



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
FABRINE BIANCHIN DOS SANTOS

CAMPUS URUGUAIANA- RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA), QUANTO AO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E O ACÚMULO LIPÍDICO UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL.

FABRINE BIANCHIN DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA), QUANTO AO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E O ACÚMULO LIPÍDICO UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila.

Uruguaiiana
2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

89a dos Santos, Fabrine Bianchin
AVALIAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE Ceiba
speciosa (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA), QUANTO AO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E O ACÚMULO LIPÍDICO UTILIZANDO Caenorhabditis
elegans COMO MODELO EXPERIMENTAL. / Fabrine Bianchin dos
Santos.
58 p.
Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
FARMÁCIA, 2017.
"Orientação: Daiana Silva Avila".
1. antioxidante. 2. Caenorhabditis elegans. 3. Ceiba
speciosa. 4. acúmulo lipídico. I. Título.

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE
Ceiba speciosa (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA), QUANTO AO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E O ACÚMULO LIPÍDICO
UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO
EXPERIMENTAL.**

FABRINE BIANCHIN DOS SANTOS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila
Área de concentração: Bioprospecção .

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila
Orientador
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UNIPAMPA



Dra. Ana Paula Ardais
UCPel

Prof. Dr. Robson Puntel
UNIPAMPA
Uruguaiiana

Uruguaiiana
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho durante está trajetória.

Aos meus Pais Guilherme Bittencourt dos Santos e Marilei Bianchin dos Santos, pela oportunidade, pelo apoio emocional, sem vocês nada disso seria possível, obrigado por tudo.

A minha avó Anadir Vieiro Bianchin por todo amor e orações em meu favor.

A minha irmã Gabrieli Bianchin dos Santos que mesmo sentindo a minha falta, sempre torceu muito por mim, obrigada pelo carinho.

Agradeço a minha Orientadora Dr^a. Daiana Ávila, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Parabenizá-la também pelo seu profissionalismo, determinação e força de vontade, por persistir sempre e não desistir dos seus objetivos.

À Co-orientação da querida Prof. Dr^a Fabiane Farias, obrigada pela ajuda e parceria.

Não posso esquecer dos meus mais fiéis amigos e colegas: Juliana Barros, Jamila Bruno, Ana Helena Dal Forno e Ana Paula Freitas, é com vocês que compartilho angústias, alegrias, felicidades e tantas outras coisas que uma amizade constrói, obrigado por tornarem ainda mais especial esta caminhada, com vocês por perto, fica tudo mais leve.

A todos os colegas do GBToxCe, que se fizeram presentes na minha vida, acadêmica, durante essa jornada, em especial: Ana Thalita, Andreia, Ana Helena, Eduardo, Eugenia e Mauricio.

Muito Obrigada.

RESUMO

As plantas são amplamente usadas na medicina popular devido às suas propriedades farmacológicas. Uma destas é a *Ceiba speciosa*, conhecida popularmente como paineira-rosa, barriguda, árvore-de-lã, entre outras. A espécie é encontrada no Noroeste do Rio Grande do Sul sendo nativa do alto Uruguai. O chá obtido da casca do caule é empregado na medicina popular para reduzir dos níveis de colesterol, triglicérides e glicose. Entretanto, não existem estudos na literatura comprovando a eficácia do chá, nem a respeito da segurança do seu uso. Para o estudo, foi utilizado um extrato aquoso da casca do caule de *C. speciosa*. Foi determinada a atividade antioxidante *in vitro* através do método clássico de DPPH. Para os testes toxicológicos, *C. elegans* N2 (tipo selvagem) foram tratados com o extrato aquoso da casca do caule de *C. speciosa* no primeiro estágio larval (L1) nas concentrações de 5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 250µg/mL, para a determinação da sobrevivência. Para avaliação de um possível papel protetor, os nematóides foram tratados com Paraquat (0,5 mM) e Peróxido de Hidrogênio H₂O₂ (1mM) após o tratamento com o extrato. Os resultados deste estudo permitiram observar que a exposição aguda às diferentes concentrações do extrato aquoso da casca do caule de *C. speciosa* não alterou a taxa de sobrevivência nem a reprodução de *C. elegans*. O extrato apresentou atividade sequestradora de radicais livres *in vitro*, possível graças à grande quantidade de compostos fenólicos presente no extrato. Entretanto, *in vivo*, não foi capaz de proteger os nematoides contra a toxicidade induzida por agentes pró-oxidantes (paraquat e H₂O₂). Além disso, o extrato aquoso da casca do caule de *C. speciosa*, por si só, não apresentou capacidade de redução do acúmulo lipídico e nem redução dos níveis de triacilglicérides, assim como não afetou os batimentos da faringe. Em particular, o extrato protegeu contra o dano induzido da glicose, uma vez que os animais tratados apresentaram aumento na longevidade que havia sido reduzida pela glicose. Entretanto, o acúmulo de lipídios induzido pela glicose não foi diminuído pelo tratamento com os extratos. Apesar dos resultados preliminares, acreditamos que o extrato apresenta-se promissor para estudos posteriores em relação ao modelo de hiperglicemia em *C. elegans*.

Palavras-chave: antioxidante, *Caenorhabditis elegans*, *Ceiba speciosa*, acúmulo lipídico.

ABSTRACT

Plants are widely used in folk medicine because of their pharmacological properties. One of these is *Ceiba speciosa*, popularly known as paineira-rosa, barriguda, tree-of-wool, among others. The species is found in the Northwest of Rio Grande do Sul being native of the upper Uruguay. Tea obtained from stem bark is employed in folk medicine to reduce cholesterol, triglyceride and glucose levels. However, there are no studies in the literature proving the efficacy of tea, nor regarding the safety of its use. For the study, an aqueous extract of the stem bark of *C. speciosa* was used. In vitro antioxidant activity was determined by the classical DPPH method. For the toxicological tests, *C. elegans* N2 (wild type) were treated with the aqueous extract of *C. speciosa* stem bark in the first larval stage (L1) at concentrations of 5µg / mL, 25µg / mL, 50µg / mL, 250µg / ML, for the determination of survival. For evaluation of a possible protective role, the nematodes were treated with Paraquat (0.5 mM) and Hydrogen Peroxide (H₂O₂ 1 mM) after treatment with the extract. The results of this study allowed us to observe that the acute exposure to the different concentrations of the aqueous extract of *C. speciosa* stem bark did not alter the survival rate nor the reproduction of *C. elegans*. The extract showed free radical scavenging activity in vitro, due to the large amount of phenolic compounds present in the extract. However, in vivo, it was not able to protect the nematodes against the toxicity induced by pro-oxidants (paraquat and H₂O₂). In addition, the aqueous extracts of *C. speciosa* stem bark alone did not have the capacity to reduce lipid accumulation or reduce triacylglyceride levels, nor did it affect pharyngeal beats. In particular, the extract protected against induced glucose damage, since treated animals had increased longevity that had been reduced by glucose. However, the glucose-induced accumulation of lipids was not diminished by treatment with the extracts. Despite the preliminary results, we believe that the extract is promising for further studies in relation to the hyperglycemia model in *C. elegans*.

Key words: Antioxidant activity, *Caenorhabditis elegans*, *Ceiba speciosa*, lipid accumulation.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi desenvolvida em partes:

PARTE UM

As seções Introdução, Revisão Bibliográfica, Justificativa e Objetivos encontram-se nessa parte inicial.

PARTE DOIS

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 da mesma forma que será submetido à Revista Food Research International.

PARTE TRÊS

Conclusões e Referências.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura I: <i>Ceiba speciosa</i>	16
Figura II: Ciclo de vida do <i>C. elegans</i>	19

Artigo Científico

Figure 1: Survival of nematodes.....	33
Figure 2: Egg Laying.....	35
Figure 3: Pharyngeal pumping.....	35
Figure 4 Effect of <i>C. speciosa</i> on glucose- induced toxicity (N2).....	35
Figure 5: Effect of <i>C. speciosa</i> on glucose- induced toxicity (Vs 29).....	38
Figure 6: Determination of the triglyceride (N2).....	39
Figure 6: Determination of the triglyceride (RB 1600).....	40

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
ABSTRACT.....	9
PARTE UM	
INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 Plantas Medicinais.....	13
1.2 <i>Ceiba speciosa</i>	15
1.3 Estresse Oxidativo.....	17
1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i>	18
1.5 Metabolismo lipídico em <i>C. elegans</i>	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
PARTE DOIS	
5. ARTIGO CIENTÍFICO	24
6. CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.
7. PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.

PARTE UM

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo tem sido associado como o principal fator para a etiologia de várias doenças relacionadas ao envelhecimento (Wallace & Melov, 1998) e ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (EROs/ERN) e o sistema de defesa antioxidante em favor do lado pró-oxidativo. O excesso de EROs danifica importantes macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA (Finkel & Holbrook, 2000) levando à perda da integridade e funcionalidade celular. Alguns distúrbios metabólicos, como a obesidade, também apresentam o estresse oxidativo como fator etiológico da doença.

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura que representa risco à saúde. Globalmente, há mais de 300 milhões de obesos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde e 43 milhões de crianças com sobrepeso (OMS, 2004). A obesidade é causada por fatores ambientais e genéticos, os quais contribuem para um desequilíbrio da homeostase energética e é caracterizada pelo aumento da massa de tecido adiposo, podendo haver hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Yang *et al.*, 2008).

Há um crescente interesse em encontrar antioxidantes naturais, em especial de origem vegetal, a serem utilizados no tratamento de várias doenças humanas (Surveswaran *et al.*, 2010). Entre inúmeras espécies vegetais, trabalhamos com *Chorisia speciosa* (A. St. Hil) Ravenna (paineira), uma espécie arbórea pertencente à família Bombacaceae. Recentemente essa espécie passou a ter a denominação de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.), pertencendo à família Malvaceae (Carneiro *et al.*, 2000). A espécie é encontrada no Noroeste do Rio Grande do Sul, sendo nativa na floresta do Alto Uruguai (Cappelatti *et al.*, 2009). Quanto ao uso na medicina popular, há registros para o emprego contra doenças cardíacas e hipertensão, cujas partes utilizadas são partes da casca do caule e as flores (Lucena *et al.*, 2008). Com o crescente interesse na bioprospecção de produtos naturais, especialmente de material vegetal oriundo do Bioma Pampa, a validação e aplicação de modelos alternativos para a avaliação destes se torna relevante.

Neste contexto, destaca-se o *Caenorhabditis elegans*, um nematóide

não parasítico de solo que se alimenta de bactérias (Sulston,1983). Estima-se que 60%-80% dos genes humanos possuem homólogos em *C. elegans* (Kaletta & Hengartner, 2006). As vantagens de se utilizar o nematóide incluem a transparência do corpo, o seu tamanho reduzido (aproximadamente 1 mm quando adulto), o curto tempo de vida (aproximadamente 28 dias), a alta reprodutibilidade (um hermafrodita é capaz de liberar até 300 ovos ao longo de sua vida adulta), a alta homologia com o genoma humano e a fácil manipulação genética (Sulston, 1983). Em contraste com os estudos com células livres e cultura de células, o *C. elegans* permite a investigação dentro do contexto de um organismo completo, com diferentes células funcionando em consonância com diferentes sistemas (Kaletta *et al.*, 2006).

A busca por novas substâncias de origem vegetal tem sido impulsionada por diversos fatores: maior eficácia no tratamento de diferentes doenças, estudos sobre a biodiversidade e preservação das espécies e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, devido ao alto custo que eles representam (Carvalho, 2006). Neste sentido, as pesquisas têm apresentado resultados promissores para as mais variadas doenças (Pizziolo *et al.*, 2011). O uso indiscriminado de plantas medicinais e medicamentos sintéticos representa um risco à saúde, quando não é feito sob orientação apropriada. Um exemplo disso é o *Ginkgo biloba*, uma espécie amplamente utilizada popularmente para transtornos cognitivos, pode potencializar a ação de agentes anticoagulantes, como a heparina e varfarina, aumentando o risco de hemorragia intracerebral (Silva *et al.*,2010).

Sendo assim, é imprescindível a conscientização da comunidade científica, dos profissionais da saúde e da própria população quanto a importância dos estudos direcionados a investigação a respeito da segurança e eficácia das plantas medicinais.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

No Brasil, a utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças apresenta, fundamentalmente, influências da cultura indígena, africana e europeia. Estas influências deixaram marcas profundas nas diferentes áreas de nossa cultura e constituem a base da medicina popular, há algum tempo, vem sendo retomada pela medicina formal, que procura aproveitar suas práticas, dando-lhes caráter científico e integrando-as num conjunto de princípios que visam não apenas curar algumas doenças, mas restituir o homem à vida natural (Ferraz *et al.*, 2010).

O Brasil é considerado um dos países de maior biodiversidade do planeta por possuir cerca de 20% do número total de espécies de plantas do mundo (Albuquerque *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2002). O número de espécies está estimado entre 350.000 e 550.000; destas, apenas 55.000 catalogadas e distribuídas entre as diferentes regiões do país. Porém, parte desta diversidade de espécies ainda não foi investigada em relação as suas potencialidades terapêuticas, embora este seja um processo que vem evoluindo (Simões *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009; Cartaxo *et al.*, 2010). A relação entre as pessoas e as plantas usadas na terapêutica local é um dos principais focos de interesse da etnobotânica. Esta ciência utiliza-se de diversas abordagens para ampliar o conhecimento sobre o uso da biodiversidade através dos saberes locais, aplicando diferentes estratégias, principalmente para a seleção de espécies propícias a bioprospecção (Shelley, 2009; Albuquerque, 2010).

Há um crescente interesse em encontrar antioxidantes naturais, em especial de origem vegetal, a serem utilizados no tratamento de várias doenças humanas. Suas propriedades farmacológicas e terapêuticas têm sido atribuídos a diferentes constituintes químicos isolados desses extratos (Surveswaran *et al.*, 2010), no entanto, alguns estudos demonstraram que os extratos integrais têm uma eficácia mais elevada, quando comparada com as moléculas isoladas (Surveswaran *et al.*, 2010).

Assim, a avaliação da segurança do uso de produtos vegetais deve ser realizada previamente a sua utilização. Os usos benéficos de plantas

medicinais no sistema tradicional de medicina de muitas culturas são amplamente documentados. Entretanto, diversas plantas foram usadas como adjuvante da dieta e no tratamento de várias doenças do mesmo, sem qualquer conhecimento sobre as suas funções e os componentes apropriados (Wahab *et al.*, 2012).

A busca por novas substâncias de origem vegetal tem sido impulsionada por diversos fatores: maior eficácia no tratamento de diferentes doenças, estudos sobre a biodiversidade e preservação das espécies e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, devido ao alto custo que eles representam (Carvalho, 2006). Neste sentido, as pesquisas têm apresentado resultados promissores para as mais variadas doenças (Pizziolo *et al.*, 2011). Um exemplo é espécie *Allium sativum* a qual possui atividade hipolipidêmica bem relatada na literatura, principalmente por seu efeito antiaterosclerótico e de redução de lipídeos. Além destes efeitos, foram comprovadas outras ações farmacológicas, como antiaterogênica, redutora de acúmulo de lipídeos, anti-hipertensiva, inibidora da síntese de colesterol, vasodilatadora e antioxidante. Este último é apontado como um dos principais fatores responsáveis pela ação antiaterosclerótica da espécie (Pizziolo *et al.*, 2011).

As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de substâncias terapêuticas. Muitas espécies possuem atividades tóxicas e o uso indiscriminado pode causar sérios problemas. Com os avanços científicos, esta prática perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados são alguns dos fatores que contribuíram para o ressurgimento da terapia através das plantas, ou fitoterapia (Rocha *et al.*, 2006).

O conhecimento sobre plantas tidas como medicinais na forma de chás e extratos está contribuindo fundamentalmente para a utilização racional das plantas medicinais e seus preparados com base na medicina tradicional, cabendo aos profissionais das áreas de saúde, estarem atentos quanto à orientação de utilização de chás medicinais, bem como na prática de farmacovigilância (López, 2006).

1.2 CEIBA SPECIOSA

A *Ceiba speciosa* A. St. Hil. é uma espécie arbórea tropical pertencente à família Malvaceae, são encontradas principalmente em zonas de floresta tropical. Estas espécies possuem uso medicinal popular descrito para as mais diversas finalidades e são amplamente utilizadas na América do Sul (Said *et al.*, 2003). No Brasil são encontradas em maior abundância nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Beleski-Carneiro *et al.*, 1996).

A *C. speciosa* é muito empregada na ornamentação pública (Figura 1), devido à coloração de suas flores e ao fato de ser pouco exigente quanto ao solo, podendo atingir desenvolvimento satisfatório até em solos de baixa fertilidade química, secos e arenosos (Paula *et al.*, 1997).

Além da importância ecológica e ornamental, em que a espécie é usada na restauração de ecossistemas degradados e no paisagismo, sua madeira é empregada na confecção de canoas, cochos, forros de móveis, fabricação de aeromodelos, caixotaria e produção de pasta celulósica; a sua paina ou lã é bastante utilizada para o enchimento de almofadas, cobertores e travesseiros (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2003). Estudos recentes têm testado a paina e outras fibras vegetais como solvente para o setor de petróleo, obtendo resultados satisfatórios, porém necessita mais pesquisas e aprofundamento das técnicas (Annunciado, 2005; Bara, 2011; Ferreira, 2009).

A utilização de sua lã ou paina também apresenta importância econômica, tendo em vista o seu emprego como isolante térmico e enchimento e confecção de bóias e salva-vidas (Paula *et al.*, 1997; Duarte, 2006).



FIGURA 1: *C. speciosa* e suas estruturas vegetais a- *C. speciosa* (Paineira), b- flor, c- Fruto, d-
lã de *C. speciosa*.

Fonte: HOFMANN, T. C, 2012.

A literatura científica descreve diversas atividades medicinais para várias espécies do gênero *Ceiba*, entre estas, foram realizados vários estudos como: a *Ceiba pentandra* é uma das mais amplamente utilizadas na medicina tradicional da América do Sul, onde suas folhas, raízes e cascas são empregadas no tratamento da Diabetes (Ladeji *et al.*, 2003). Esta espécie possui uso medicinal popular descrito para as mais diversas finalidades, sendo amplamente utilizada na América do Sul (Said *et al.*, 2003). No Brasil são encontradas em maior abundância nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Beleski e Carneiro *et al.*, 1996).

No estado do Ceará, é difundido o uso das folhas de outra espécie do gênero, *Ceiba graziivii*, para o tratamento de anemia (Cartaxo *et al.*, 2010). Além dessa espécie, decoctos ou macerados das cascas e raízes de *Ceiba insignis* e *Ceiba samuama* são empregados na Amazônia peruana para o tratamento de reumatismo (Sanz-Biset *et al.*, 2009).

Existem relatos populares do uso da *Ceiba speciosa* na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul para a redução dos níveis séricos do colesterol,

triglicerídeos e glicose, porém possui poucos estudos científicos relacionados à esta espécie. Desta forma, o nosso estudo vem avaliar os aspectos referentes à segurança do uso de *Ceiba speciosa*, de modo a trazer a população informações a respeito de sua eficácia e toxicidade.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio em que quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio ou espécies de nitrogênio (EROs/ERN, o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio ou o radical hidroxila, peroxinitrito) superam a capacidade antioxidante endógena de um sistema biológico. Como consequência, estas espécies podem levar a um acúmulo do dano oxidativo em uma variedade de biomoléculas, tais como enzimas, proteínas, DNA e lípidos, o que resulta numa perda progressiva de processos celulares funcionais (Ames, Shigenaga & Hagen, 1993).

Assim, o estresse oxidativo tem sido relacionado com um aumento do risco para a doença cardiovascular, câncer, reumatismo e com o processo de envelhecimento (Bokov, Ohaudhuria & Richardson, 2004). O sistema de defesa antioxidante, considerado um mecanismo de combate a EROs, tem o objetivo de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem e causem prejuízos sistêmicos irreparáveis (Kundu & Surh, 2010).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das SRO, porém as membranas celulares são as estruturas mais acometidas pela peroxidação lipídica, sofrendo alterações em sua estrutura e permeabilidade, o que acarreta perdas da seletividade na troca iônica, liberação de compostos citoplasmáticos e formação de produtos tóxicos (Antunes *et al.*, 2008; Batista; Costa; Pinheiro-Sant'ana, 2007). Uma lesão da membrana, por sua vez, expõe mais estruturas intracelulares, deixando vulneráveis mitocôndrias, lisossomos e inclusive o DNA, contribuindo para a ocorrência de mutações genéticas que desfavorecem a regulação do ciclo celular e podem provocar morte celular (Gomes, 2007).

Os peróxidos lipídicos, derivados de ácidos graxos poli-insaturados, são instáveis e se decompõem para formar uma série de compostos complexos que incluem compostos carbonílicos reativos, como o malondialdeído (MDA), o

qual resulta da oxidação da partícula de LDL e cujos níveis estão elevados em associação com fatores de risco cardiovascular como hipertensão, hiperlipidemia e diabetes (Nasser *et al.*, 2011).

O organismo saudável, entretanto, possui mecanismos protetores que modulam a concentração dos compostos reativos (Barbosa, 2008). Os mecanismos de defesa antioxidantes celulares têm por finalidade prevenir a formação de radicais livres, converter espécies oxidantes tóxicas em menos tóxicas, preservar a compartimentalização celular - que é vital para as estruturas celulares - ou promover o reparo do dano causado pelos radicais livres (Percario, 2010).

1.3 CAENORHABDITIS ELEGANS

Existem vários modelos experimentais para se estudar a farmacologia e toxicologia de plantas medicinais, como ratos, camundongos, coelhos, assim como modelos alternativos como nematoides e leveduras. Nas últimas décadas, descobertas importantes com relevância para os mamíferos foram realizadas usando este nematoide (Brenner, 1974). O *Caenorhabditis elegans* é um nematóide terrestre de vida livre da família Rhabditidae. Nas últimas décadas, o *C. elegans* tem sido utilizado como organismo modelo por mais de 200 laboratórios mundiais em estudos de biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia. Isso foi possível porque há uma forte conservação entre o *C. elegans* e os mamíferos em princípios celulares e moleculares e 60%-80% dos genes humanos possuem homólogos em *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Kaletta & Hengartner, 2006). A sequência genômica completa de *C. elegans* foi publicada no final da década de 90 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), o que motivou e impulsionou ainda mais os estudos com este nematóide.

É facilmente cultivado em laboratório em placas de Petri contendo ágar e semeadas com a bactéria *Escherichia coli* como fonte de alimento. Os vermes atingem a maturidade com 2,5 dias a 25°C e tem um tempo de vida curto de 20 dias a 22°C - 25°C, temperaturas mais baixas permitem que o ciclo ocorra de forma mais lenta. O ciclo de vida dos nematóides é composto de uma fase embrionária seguida de quatro estágios larvais (L1-L4) e de fase adulta (Figura

2). Os hermafroditas adultos se autofecundam dando origem a um novo ciclo. O adulto coloca ovos por cerca de quatro dias e vive aproximadamente vinte e dois dias (Wood, 1988).

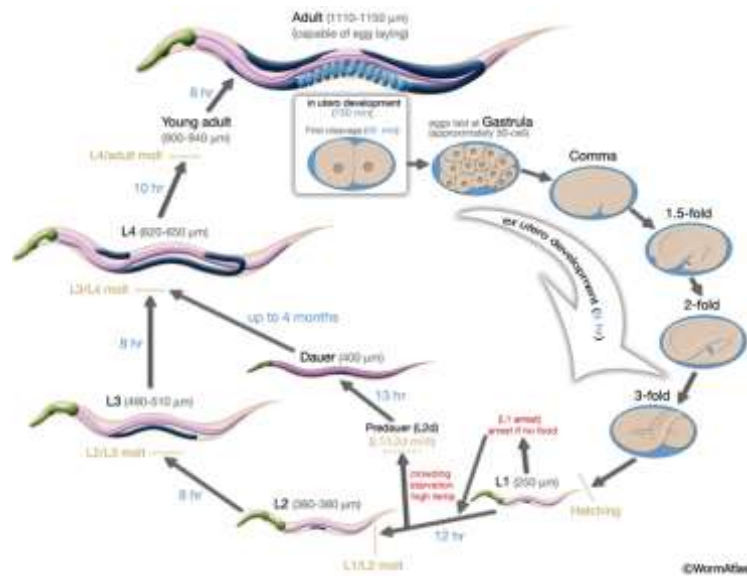


FIGURA 2: Ciclo de vida do *C. elegans* a 22°C.
Fonte: WormAtlas.

Outra característica importante é o seu tamanho reduzido e sua transparência, permitindo que o crescimento de suas células possa ser acompanhado individualmente e que os genes repórteres ligados ao GFP possam ser observados no organismo *in vivo*. Devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e manipulação genética, o *C. elegans* tem sido utilizado a fim de desvendar mecanismos que seriam mais difíceis de serem investigados em organismos mais complexos (Avila, Helmcke e Aschner, 2010; Helmcke, Avila e Aschner, 2010).

O nematóide *C. elegans* tem se mostrado um modelo útil para estudos de metabolismo, especialmente para se elucidar a genética por trás da regulação do metabolismo dos lipídios (Aitlhadj *et al.*, 2011). O conhecimento do genoma permitiu a identificação de vários genes que codificam reguladores do acúmulo de gordura, do transporte de lipídios bem como alguns reguladores neuroendócrinos de comportamentos alimentares (Brenner, 1974; McKay *et al.*, 2003). Os processos metabólicos são conservados em relação aos mamíferos, assim como a forma de armazenamento lipídico, os triacilgliceróis (Mullaney *et al.*, 2009).

1.4 METABOLISMO LIPÍDICO EM *C. ELEGANS*

Os triacilgliceróis são as principais moléculas de armazenamento energético em *C. elegans*, que como os mamíferos, armazenam energia sob esta forma. Por este motivo, os nematoides podem ser utilizados como modelo para doenças metabólicas (Kaletta *et al.*, 2006; Ashrafi, 2007).

Os neurônios estão concentrados principalmente no anel nervoso que circunda a faringe, na cadeia ou nervo corda ventral e na cauda. Os neurônios são classificados em sensoriais, motores, interneurônios ou de função mista baseado nas características morfológicas e funcionais conhecidas (Hall *et al.*, 2006). O nematoide sintetiza neurotransmissores presentes no SNC, incluindo serotonina, dopamina, glutamato, acetilcolina, GABA e numerosos neuropeptídeos (Bargmann, 1998). Proteínas da maquinaria sináptica como transportadores, enzimas de síntese e 54 receptores são conservadas quando comparadas com os presentes em mamíferos (Bargmann, 1998). O sistema nervoso do verme faz a integração e regulação das funções essenciais, controlando desenvolvimento, alimentação, movimento, metabolismo e reprodução (Rankin, 2002; de Bono e Maricq, 2005).

Em *C. elegans*, o conteúdo lipídico é regulado pelo sistema nervoso através da modulação da alimentação e atividade metabólica. O conhecimento do seu genoma permitiu a identificação de inúmeros genes que codificam fatores que regulam o armazenamento, transporte, síntese e oxidação de lipídeos e outros nutrientes, como também de vias neuroendócrinas relacionadas ao comportamento alimentar. Grande parte desses genes apresenta ortólogos nos vertebrados (Mullaney *et al.*, 2009). Enquanto os mamíferos não são capazes de sintetizar todas as espécies de ácidos graxos, o nematóide possui aparato enzimático que permite a síntese de ácidos graxos poliinsaturados (Watts *et al.*, 2002). Recentemente foi descoberto diversos lipídeos no *C. elegans*, como triglicerídeos, fosfolipídios, esfingolipídios, entre outros, que são sintetizados diretamente de ácidos graxos (Houthoofd *et al.*, 2002). O nematóide não possui tecido de armazenamento especializado e o excesso energético é armazenado nos enterócitos, células da hipoderme e

gônodas (Ashrafi, 2007).

O *C. elegans* pode ser utilizado também como modelo para doenças metabólicas (Kaletta e Hengartner, 2006; Ashrafi, 2007). O conteúdo lipídico é regulado pelo sistema nervoso através da modulação da alimentação e atividade metabólica. Porém a composição lipídica varia dependendo do estágio larval, temperatura de crescimento e dieta (Ashrafi, 2007). Em média, nas condições padrão de cultivo, as porcentagens das espécies lipídicas no nematóide adulto jovem são: 40% a 55% triglicerídeos e 60% a 45% lipídeos polares. No grupo dos lipídeos polares, 55% correspondem à fosfatidiletanolamina, 32% à fosfatidilcolina, 8% à esfingomiélnina e os 5% restantes às espécies cardiolipina, fosfatidilinositois e outras (Ashrafi, 2007). De maneira diferente dos mamíferos, o *C. elegans* não expressa leptina, mas não pode sintetizar colesterol (Entchev *et al.*, 2005). Em relação a este último, por ser essencial para a biossíntese de membranas, precisa ser fornecido a partir do meio de cultivo. Interessantemente, os lipídios podem ser marcados com uma variedade de marcadores, como o vermelho do Nilo, o Sudan Black, o Bodipy, entre outros, permitindo visualização *in vivo* do conteúdo lipídico. Por serem transparentes permitem técnicas não invasivas e a visualização das estruturas celulares e visualização das proteínas fluorescentes.

O nematoide é auxotrófico para o colesterol, necessitando de suplementação dietética (Kurzchalia e Ward, 2003). Devido à pequena quantidade necessária, acreditasse que o esterol seja precursor de hormônios. Alterações no crescimento, perfil lipídico e de longevidade são alguns dos fenótipos observados nos vermes sem colesterol na dieta (Ashrafi, 2007; Morck *et al.*, 2009).

Para se estudar efeitos no metabolismo lipídico, é possível se utilizar das vantagens de cepas transgênicas que induzam acúmulo lipídico. Um exemplo é a cepa RB 1600 possui mutação no gene *tub-1*. A perda funcional de *tub-1* em *C.elegans* leva a acumulação de lipídios. Outra cepa é a VS 29 possui uma proteína transgêna DGAT-2 que é difundida com GFP (fluorescente), que está localizada nas partículas lipídicas, podendo observar as gotas lipídicas, no nematoide.

2 JUSTIFICATIVA

Diversas espécies vegetais são culturalmente utilizadas como forma de tratamento por indivíduos hipercolesterolêmicos e hiperglicêmicos, entre elas está *Ceiba speciosa*, conhecida popularmente como paineira e utilizada na medicina popular em diversos estados do Brasil, em especial no Município de Santo Antônio das Missões (RS), a observação dos hábitos e costumes da população do município permitiu verificar que a espécie *Ceiba speciosa*, conhecida popularmente como paineira, o chá da casa do caule é freqüentemente empregado na região para o tratamento do controle dos níveis de colesterol e glicemia.

Em função deste amplo uso, mesmo sem o muito conhecimento tóxico-farmacológico dessa planta, torna-se necessário esclarecer os efeitos e os mecanismos pelos quais *C. speciosa* exerce seus efeitos, especialmente ao se utilizar um extrato que mimetiza a forma como é utilizada pela população, um chá. Como o nematódeo *C. elegans* possui entre suas características ser um modelo menos complexo quando relacionado aos vertebrados, pode-se realizar uma gama de estudos pertinentes na área. Desta forma, torna-se interessante observar a presença de efeitos tóxicos e possíveis efeitos farmacológicos do extrato aquoso da casca de *C. speciosa*, utilizando o modelo experimental *C. elegans*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação toxicológica e a atividade antioxidante do extrato aquoso da casca do caule de *Ceiba speciosa* e investigar o acúmulo lipídico, em *Caenorhabditis elegans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o extrato possui atividade neutralizadora de espécies reativas (DPPH) *in vitro*, bem como teor total de compostos fenólicos;
- Observar se o extrato aquoso da casca do caule de *C. speciosa* apresenta toxicidade *in vivo*, através da avaliação da mortalidade e da reprodução;
- Determinar se o pré-tratamento com extrato reduzem a letalidade causada por Paraquat e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), dois agentes pró-oxidantes;
- Avaliar se o pré-tratamento com extrato diminui a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Investigar se o tratamento com o extrato protege a toxicidade causada pelos agentes pró-oxidantes;
- Verificar os batimentos faríngeos dos nematoides, para avaliar a ingestão do extrato;
- Verificar o acúmulo lipídico dos nematódeos tratados nas diferentes concentrações do extrato;
- Verificar se o tratamento com o extrato protege a toxicidade induzida pela glicose;
- Observar se o extrato reduz o acúmulo de lipídeos induzido por glicose

PARTE DOIS

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. O manuscrito está apresentado da mesma forma que será submetido à Revista Food Research International.

A BIOCHEMICAL EVALUATION OF *Caenorhabditis elegans* FOLLOWING
EXPOSURE TO THE AQUEOUS BARK EXTRACT OF *Ceiba speciosa* (A. St.-
Hill) Ravenna

Fabrine Bianchin dos Santos, Ana Helena de Castro Dal Forno, Cristiane Freitas Rodrigues, Luiz Eduardo Ben Plissão, Cristiane Casagrande Denardin, Fabiane Moreira Farias and Daiana Silva Ávila.

^a Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Brazil
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
BR 472 – Km 592 – Caixa Postal 118
CEP 97500-970
Uruguaiiana/RS

Abstract

Plants are widely used in folk medicine because of their pharmacological properties. One of these is *Ceiba speciosa*, popularly known as paineira-rosa, barriguda, tree-of-wool, among others. The species is found in the Northwest of Rio Grande do Sul being native of the upper Uruguay. Tea obtained from stem bark is employed in folk medicine to reduce cholesterol, triglyceride and glucose levels. However, there are no studies in the literature proving the efficacy of tea, nor regarding the safety of its use. For the study, an aqueous extract of the stem bark of *C. speciosa* (ECE) was used. In vitro antioxidant activity was determined by the classical DPPH method. For the toxicological tests, *C. elegans* N2 (wild type) were treated with ECE in the first larval stage (L1) at concentrations of 5µg / mL, 25µg / mL, 50µg / mL, 250µg / mL, for the determination of survival. To evaluate a possible stress-resistance, the nematodes were treated with Paraquat (0.5 mM) and Hydrogen Peroxide (H₂O₂ 1 mM) following treatment with the extract. The results of this study allowed us to observe that the acute exposure to the different concentrations of the aqueous extract of *C. speciosa* stem bark did not alter the survival rate nor the reproduction of *C. elegans*. The extract showed free radical scavenging activity in vitro, due to the large amount of phenolic compounds present in the extract. However, in vivo, it was not able to protect the nematodes against the toxicity induced by pro-oxidants (paraquat and H₂O₂). In addition, the aqueous extracts of *C. speciosa* stem bark alone did not have the capacity to reduce lipid accumulation or reduce triacylglyceride levels, nor did it affect pharyngeal beats. In particular, the extract protected against induced glucose damage, since treated animals had increased longevity that had been reduced by glucose. However, the glucose-induced accumulation of lipids was not diminished by treatment with the extracts. Despite the preliminary results, we believe that the extract is promising for further studies in relation to the hyperglycemia model in *C. elegans*.

Key words: Antioxidant activity, *Caenorhabditis elegans*, *Ceiba speciosa*, lipid accumulation.

Introduction

Oxidative stress has been associated as the main factor for the etiology of several diseases related to aging (Wallace & Melov, 1998) and occurs when there is an imbalance between the production of reactive oxygen/nitrogen species (ROS / RNS) and the antioxidant defense system is in favor of the pro-oxidative side. Excess ROS damages important cellular macromolecules such as lipids, proteins and DNA (Finkel & Holbrook, 2000) and leads to loss of cell integrity and functionality.

Thus, the antioxidant properties of plants present a wide range of promising applications in human health (Pietrovski *et al.*, 2006). On the other hand, the indiscriminate use of natural products has led to cases of intoxication (Boubaker *et al.*, 2013). Therefore, a safety assessment of the use of natural products should be previously performed.

With the growing interest in finding natural antioxidants, especially of vegetable origin, to be used in the treatment of various human diseases, many extracts from different plants and from different parts have been tested (Surveswaran *et al.*, 2010). The scientific literature describes several medicinal activities for several species of the genus *Ceiba*, among them the studies with *Ceiba glaziovii* popularly known as “*barriguda*” belonging to the family *Malvaceae*. For instance, a study conducted by Leal *et al.*, 2010, presented a considerable variety of secondary compounds and antimicrobial activity for strains of *Staphylococcus aureus* which may be related to the presence of chemical compounds such as tannins and phenols. In addition, *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn, commonly known as silk cotton tree, have been widely used by practitioners of traditional medicine in Northern and Eastern Nigeria in

controlling diabetes.

In this context, *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.), which belongs to the *Malvaceae* family (Carneiro *et al.*, 2000) has been widely used by the southern Brazilian population. The species is found in the Northwest of Rio Grande do Sul, being native in the Upper Uruguay forest (Cappelatti *et al.*, 2009). As for its use in folk medicine, there are records against heart disease and hypertension, and the parts used are shells and flowers (Lucena *et al.*, 2008). With the increasing interest in the bioprospection of natural products, especially of vegetal material originating from the *Bioma Pampa*, the validation and application of alternative models for the evaluation of these species becomes relevant.

Several animal models have been used to investigate the toxicology and pharmacology of medicinal plants. The nematode *C. elegans* has a number of characteristics that make it not only relevant but quite powerful as a model for this type of research (An and Blackwell, 2003). First of all, *C. elegans* is easy and cheap to keep in the laboratory with an *Escherichia coli* diet. Hermaphrodite has a short reproductive cycle (3 days) and a large number (300) of descendants which allow the large-scale production of animals within a short period of time. The transparent body also allows a clear observation of all cells in mature and developing animals. *C. elegans* shows a strong conservation in molecular and cellular pathways with respect to mammals, and the comparison between human and *C. elegans* genomes confirmed that most human genes and molecular pathways are present in the worm (Gonzalez-Manzano *et al.*, 2012), including those related to glucose and lipid metabolism (Cappelatti *et al.*, 2009). Notably, the worm does not have specialized tissue storage and the energetic excess is stored in the enterocytes, cells of the hypodermis and gônads (Ashrafi, 2007). The absence of adipocytes removes central

components in the control of energetic metabolism in mammals. However, this condition may be advantageous by facilitating the interpretation of other conserved factors and mechanisms involved in energy homeostasis (Ashrafi *et al.*, 2003).

Thus, this study aimed to evaluate the safety of the aqueous extract from the bark of *Ceiba speciosa* (ECE) as well as and to confirm putative biological actions attributed to this plant using *Caenorhabditis elegans* as a model.

2. Materials and methods:

2.1 Preparation of Extract:

The stem bark of *C. speciosa* was collected in the interior of the municipality of Santo Antônio das Missões, Rio Grande do Sul, in April 2012. The plant material was identified by a botanist and an exsicata was deposited in the Museum's RSPF Zoobotanic Herbarium Augusto Ruschi at the University of Passo Fundo (RS), under the code RSPF 12637. *C. speciosa* peels were ground and the aqueous extract was prepared by decoction in distilled water, with periodic stirring, maintaining the temperature between 90°C -100°C until boiling. Soon after the extract was filtered and the collected liquid was dried by lyophilization and a 10 mg/mL solution (in water) was prepared. Phytochemical analysis of these extracts has been previously determined by (Kruguer *et al.*, 2014).

2.2 In vitro assays

2.2.1 DPPH assay: The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay was used for the determination of antioxidant capacity, based on its ability to reduce the DPPH radical (Brand-Willians *et al.*, 1995). This reducing

ability of the sample is determined by reducing the absorbance (515-528 nm) of the radical for 30 minutes in CH₃OH. The curve was compared to that of ascorbic acid and an IC 50 was determined. Results were expressed in mg equivalent of gallic acid (EAG)/5g.

2.2.2 Determination of Phenolic Compounds: The total phenolic compound content was measured in triplicate for each extract concentration, according to the method of Swain and Hills, 1959, using the Folin-Ciocalteu reagent and using gallic acid as the standard. The results are expressed in µg of gallic acid equivalent mg/(EAG)/µl.

2.3 In vivo and ex vivo assays

2.3.1 Maintenance of *Caenorhabditis elegans*:

The strains of *C. elegans* N2 (wild type), RB 1600 (*tub-1(ok1972)*) and VS29 (VHA-6p :: GFP DGAT-2) were obtained from Caenorhabditis Genetics Center (CGC) and maintained in NGM (nematode growth Medium) seeded with *E. coli* OP50 bacteria at 20° C (Brenner, 1974). In the L1 phase, used in all exposures, a synchronization process was performed, which consists of exposing pregnant worms to the lysis solution (0.45 N NaOH, 2% HOCl p / v) to separate the eggs from the worms. After 14 h the eggs hatched and released the L1 larvae.

2.3.2 Synchronization

Synchronization was performed through alkaline lysis. This method is based on the treatment of adult pregnant hermaphrodites with lysis solution (50% sodium hypochlorite, 0.25 M NaOH) With constant stirring for 6 min. Embryos resistant to this treatment were collected and placed in M9 liquid medium overnight in the absence of food. This allows the eggs to hatch, releasing the larva at L1 stage. All experiments were performed at 22°C in a controlled humidified environment.

2.3.3 Survival

A total of 2,000 L1-stage nematodes were exposed to different concentrations of *C. speciosa* bark extract (ECE- 5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL and 250 µg/mL) for 30 min at 22°C, in a homogenizer. After treatment, the nematodes were washed with 85mM NaCl solution for 3 times in order to terminate the exposure and the nematodes were plated on NGM medium seeded with *E. coli* OP50. Twenty-four hours after exposure, the numbers of surviving nematodes were counted and a survival curve was drawn (Avila *et al.*, 2008).

2.3.4 Brood Size

The nematodes were treated as described above and were maintained on NGM / OP50 plates until they reached larval stage L4. To evaluate litter size, one nematode from each treatment with the ECE was transferred to a new plate containing NGM medium, and for 3 consecutive days the total number of progeny was counted (Guo *et al.*, 2009). Data were expressed as µg/mL of the control. The experiments were performed in duplicates.

2.3.5 Pharyngeal Pumping

This assay is used to ascertain the dietary intake of the nematode. After the treatment described previously, 5 nematodes from each experiment, at the L3 stage, were transferred to new plates without bacteria. The pharyngeal beats were counted for 1 min, observed in the stereomicroscope, at the highest magnification (80x) (David *et al.*, 2012).

2.3.6 Oxidative stress- resistance

Nematodes were pretreated at the L1 stage as described previously. After the last wash, worms were post-treated with the pro-oxidants paraquat (0.5mM) or hydrogen peroxide (1mM) for 30min. Subsequently, nematodes were washed

four more times, then plated with NGM / OP50 medium. The number of surviving nematodes on each plate after 24 h post-exposure was scored to determine stress resistance (An & Blackwell, 2003).

2.3.7 Protection against Glucose toxicity

First of all, we have tested 2 glucose concentrations to verify whether they would change worms lifespan. Worms were exposed to glucose at 4% for 20 days. Glucose was added to the plates containing the NGM medium and inoculated *E. coli*/ OP50. 100µl of glucose solution was added on top of the dried *E. coli*, and soon after glucose was dried, 20 worms were transferred. To further determine the resistance to glucose 4%, worms were pre-treated with different concentrations of the extract (ECE 5 µg/mL or 250 µg/mL) for 30 min. After 48 hours of treatment with the extract, 20 worms were transferred to new plates containing the NGM medium with or without glucose (I-Control, II- 4% glucose, III- glucose + ECE 5 µg/mL and IV- glucose + ECE 250 µg/mL). Worms were scored and live ones were transferred to new plates until the last worm died.

2.3.8 Glucose-induced lipid-accumulation

The nematodes were treated as described above and L1 worms were treated with the lowest (5 µg / mL) or the highest (250 µg/ml) ECE concentrations, being kept on NGM / OP50 plates containing or not glucose until reaching the larval stage L4. After these 48 hours of treatment, images were acquired in a fluorescent microscope to observe the effect of glucose concentration on *C. elegans* (N2 and VS29 strains). VS29 has a transgene where DGAT2 (acyl CoA:diacylglycerol O-acyltransferase 2) is fused to GFP. This enzyme transfer acyl groups and is localized in the lipid particles, then lipid droplets can be observed. N2 was used as control for lipofuscin or autofluorescence caused by

glucose treatment.

2.3.9 Lipid-reducing effect of *C. speciosa* extracts (triglyceride levels)

The lipid content was quantified by measuring the triacylglycerol content. Worms (N2 and *tub-1*) were treated with ECE at the L1 stage and incubated at 22 °C on inactivated *E. coli* OP50-seeded NGM plates until they reached the L4 stage. After these 48 h, worms were washed off from the plates and centrifuged at 2500 rpm for 2 min. Worms were washed until removing all existing bacteria. Then, worms were frozen twice, sonicated and centrifuged. The supernatant (50 µL) was transferred to a 96-well plate and triacylglycerol assay was assessed using a BioVision triglyceride assay kit (Mountain view, USA). The optical density of each of the incubated samples (10 min at 37 °C) was measured at 500 nm. For normalization of the data, protein was measured using Bradford colorimetric method.

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc Tukey test when the overall p value was < 0.05. For lifespan assay, a repeated measures analysis (MANOVA) was applied.

3. RESULTS

3.1 In vitro analysis

C. speciosa extract has a significant amount of phenolic compounds, which are possibly responsible for the DPPH radical scavenging activity observed (Table 1).

Table 1: Antioxidant activity (EC50), total phenol content.

	DPPH	
	EC50	Phenolic Compounds
	$\mu\text{M/gDPPH}$	mg EAG/ μL
<u>Extract</u> <u>Ceiba speciosa</u>	0,150477	2927,115

3.2 Toxicity evaluation of aqueous extract of *C. speciosa*:

Figure 1A shows that acute exposure to different concentrations of the aqueous ECE did not alter the survival rate of *C. elegans* (up to 250 $\mu\text{g/mL}$), thus suggesting that no toxic effects occurred under the experimental conditions tested (acute). Therefore, we decided to further use the concentrations of 5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ and 250 $\mu\text{g/mL}$ for further assays. In Figure 1B we can observe the brood size (reproduction endpoint), where the concentrations tested did not alter this parameter when compared to the untreated control. In addition, we did not find any toxic effect of *C. speciosa* bark. In order to verify whether the aqueous extract from *C. speciosa* bark would affect food ingestion *per se*, we observed pharyngeal pumping. ECE did not affect the pumping of the pharynx, and hence, it does not diminish food ingestion (Figure 1C).

A)

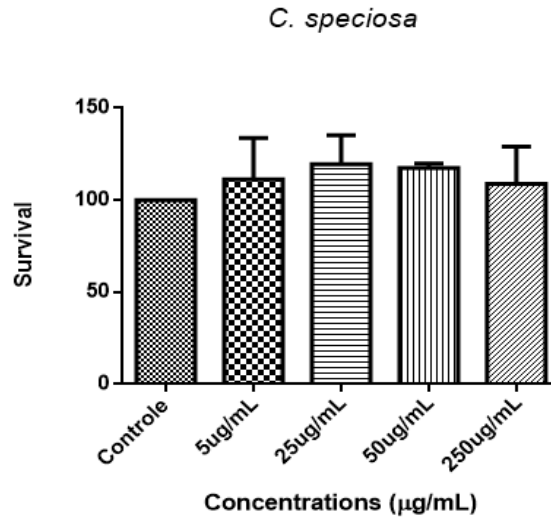


Fig 1 A): Survival of nematodes against different concentrations of *C. speciosa* aqueous extract. Data expressed as mean \pm SEM. The control group was considered 100%.

B)

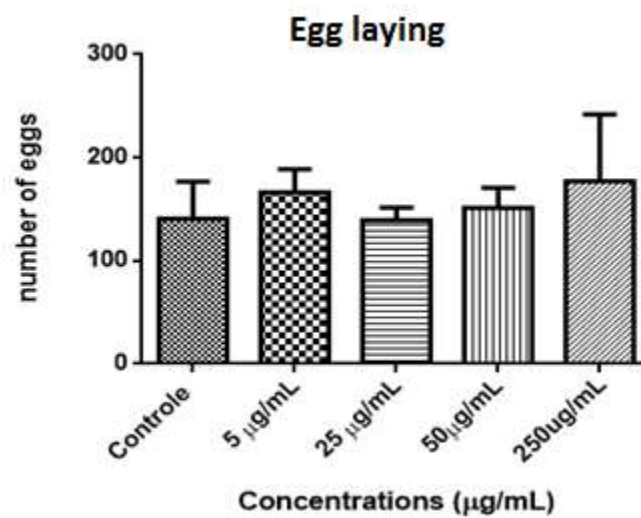


Fig 1 B): Egg Laying of the nematodes treated with the aqueous extract of *C. speciosa*. Data expressed as mean \pm SEM.

C)

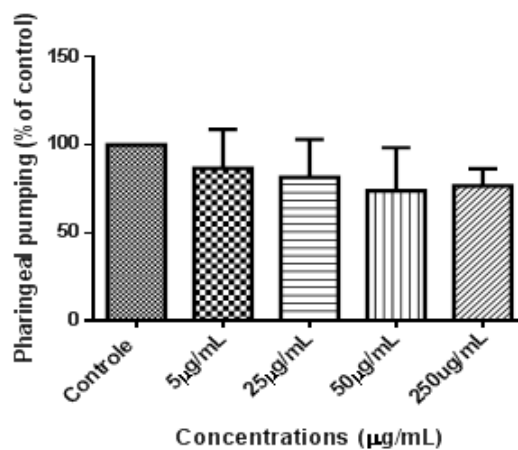


Fig 1 C): Pharyngeal pumping of nematodes treated with aqueous extract of *C. speciosa* bark. Data expressed as mean \pm SEM and One-way ANOVA was performed. The control group was considered as 100%.

3.2 Stress Resistance:

In order to verify a possible stress-resistance conferred by ECE we exposed worms to different pro-oxidants: paraquat (a pesticide- Fig 2A) and hydrogen peroxide (H₂O₂- Fig 2B). The results showed that ECE did not protect against the damage induced by these pro-oxidants at the concentrations tested.

A)

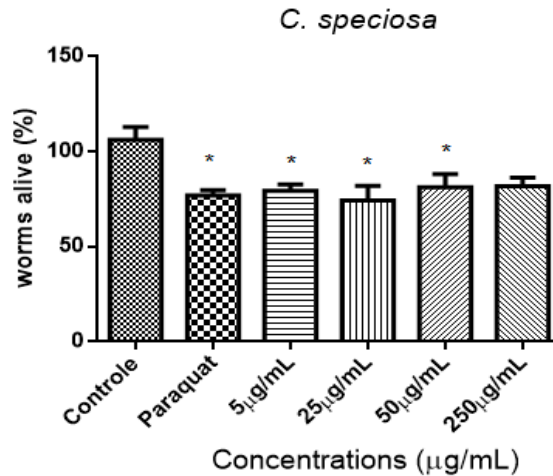


Fig. 2 A) : Response to oxidative stress in paraquat post-treated nematodes (0.5mM) and pre-treated with ECE. Data expressed as mean \pm SEM. The control group was considered 100%. One way ANOVA was performed, followed by Tukey post hoc test.* Indicates $p < 0.05$ compared to the control group.

B)

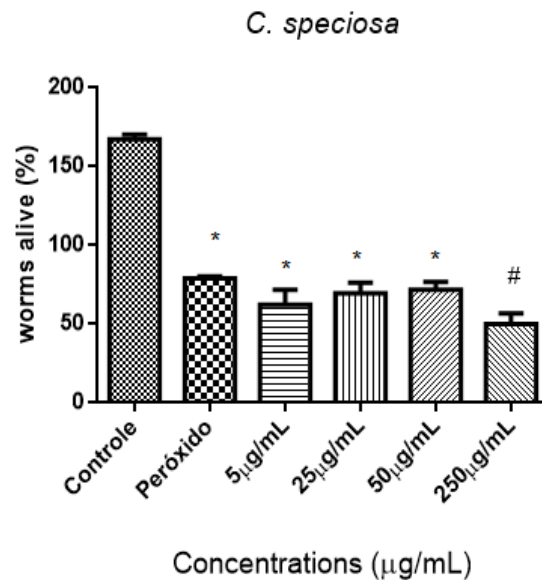


Fig. 2 B): Response to oxidative stress in post-H₂O₂ treated nematodes (1 mM) and pre-treated with the ECE. Data expressed as mean \pm SEM. The control group was considered 100%. One way ANOVA was performed, followed by Tukey post hoc test. * Indicates $p < 0.05$ compared to the control group. # Indicates $p < 0.05$ compared to peroxide group.

3.3 Protection against Glucose toxicity

In order to verify the protection of ECE treatment against glucose toxicity, we analyzed lifespan and we observed that the extract protected worms from glucose-induced reduced lifespan (Figure 3).

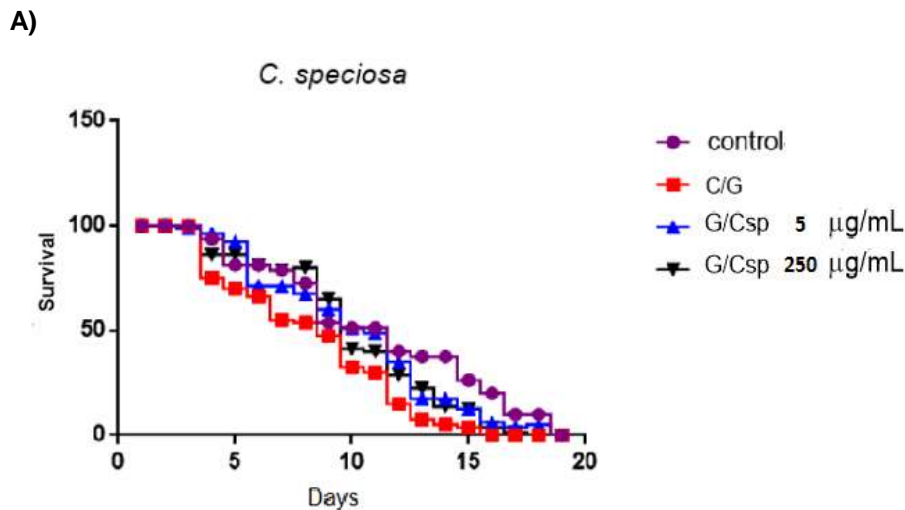


Fig 3: Effect of *C. speciosa* on glucose- induced toxicity. Data expressed as mean \pm SEM. The control group was considered 100%. MANOVA was used to analyze the difference among the curves.

3.4 Glucose-induced lipid-accumulation

By taking advantage of a GFP-tagged strain, we observed lipid accumulation- induced by glucose and the ECE effects on this parameter. First of all, we analyzed wild type fluorescence following treatments and we have observed that no significant change occurred (Figure 4). However, VS29 worms depicted a strong fluorescence around the gut following by glucose treatment, probably by the lipids surrounding it. ECE treatment at the low and the high concentrations did not reduce lipid accumulation, as indicated by GFP fluorescence (Figure 5).

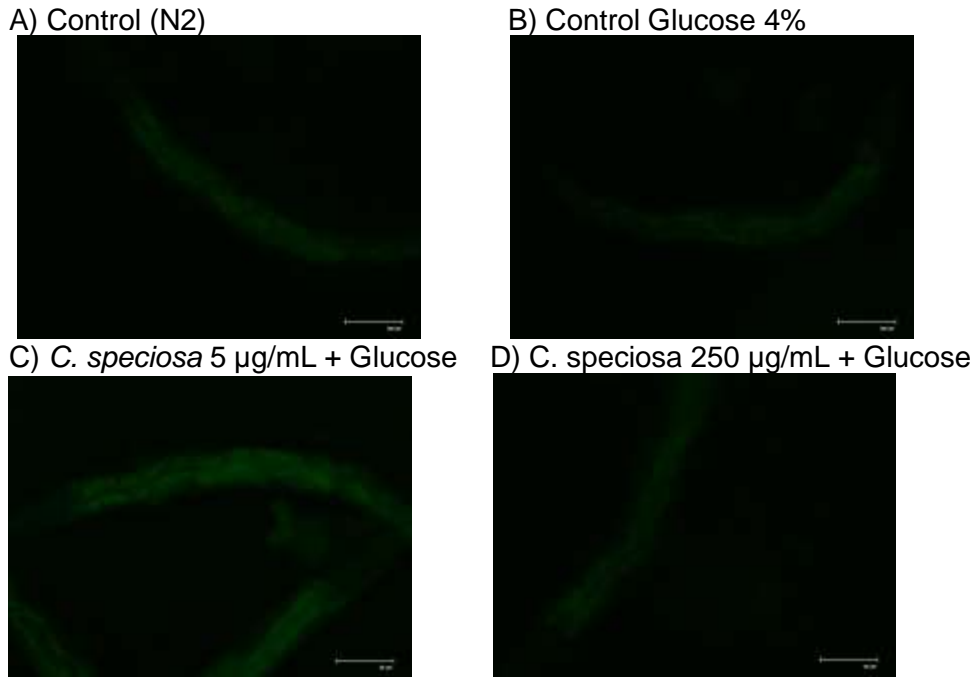


Figure 4: Representative images of the fluorescence in wildtype *C. elegans* (N2) following treatment with ECE (A) untreated worms (B) glucose 4%; (C) ECE 5 µg/mL + 4% glucose; (D) ECE 250 µg/mL + 4% glucose

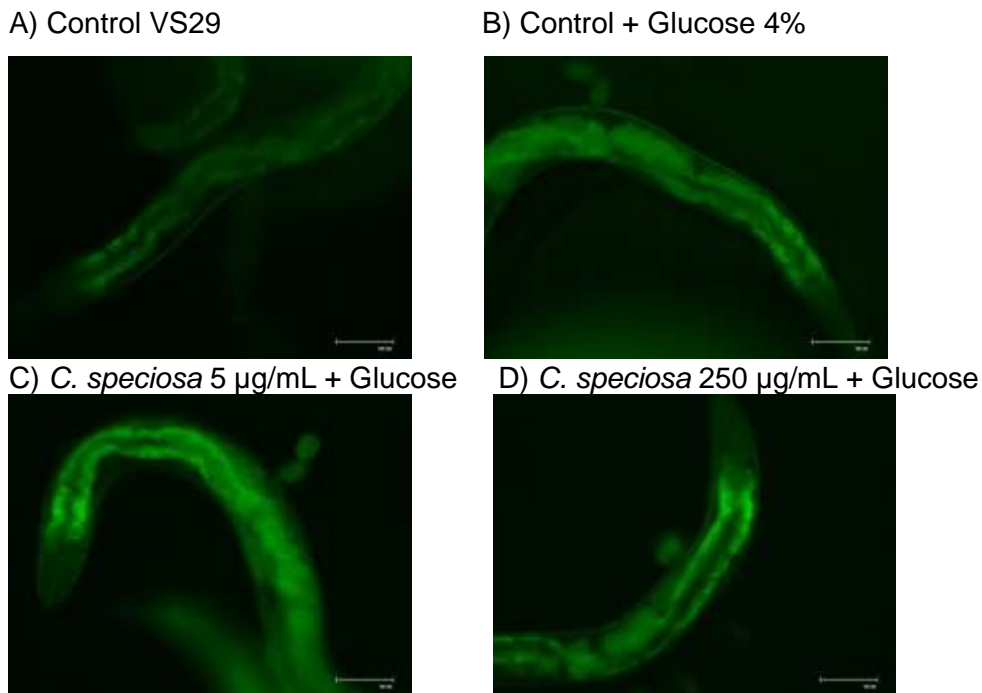
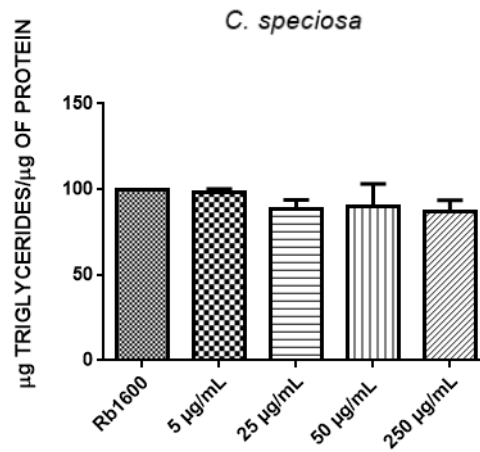


Figure 5: Representative images of the fluorescent VS29 worms following ECE treatment (A) untreated worms (B) glucose 4%; (C) ECE 5 µg/mL + 4% glucose; (D) ECE 250 µg/mL + 4% glucose

3.5 TGs levels

Fig 6: A shows that ECE was not able to reduce triglyceride levels in both wildtype (A) and *tub-1* (obese worms- B).

A)



B)

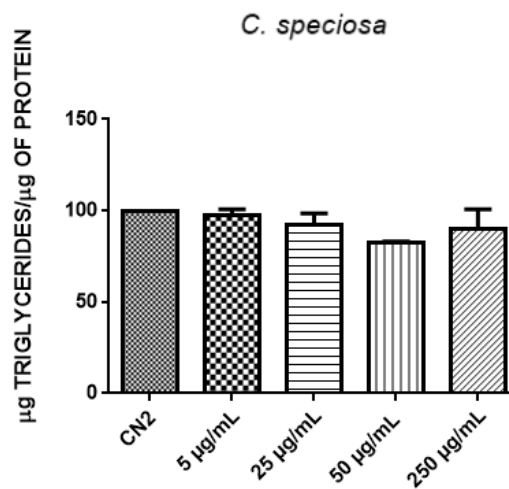


Figure 6: Determination of the triglyceride levels following ECE treatment for 48h in A) N2; B) *tub-1*. Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by One-way ANOVA.

DISCUSSION

In the present work the pharmacological activity of the aqueous bark extract of *C. speciosa* was studied, since little scientific knowledge about its effects are described in the literature. The consumption of this plant, which occurs in the Northwest region of the State of Rio Grande do Sul, is in the form of a tea and various effects have been attributed by the consumers, such as lowering cholesterol, triglycerides and glucose levels. Thus, this study aimed to evaluate antioxidant and metabolic effects of *Ceiba speciosa* bark aqueous extract and also aspects related to its safety, in order to bring the population information regarding its efficacy and toxicity. One of the main findings of our study was that ECE protected against the glucose-induced toxicity, since both concentrations kept the nematodes alive throughout the days.

In relation to the reduction of the DPPH radical, ECE obtained a fair scavenger potential when compared with ascorbic acid. In addition, we detected a great amount of total phenolic compounds. Phenolic compounds of plants fall into several categories, such as simple phenols, phenolic acids (derived from benzoic and cinnamic acids), coumarins, flavonoids, stilbenes, condensed and hydrolysable tannins, lignans and lignins, which have radical scavenger activity (Naczki *et al.*, 2004). DPPH is the common and frequently adopted method for the determination of the antioxidant activity of plant extracts (Yesmin *et al.*, 2008). Different studies state that *Bombax ceiba* contains many compounds, including lupeol, P-sitosterol and shamimycin with potent antioxidant activities (You *et al.*, 2003). Thus, these compounds may be responsible for the excellent elimination activity of the extract. These effects are in agreement with the study carried out by (Shyur *et al.*, 2005), in which the whole plant extracts of *B. ceiba* showed greater elimination activity against DPPH than the others, with an IC 50

value of 68 µg / ml. In another work done by (Zahan *et al.*, 2013) of *B. ceiba* bark methanolic extract showed adequate scavenger activity.

According to the studies carried out by (Malheiros *et al.*, 2014) the analysis was performed by HPLC / DAD, aiming the quantification of the main phenolic and flavonoid substances. These compounds represent one of the most occurring phytochemical classes in plants, since they play a protective role against pathogens and predators. In humans, they are known to perform several physiological actions as antifungal and anti-inflammatory, with antioxidant activity being one of the main ones (Ayala-Zavala *et al.*, 2012). Analysis by HPLC revealed that flavonoids (quercetin, rutin, and canferol) and phenolic acids (gallic, chlorogenic, ellagic and caffeic) are present in both. The concentrations found for each of the phenolic compounds shows that most are in higher concentrations in EALCs. The only exception is quercetin, found in greater amounts in Cs1 (Malheiros *et al.*, 2014).

Através da correlação feita entre os resultados *in vitro* observados neste estudo, é possível observar que um promissor potencial antioxidante está presente nos extratos de *Ceiba speciosa*. Estas ações podem ser justificadas pelo alto teor de flavonoides e polifenóis totais demonstrado no resultado das análises, uma vez que sabidamente os compostos fenólicos representam os constituintes responsáveis pelo potencial antioxidante de produtos naturais (Krishnaveni *et al.*, 2013; Loganayaki *et al.*, 2013),

In order to verify the *in vivo* antioxidant capacity of the aqueous extract of *C. speciosa* bark, we tested it against two pro-oxidants, paraquat, at a concentration of 0.5 mM, which significantly increased nematode mortality. Paraquat is an herbicide widely used in agriculture, but its biochemical mechanism responsible for its toxicity is not fully understood. However, it is

known that paraquat is a superoxide radical generator ($O_2\bullet$), which can generate other reactive species such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\bullet OH$), which are unstable and react quickly with fatty acids, causing lesions in the membranes, proteins and DNA. The ($O_2\bullet$) can be detoxified by the action of the enzyme superoxide dismutase (SOD), producing hydrogen peroxide. This formed product is removed through the enzyme catalase. However, SOD can be suppressed by the large amount of superoxide that is produced when there are high doses of paraquat. Thus, superoxide anions undergo a non-enzymatic dismutation reaction, forming singlet oxygen, which attacks the unsaturated lipids of cell membranes, and gives rise to lipid free radicals that spontaneously generate peroxy lipid radicals (Bus *et al.*, 1975, Peter *et al.*, 1992).

Hydrogen peroxide (H_2O_2), at the concentration of 1 mM, significantly increased nematode mortality, and the extract also did not reduce the toxicity induced by this reactive species. Hydrogen peroxide is one of the most versatile oxidants in existence, superior to chlorine, chlorine dioxide and potassium permanganate; through catalysis, H_2O_2 can be converted to hydroxyl radical ($\bullet OH$). It is a potent pro-oxidant, generated physiologically, easily passing through cell membranes.

The *C. elegans* nematodes are free living, easy to handle and have great homology with mammals, as well as having the ability to synthesize saturated and unsaturated fatty acids, are capable of storing energy in the form of lipids. Recently, it has been found that most lipid species in *C. elegans* (triglycerides, phospholipids, sphingolipids, etc.) are composed of fatty acids directly absorbed from the bacterial food source (Houthoofd *et al.*, 2002). Up to 35% of the dry body mass of *C. elegans* is lipids, and triglyceride fat deposits (~ 40-55% of

total lipids) are the major energy storage molecules depending on diet and stage of growth (Ashrafi *et al.*, 2003). Because of that, this model is adequate to investigate lipid reducing effects of molecules and plant extracts. In this study, we observed that the treatment with ECE did not reduce the levels of triglycerides. This is agreement with a previous study by (Thiane *et al.*, 2017) where ECE did not reduce TG levels in rats treated with the hypercholesterolemic agent tyloxapol. In addition, we have observed that glucose administration also caused increased lipid accumulation in worms (Figure 6B), however the ECE treatment did not reduce lipid levels, thus corroborating to the lack of effects on reducing TG levels in obese worms.

On the other hand, we have found promising results when we treated worms intoxicated with glucose. ECE was able to protect from the reduced longevity induced by glucose 4%. Notably, the study of Thiane *et al.*, 2017 demonstrated that rats treated with lyophilized aqueous extract of *C. speciosa* (200mg/kg) depicted a significant decrease in glucose levels in the group in relation to the hypercholesterolemia group. It has been reported that *C. pentandra*, a species taxonomically related to *C. speciosa* which is commonly used in North Africa, has been used to control hyperglycemia in diabetic patients. Its alcoholic extract has been tested in rats and it has been proven that besides safe, it causes a decrease in plasma glucose levels following oral administration (Doloui *et al.*, 2011). In addition, the alcoholic extract of *C. pentandra* also showed to have antidiabetic, anti-inflammatory and antibacterial activity (Bairwa *et al.*, 2010, Ladeji *et al.*, 2003; Satyaprakash *et al.*, 2013). At moderate concentrations it exerts both hypoglycemic and hypolipidemic effects in diabetic mice induced by alloxan, thus demonstrating that it can be used for the treatment of diabetes and its associated complications such as coronary diseases (Elumalai *et al.*, 2012).

C. elegans, contains many key metabolic-related components such as oxidative stress and insulin signaling pathway, making it a useful system to improve our understanding of complex diseases such as diabetes (Schlotterer *et al.*, 2009). Diabetes mellitus is a metabolic disorder that affects millions of people around the world and contributes considerably to the overall mortality rate (Kumar *et al.*, 2012). Glucose, as the main energy source and key regulator of metabolism, induces pancreatic B cells to secrete insulin, which in turn facilitates the transport of glucose to tissues such as muscle and adipose tissue. However, a chronic abundance of glucose or fructose will have deleterious effects on cellular and tissue functions and has been associated with various disorders, including type II diabetes, obesity and cardiac dysfunction (Garcia *et al.*, 2015).

Finally, we observed that the acute exposure in the different concentrations of the aqueous extract of *C. speciosa* bark did not alter the survival rate of the worms, nor did it affect the pharyngeal beats at the different concentrations of the extract. These findings show that the worms were actually ingesting the extract and feeding normally, suggesting that the use of these tested concentrations are safe considering the experimental conditions tested.

Because it is a plant widely used in the northwest of the state of Rio Grande do Sul, it is very relevant the finding indicating the safety of its use. Our findings corroborate to a previous study of Malheiros *et al.*, 2014, since doses that did not present toxicity in rats are within the dose range that presents of biological action in humans.

Thus, it can be considered that the bark aqueous extract of *C. speciosa* has low toxicity and has potential against glucose toxicity, thus suggesting that ECE may be useful against hyperglycemia. Therefore more studies will be carried out

by our group with the purpose of deepening the studies on the hypoglycemic effects of *C. speciosa* and its mechanisms using *C. elegans* as animal model

6. References

AN, J.; BLACKWELL, K. SKN-1 links *C.elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & Development**. v.17, p.1882-1893: 2003.

ASHRAFI K. Obesity and the regulation of fat metabolism. **WormBook**. Mar 9:1- 20,2007.

AVILA, D.; HELMCKE, K.; ASCHNER, M. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. **Hum Exp Toxicol**, 2008.

BAIRWA, K. N.; SETHIYA, K. N.; MISHRA, S. H. Efeito protetor da casca do caule de *Ceiba pentandra* linn. contra paracetamol hepatotoxicidade induzida em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, p, 26-30, 2010.

CAPPELATTI, L.;SCHMITT, L. J.; Caracterização da flora arbórea de um fragmento urbano de floresta estacional semidecidual no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, botânica** Nº 60:341-354 São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, 2009.

CARNEIRO, ELIANA BLESKI; SUGUI, JANYCE A; REICHER, FANY; Structural and biological features of a hydrogel from seed coats of *Chorisia speciosa*, **Phytochemistry** 61, 157–163, 2000.

DAVID RAIZEN; BO-MI SONG; NICK TROJANOWSKI; YOUNG-JAI YOU **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, **WormBook**,doi/10.1895/wormbook.1.154.1, 30 abril 2012. 45

ELUMALAI, A.; NIKHITHA, M.; ADARSH, D.; RAJU, K.; YETCHARLA, V.; **A Review on Ceiba pentandra and its medicinal features.** Asian Pharma press Tech. Vol. 2(3), P.83-86. July-Sept. 2012.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

GARCIA, S. M., CASTRO, R. M., CARDOSO, E. N.G., CASTRO, P. N. Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxylla*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p.1-7, 2015.

GUO Y., YANG Y., WANG D. Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. **Reprod Toxicol**; 28:90-5, 2009.

LADEJI O., OMEKARAH, I.; SOLOMON, M.. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 84, p. 139-142, 2003.

LUCENA, R. F. P.; NASCIMENTO, V. T.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Local uses of native plants in area of caatinga vegetation Pernambuco - NE, Brazil. **Ethnobotany Research and Applications**, Países Baixos, v. 6, p. 3-13, 2008.

KUMAR, A.B.S., LAKSHMAN, K., JAYAVEEA, K.N., SHEKAR, S.D., KHAN, S., THIPPESWAMY, B.S., VEERAPUR, V.P. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 1-2, p.75-79, jan. 2012. 46

MALHEIROS, C. K. C. Avaliação preliminar in vitro do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (a. st.-hill) Ravenna (paineira). 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; J. **Chromatogr.**, 1054, 95, 2004.

PIETROVSKY, E.F.; POSA, KA.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihidroxilup-20(29)ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol.Biochem.Behav.** 83:90-99, 2006.

SHYUR LF, TSUNG JH, CHEN JH, CHIU CY, Lo CP. **Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan.** **Int. J. Appl. Sci. Eng.** 2005

SURVESWARAN, S.; CAI, YZ.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. Antioxidant properties and principal phenolic phytochemicals of Indian medicinal plants from asclepiadoideae and periplocoideae. **Nat.Prod.Res.** 24:206-221, 2010.

SATYAPRAKASH, R.J., RAJESH, M. S., BHANUMATHY, M., HARISH M. S., SHIVANANDA T. N., SHIVAPRASAD, H. N., SUSHMA G. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Ceiba pentandra* L. Gaertn in normal and streptozotocininduced diabetic rats. **Ghana Medical Journal, Bengaluru, Karnataka, India**, v. 47, n. 3, p.121-127, set. 2013.

THIANE M. S. **Cascas de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna em ratos.** 2017.

WALLACE, D.C.; MELOV, S. **Radicals r`aging.** **Nature Genetics**, v. 19, n. 2, p.105- 106, 1998. 47

YESMIN N, UDDIN SN, MUBASSARA S, AKOND MA. **Antioxidant and Antibacterial Activities of *Calotropis procera* Linn.** American-Eurasian J. Agric, Environ. Sci. 2008.

YOU YJ, NAM NH, KIM Y, AHN BZ. **Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba* stem bark.** Phytother Res. 2003;

CONCLUSÃO

Em conclusão, observou-se que o extrato aquoso da casca de *Ceiba speciosa*, possui uma atividade antioxidante, também apresentou uma capacidade de proteção a toxicidade induzida pela glicose, reforçando a necessidade de investigação mais profunda desta atividade. Considerando o uso popular da *Ceiba speciosa* por indivíduos saudáveis com o objetivo de evitar o aumento do colesterol sanguíneo ou diminuir o mesmo em indivíduos com os índices altos, o presente trabalho sugere que a espécie não é capaz de exercer tal efeito. Porém não ocorreu redução dos níveis de triglicérides, mas o extrato não afetou a reprodução dos nematóides *Caenorhabditis elegans* e nem os batimentos da faringe.

Contudo, a *Ceiba speciosa* não esgota um forte potencial para o desenvolvimento de pesquisas em nosso grupo, e terá continuidade à investigação da espécie quanto a sua constituição toxicológica e seu potencial farmacológico. Com isso, será possível obter novos dados sobre a toxicologia do gênero *Ceiba*, verificar a eficácia do extrato aquoso da espécie no tratamento da hipoglicemia e avaliar a segurança do consumo da decocção das cascas de *C. speciosa*.

PARTE TRÊS

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, observou-se que o extrato aquoso da casca de *Ceiba speciosa*, possui uma atividade antioxidante, também apresentou uma capacidade de proteção a toxicidade induzida pela glicose, reforçando a necessidade de investigação mais profunda desta atividade. Considerando o uso popular da *Ceiba speciosa* por indivíduos saudáveis com o objetivo de evitar o aumento do colesterol sanguíneo ou diminuir o mesmo em indivíduos com os índices altos, o presente trabalho sugere que a espécie não é capaz de exercer tal efeito. Porém não ocorreu redução dos níveis de triglicérides, mas o extrato não afetou a reprodução dos nematóides *Caenorhabditis elegans* e nem os batimentos da faringe.

Contudo, a *Ceiba speciosa* não esgota um forte potencial para o desenvolvimento de pesquisas em nosso grupo, e terá continuidade à investigação da espécie quanto a sua constituição toxicológica e seu potencial farmacológico. Com isso, será possível obter novos dados sobre a toxicologia do gênero *Ceiba*, verificar a eficácia do extrato aquoso da espécie no tratamento da hipoglicemia e avaliar a segurança do consumo da decocção das cascas de *C. speciosa*.

7. PERSPECTIVAS

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

- Terá continuidade à investigação da espécie quanto a sua constituição toxicológica e seu potencial farmacológico. Com isso, será possível obter novos dados sobre a toxicologia do gênero *Ceiba*.

- Verificar a eficácia do extrato aquoso da espécie no tratamento da hipoglicemia e avaliar a segurança do consumo da decocção das cascas de *C. speciosa*.

Referências

AITLHADJ, L.; AVILA, D.S.; BENEDETTO, A.; ASCHNER, M. Parkinson's disease: lessons from fat and old worms. *Environmental Health Perspectives*, **119:20-28, 2011.**

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semiarid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 325–354, 2007.

ANNUNCIADO, T. R. Estudo da *Chorisia speciosa* e outras fibras vegetais como sorventes para o setor de petróleo. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 2005.

ASHRAFI K. Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook*. Mar 9:1-20,2007.

ASHRAFI K. Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook*. Mar 9:1-20,2003.

ASHRAFI K. Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook*. 2007 Mar 9:1-20.

AVILA, D.; HELMCKE, K.; ASCHNER, M. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. **Hum Exp Toxicol**, 2010.

BAIRWA, K. N.; SETHIYA, K. N.; MISHRA, S. H. Efeito protetor da casca do caule de *Ceiba pentandra* linn. contra paracetamol hepatotoxicidade induzida em ratos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 2, p, 26-30, 2010. 51

BARA, R. P. Aplicação de materiais sorventes alternativos para a limpeza de águas contaminadas por óleos. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 2011.

BARBOSA, K. B. F. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr*, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. May;77(1):71-9, 1974.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. v.131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, J. E. U.; NAZARÉ, R. F. R.; OLIVEIRA, W. M. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 25, p. 326- 328, 2003.

ELUMALAI, A.; NIKHITHA, M.; ADARSH, D.; RAJU, K.; YETCHARLA, V.; A Review on *Ceiba pentandra* and its medicinal features. *Asian Pharma pess Tech*. Vol. 2(3), P.83-86. July-Sept. 2012.

FERRAZ, S.L.; Kedma, T.; SILVA, C.P.; GREGORIO, A.; BATISTA, G.; AZEVEDO, J.; GALDINO, N.M.R. Ministrando palestras e oficinas de plantas medicinais na comunidade do Curado, 18 a 22 de outubro 2010.

FERREIRA, T. R. Sorção de petróleo por fibras vegetais. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual do Rio Grande do Norte. Natal-RN. 2009.

GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Rev Nutr, Campinas*, v.20, n.5, p.537-548, 2007.

LADEJI O., OMEKARAH, I.; SOLOMON, M.. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 84, p. 139-142, 2003.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. Universidade Estadual de Roraima – UERR. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, 1(1):19-27. 2006.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa. São Paulo: Ed. Plantarum, 1998.

M. KUMAR, S. NATH, H. K. PRASAD, G. D. Sharma and Y. Li, Protein Cell, 2012.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; V.F. VEIGA. JR.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, C. K. C. Avaliação preliminar in vitro do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (a. st.-hill) Ravenna (paineira). 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, 2014.

MÖRCK C, OLSEN L, KURTH C, PERSSON A, STORM NJ, SVENSSON E, JANSSON JO, HELLQVIST M, ENEJDER A, FAERGEMAN NJ, PILON M. Statins inhibit protein lipidation and induce the unfolded protein response in the non-sterol producing nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Oct 27;106(43):18285-90. Epub 2009 Oct 13.

MULLANEY BC, ASHRAFI K. C. elegans fat storage and metabolic regulation. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;1791(6):474-8. Epub 2009 Jan 3. 53

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; J. Chromatogr., 1054, 95, 2004.

NASSER, A.L.M. et al. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. Rev Ciênc Farm Básica Apl, v. 32, n. 2, p. 275-279, 2011.

OLIVEIRA, F.C., ALBUQUERQUE, U.P., FONSECAKRUEL, V.S., HANAZAKI, N. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. Acta Botanica Brasilica v.23, p.590–605, 2009.

PERCARIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. Rev Nutr, v. 23, n. 2, p. 259-267, 2010.

SATYAPRAKASH, R.J., RAJESH, M. S., BHANUMATHY, M., HARISH M. S., SHIVANANDA T. N., SHIVAPRASAD, H. N., SUSHMA G. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Ceiba pentandra* L. Gaertn in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Ghana Medical Journal, Bengaluru, Karnataka, India, v. 47, n. 3, p.121-127, set. 2013.

SCHLOTTERER, G. KUKUDOV, F. BOZORGMEHR, H. HUTTER, X. L. DU, D. OIKONOMOU, Y. IBRAHIM, F. PFISTERER, N. RABBANI, P. THORNALLEY, A. SAYED, T. FLEMING, P. HUMPERT, V. SCHWENGER, M. ZEIER, A. HAMANN, D. STERN, M. BROWNLEE, A. BIERHAUS, P. NAWROTH AND M. MORCOS, Diabetes, 2009.

SHELLEY, B.C.L. Ethnobotany and the process of drug discovery: A laboratory exercise. The American Biology Teacher, v.71, n.9, p.541-547, 2009.

SHYUR LF, TSUNG JH, CHEN JH, CHIU CY, LO CP. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan. Int. J. Appl. Sci. Eng. 2005.

SHYUR LF, TSUNG JH, CHEN JH, CHIU CY, LO CP. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan. Int. J. Appl. Sci. Eng. 2005

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

VIJAYARAJ, P., MUTHUKUMAR, K., SABARIRAJAN, J., NACHIAPPAN, V. Antihyperlipidemic activity of *Cassia auriculata* flowers in triton WR 1339 induced hyperlipidemic rats. Experimental and Toxicologic Pathology, v. 65, n. 1-2, p.135- 141, jan. 2013.

WATTS JL, BROWSE J. Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 30;99(9):5854-9. Epub 2002 Apr 23.

YESMIN N, UDDIN SN, MUBASSARA S, AKOND MA. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Calotropis procera* Linn. American-Eurasian J. Agric, Environ. Sci. 2008.

YOU YJ, NAM NH, KIM Y, AHN BZ. Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba* stem bark. Phytother Res. 2003.

YOU YJ, NAM NH, KIM Y, AHN BZ. Antiangiogenic activity of lupeol from Bombax ceiba stem bark. *Phytother Res.* 2003.

ZAHAN R, NAHAR L, HAQUE M, NESA L, ALAM Z. Antioxidant and Antidiabetic Activities of Alangium salvifolium and Bombax ceiba Dhaka Univ. *J. Pharmaceut. Sci.* 2013.