochinchinense* (YCT) in Jurkat T cells: the role of reactive oxygen species and calcium. . Free Radical Biology & Medicine 36, 1588-1611.
- Tawaha, K., Alali, F.Q.A., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry 104, 1372-1378.
- Teixeira, C.C., Fuchs, F.D., 2006. The efficacy of herbal medicines in clinical models: The case of jambolan. Journal of Ethnopharmacology 108, 16-19.
- Timbola, A.K., Szpoganicz, B., Branco, A., Monache, F.D., Pizzolatti, M.G., 2002. A new flavonoid from leaves of *Eugenia jambolana*. Fitoterapia 73, 174-176.
- Torrás-Claveria, L., Jáuregui, O., Codina, C., Tiburcio, A.S., Bastida, J., Viladomat, F., 2012. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. Plant Science 182, 71-78.

- Van Asbeck, S.W., Hillen, F.C., Boonen, H.C., de Jung, Y., Dormans, J.A., Vander Wal, N.A., Marx, J.J., Sangster, B., 1989. Continuous intravenous infusion of desferrioxamine reduces mortality by paraquat in vitamin E-deficient rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 139, 769-773.
- Vasudevan, D.M., Sreekumari, S., Vaidyanathan, K., 2011. *Textbook of Biochemistry for Medicinal Students*. Jaypee Brothers Medicinal Publishers (P) Ltd, Saint Louis (USA).
- Verpoorte, R., Memelink, J., 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 181-187.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 161-169.
- Watanabe, R., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., 2010. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther* 127, 261-270.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: Antioxidant or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 36, 838-849.
- Winston, J.C., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal Clinical Nutrition* 70, 491-499.
- Xu, Q.-M., Shu, Z., He, W.-J., Chen, L.-W., Yanga, S.-L., Yang, G., Liu, Y.-L., Li, X.-R., 2012. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* 19, 293-300.
- Yanga, J., Guoa, J., Yuan, J., 2008. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT* 41, 1060-1066.
- Yonei, S., Furui, H., 1981. Lethal and mutagenic effects of malondialdehyde, a decomposition product of peroxidized lipids, on *Escherichia coli* with different DNA-repair capacities. *Mutation Research* 88, 23-32.
- Zakaria, Z.A., Abdul Hisam, E.E., Rofee, M.S., Norhafizah, M., Somchit, M.N., Teh, L.K., Salleh, M.Z., 2011. *In vivo* antiulcer activity of the aqueous extract of *Bauhinia purpurea* leaf. *Journal Ethnopharmacology* 137 1047-1054.
- Zhang, G., He, L., Hu, M., 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities *in vitro*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 18-25.
- Ziegler, R.G., 1991. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *American Journal Clinical Nutrition* 53, 2515-2595.

ANEXO A – Carta de submissão do artigo à revista Journal Ethnopharmacology

Para: edenardin@yahoo.com.br; eltondenardin@gmail.com

Enviadas: Sábado, 18 de Maio de 2013 15:17

Assunto: Submission Confirmation for your paper

Dear Dr.Denardin,

Your submission entitled "In vitro and in vivo antioxidant activity of the extracts from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.