



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

NAÍME DIANE SAUAIA HOLANDA SILVA

**EFEITO NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.)  
*SKEELS* E DA MIRICETINA NA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

São Luís  
2019

NAÍME DIANE SAUAIA HOLANDA SILVA

**EFEITO NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE *SYZYGIVM CUMINI* (L.)  
SKEELS E DA MIRICETINA NA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito final à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges

**Co-orientador:** Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto

**Área de concentração:** Biotecnologia em Recursos Naturais

São Luís

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SILVA, NAÍME DIANE SAUAIA HOLANDA SILVA.

EFEITO NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE SYZYGIUM CUMINI  
L. SKEELS E DA MIRICETINA NA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS  
/ NAÍME DIANE SAUAIA HOLANDA SILVA SILVA. - 2019.  
137 f.

Coorientador(a): Bruno Araújo Serra Pinto Pinto.

Orientador(a): Antônio Carlos Romão Borges Borges.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do  
Maranhão, São Luís, 2019.

1. Doença de Parkinson. 2. Estresse oxidativo. 3.  
Miricetina. 4. Neuroproteção. 5. Syzygium cumini (L.)  
Skeels. I. Borges, Antônio Carlos Romão Borges. II.  
Pinto, Bruno Araújo Serra Pinto. III. Título.

**EFEITO NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE *SYZYGium CUMINI* (L.)  
SKEELS E DA MIRICETINA NA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito final à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Defesa de Tese em 07 de novembro de 2019, pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges**  
Orientador  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto**  
Co-orientador  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Profa. Dr. Débora Luana Ribeiro Pessoa**  
Examinadora  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade**  
Examinador  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma do Nascimento Silva**  
Examinadora  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joyce Cortez de Sá Sousa**  
Examinadora  
Universidade Ceuma

Aos meus pais Rinaldo Cleber e Náime  
Sauaia, que iluminaram o caminho da  
minha vida e ao meu filho José Guilherme  
pelo amor e carinho que tenho  
diariamente. Dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

É sempre difícil e árduo enfrentar novas etapas na vida. Para atingir nosso objetivo é necessário ter fôlego, paciência, coragem, renúncia, sabedoria e força interior para conseguir superar todas as dificuldades encontradas e alcançar o nosso sonho e realização.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, nosso pai, por ter me permitido esta oportunidade e por ter me abençoado em momentos difíceis, dando-me calma e sabedoria.

Aos meus pais, Rinaldo Cleber e Naíme Sauaia, pelo amor, carinho e exemplo de vida durante toda minha caminhada acadêmica.

Ao meu filho José Guilherme, sua luz iluminou minha jornada e me deu forças a cada dia para seguir meu objetivo.

À minha tia Sâmara Sauaia, pelo apoio, exemplo e carinho de mãe e amiga.

Ao meu tio Pergentino Holanda, pelo seu exemplo como pessoa, tio e amigo onde a família tem lugar especial em seu grandioso coração.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Romão Borges, pelo empenho na orientação, acolhida e ajuda em todos os momentos.

Ao professor Dr. Bruno Araújo Serra Pinto, meu co-orientador, jovem pesquisador e grande amigo desde a graduação, obrigada por sua dedicação, seu apoio, confiança e amizade.

À Universidade Federal do Maranhão e à Universidade Ceuma pelo acesso para realização de todas as etapas da pesquisa.

Ao professor Dr. Lívio Martins Costa Júnior pelo competente trabalho como coordenador do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal: Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação do RENORBIO, que contribuíram na minha formação e na composição desta tese.

À secretária do RENORBIO, Camila Rocha, pela eficiência, atenção e disponibilidade.

Às Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Cláudia Rocha e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Sabadini pelas valiosas sugestões ao longo da pesquisa.

À Equipe do Laboratório de Genética e Histocompatibilidade (LEGH) vinculado ao Hospital Universitário Presidente Dutra em nome do Dr. Fernando, Dr. Marcelo Andrade e Dr<sup>a</sup>. Consuelo Penha meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e contribuição humana e material no processo de finalização da tese.

Aos amigos Wemerson Barroso e Débora Luana, pelo companheirismo e ajuda nos momentos de discussão dos artigos e patente.

Ao aluno da graduação Felipe e ao farmacêutico Denílson, obrigada pelo apoio e interesse dedicados à realização deste estudo, vocês foram peças fundamentais.

Aos meus companheiros e professores do curso de Medicina - Campus Pinheiro, pela ajuda e companheirismo nos momentos mais necessários.

Aos colegas de turma, pelas trocas de informações e pelas palavras de carinho e incentivo.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma forma colaboraram para a realização desta conquista.

*O sonho é que leva a gente para a frente.  
Se a gente for seguir a razão, fica  
aquietado, acomodado.*

*Ariano Suassuna*

## RESUMO

A Doença de Parkinson atualmente é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum conhecida como um distúrbio caracterizado principalmente por seus sintomas motores e cognitivos. *Syzygium cumini* (L.) Skeels, conhecido popularmente como jambolão, é uma árvore nativa do Norte e Nordeste do Brasil. Suas folhas possuem elevado compostos fenólicos e glicídios. A miricetina, composto fenólico presente nas folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, possui propriedades terapêuticas tais como: antimicrobiana, hipoglicemiante e anti-inflamatória. Evidências *in vitro* mostraram que tanto o *Syzygium cumini* (L.) Skeels quanto a Miricetina possuem baixa toxicidade e efeitos antioxidantes, sugerindo potencial uso terapêutico. Na busca de novas terapias para a DP, surge neste cenário a espécie vegetal e o composto fenólico com prospecção terapêutica antioxidante e neuroprotetora para uso sistêmico. O objetivo deste estudo foi desenvolver um produto fitoterápico derivado das folhas de *S. cumini* com atividade antioxidante e neuroprotetora aplicável na Doença de Parkinson. Para investigar o efeito do EHB foram realizados teste comportamentais e antioxidante *in vivo*, com análise de amostras teciduais (estriado, hipocampo e substância negra) por PCR - real time. O tratamento foi realizado diariamente, em quatro grupos de animais (n=5; 90 dias), formados aleatoriamente e tratados concomitantemente por duas semanas como se segue: grupo controle negativo (CTR) administrados óleo de girassol por via subcutânea (s.c.) e solução salina 0,9% por via oral (v.o.) em doses de 0,1ml/100 g de peso; grupo induzido: ratos foram induzidos com rotenona 2,5 mg/kg (s.c.) e salina (v.o.); grupo controle positivo: ratos que receberam rotenona (s.c.) e miricetina 10 mg/kg (v.o.); grupos induzidos tratados com o extrato vegetal de *S. cumini*: ratos que receberão rotenona (s.c.) e tratados com o extrato vegetal de *S. cumini* (EHB) na dose de 500 mg/kg (v.o.). Em relação aos testes comportamental o peso dos animais reduziram após indução da rotenona; no teste de campo aberto a redução dos quadrantes percorridos pelos animais representa uma diminuição da atividade exploratória e da deambulação causada pela degeneração motora associada a rotenona, ou seja, a rotenona teve sucesso ao induzir o Parkinson, porém a miricetina não teve sucesso em revertê-lo; já no teste de rotarod o grupo induzido teve um decréscimo com média de  $2,86 \pm 1,60$  e o grupo CTP teve um decréscimo mais acentuado do que no grupo induzido com média de  $2,00 \pm 0,66$ . Na análise do estresse oxidativo a administração de rotenona aumentou a expressão gênica do *Nrf2*, o tratamento com a miricetina foi capaz de bloquear quase completamente a oxidação ocasionada pela rotenona, enquanto que no tratamento com EHB de *S. cumini*, na substância negra e no hipocampo não demonstrou expressão significativa comparado ao grupo da miricetina, já no estriado houve expressão, porém em menor proporção que a miricetina. Concluiu que apesar de ainda necessitarem serem melhor explorados os últimos testes podemos dispor de um possível fitoterápico para diversas disfunções associadas ao estresse oxidativo e preservação neuronal presente na DP.

**Palavras-Chaves:** Doença de Parkinson. *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Miricetina. Estresse oxidativo. Neuroproteção.

## ABSTRACT

Parkinson's disease is currently considered the second most common neurodegenerative disease known as a disorder characterized mainly by its motor and cognitive symptoms. *Syzygium cumini* (L.) Skeels, popularly known as jambolão, is a native tree of northern and northeastern Brazil. Its leaves have high phenolic compounds and glycidic. Miricetin, a phenolic compound present in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels, has therapeutic properties such as antimicrobial, hypoglycemic and anti-inflammatory. In vitro evidence showed that both *Syzygium cumini* (L.) Skeels and Miricetin have low toxicity and antioxidant effects, suggesting potential therapeutic use. In the search for new therapies for PD, in this scenario arises the plant species and the phenolic compound with prospective therapeutic antioxidant and neuroprotective for systemic use. The aim of this study was to develop an herbal product derived from *S. cumini* leaves with antioxidant and neuroprotective activity applicable in Parkinson's disease. To investigate the effect of EHB, in vivo behavioral and antioxidant tests were performed with analysis of tissue samples (striatum, hippocampus and substantia nigra) by real time PCR. Treatment was performed daily in four groups of animals (n = 5; 90 days), randomly formed and treated concomitantly for two weeks as follows: negative control group (CTR) administered subcutaneous sunflower oil (sc) and solution 0.9% saline orally (vo) at doses of 0.1 ml / 100 g by weight; induced group: rats were induced with rotenone 2.5 mg / kg (s.c.) and saline (v.o); positive control group: rats given rotenone (s.c.) and miricetin 10 mg / kg (v.o.); induced groups treated with *S. cumini* plant extract: rats receiving rotenone (s.c.) and treated with *S. cumini* plant extract (EHB) at a dose of 500 mg / kg (v.o.). Regarding behavioral tests, the animals' weight decreased after induction of rotenone; In the open field test, the reduction in the quadrants traveled by the animals represents a decrease in exploratory activity and ambulation caused by rotenone-associated motor degeneration, that is, rotenone was successful in inducing Parkinson, but miricetin was not successful in reversing; In the rotarod test, the induced group had a decrease with an average of  $2.86 \pm 1.60$  and the CTP group had a steeper decrease than in the induced group with an average of  $2.00 \pm 0.66$ . In the analysis of oxidative stress, rotenone administration increased Nrf2 gene expression, myricetin treatment was able to almost completely block the oxidation caused by rotenone, whereas in *S. cumini* EHB treatment in substantia nigra and hippocampus did not show significant expression compared to the group of miricetin, but in the striatum there was expression, but to a lesser extent than miricetin. He concluded that although the latest tests still need to be better explored we can have a possible herbal medicine for several dysfunctions associated with oxidative stress and neuronal preservation present in PD.

**Keywords:** Parkinson's disease. *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Myricetin. Oxidative stress. Neuroprotection.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente Vascular Cerebral
A2	Receptores de adenosina - 2
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
CID	Colisão
COMT	Catecol o-metil transferase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
DA	Dopamina
DA	Doença de Alzheimer
DM	Depressão Maior
DMSO	Dimetil sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DH	Doença de Huntington
D1	Receptores dopaminérgicos -1
D2	Receptores dopaminérgicos - 2
EHB	Extrato Hidroalcolico Bruto das folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) <i>Skeels</i>
EHSc	Extrato Hidroalcolico <i>Syzygium cumini</i> (L.) <i>Skeels</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ESI	Fonte de ionização por eletrospray
ESI-MSn	Fragmentações em estágios múltiplos
FIA	Injeção em fluxo
FRP	Fração rica em polifenóis
GABA	ácido gama-aminobutírico
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GSH	Glutathione
GPe	Globo pálido externo

GPI	Globo pálido interno
<i>GPx</i>	Glutathiona peroxidase
<i>GSH-Rd</i>	Glutathiona redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPLC-UV/Vis	Cromatografia Líquida
IL-β	Interleucina-β
IL-6	Interleucina-6
L-DOPA	Levodopa
LEFisio	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Fisiologia)
LPPF – UFMA	Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia
LRRK2	Quinase 2 repetida rica em leucina
MAO	Monoamino oxidase
MAO - B	Monoamino oxidase - B
M4	Receptores muscarínicos
MPTP	1-metil-4-fenil1,2,3,6-hidropiridina
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil D-aspartato
<i>NrF2</i>	nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2
NST	Núcleo subtalâmico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARK2	Parkina - 7
PARK7	Parkina - 2
ROT	Rotenona
SC	Sobrenadantes cerebrais
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNCA	α-sinucleína
s.c.	Via subcutânea
SNpc	Substância negra parte compacta
SNpr	Substância negra parte reticulada
<i>SOD</i>	Superóxido dismutase

TH	Tirosina Hidroxilase
TNF- $\alpha$	Fator necrose tumoral alfa
UPS	Sistema ubiquitina-proteassoma
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
v.o.	Via oral
VTA	Área tegumentar ventral
6-OHDA	6-hidroxidopamina
5-HT	Serotonina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Espécie vegetal de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	23
Figura 2 -	Estrutura básica dos flavonoides .....	24
Figura 3 -	Estrutura química da miricetina .....	25
Figura 4 -	Ilustração de Paciente com Doença de Parkinson .....	31
Figura 5 -	Representação esquemática da neuropatologia da Doença de Parkinson (DP) .....	34
Figura 6 -	Esquema representativo do efeito da dopamina nas vias direta e indireta .....	37
Figura 7 -	Mecanismo de defesa antioxidante .....	40
Figura 8 -	Mecanismos que levam ao estresse oxidativo na DP e o papel dos produtos gênicos relacionados à DP nesse processo .....	41
Figura 9 -	Principais características estruturais dos flavonoides requeridas para sequestro de espécies reativas .....	42
Figura 10 -	Mecanismo da atividade da miricetina no sequestro do ânion radical .....	43
Figura 11 -	Representação esquemática da fisiopatologia em modelos experimentais de DP .....	51
Figura 12 -	Mecanismo de ação da rotenona .....	52
Figura 13 -	Perfil cromatográfico por CLAE/UV-Vis a 254 nm do EHB das folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	62
Figura 14 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> do EHB das folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	63
Figura 15 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>myricetin-3-O-rhamnoside</b> com t <sub>R</sub> = 5,34 .....	64
Figura 16 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>myricetin-3-O-acetil-rhamnoside</b> com t <sub>R</sub> = 6,00 .....	64
Figura 17 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>rhamnetin-3-O-(6-O"-acetilglucosídeo)</b> com t <sub>R</sub> = 6,58 .....	64
Figura 18 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>derivado de ácido caftrarico</b> com t <sub>R</sub> = 8,21 .....	65

Figura 19 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>caftaric acid</b> com t <sub>R</sub> = 10,0 .....	65
Figura 20 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>ligstroside</b> com t <sub>R</sub> =10,8 .....	66
Figura 21 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>derivado da rutina</b> com t <sub>R</sub> = 10,9 .....	66
Figura 22 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>trigaloil glicose</b> com t <sub>R</sub> = 11,57 .....	66
Figura 23 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>obebioside A</b> com t <sub>R</sub> = 11,97 .....	67
Figura 24 -	Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> da substância <b>Miricetina</b> .....	67
Figura 25 -	Ensaio de toxicidade através da atividade hemolítica do extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	68
Figura 26A -	Placas de ELISA da atividade hemolítica de doses do extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	68
Figura 26B -	Placas de E.LISA da atividade hemolítica de doses do extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	68
Figura 27 -	Taxa de sobrevivência das larvas em relação ao extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	69
Figura 28 -	Ensaio de viabilidade celular do extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels em cultura de células de câncer de mama ....	69
Figura 29 -	Taxa de proliferação celular em relação ao extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	70
Figura 30 -	Controle com ácido gálico para atividade antioxidante bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	70
Figura 31 -	Avaliação do efeito antioxidante nas concentrações do EHB de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	70
Figura 32 -	Doses do extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels. para atividade antioxidante .....	71
Figura 33 -	Placa de ELISA da atividade antioxidante DPPH de doses do extrato bruto de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	71

Figura 34 -	Efeito da administração via oral de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) no peso (g) .....	72
Figura 35 -	Efeito da administração via oral de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) na deambulação (Campo aberto) .....	73
Figura 36 -	Efeito da administração via oral de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) na deambulação (Rotarod) .....	74
Figura 37 -	Efeito do tratamento da Miricetina e do EHB de <i>Syzygium</i> <i>cumini</i> (L.) <i>Skeels</i> na expressão gênica do <i>Nrf2</i> na substância negra .....	75
Figura 38 -	Efeito do tratamento da Miricetina e do EHB de <i>Syzygium</i> <i>cumini</i> (L.) <i>Skeels</i> na expressão gênica do <i>Nrf2</i> no estriado .....	76
Figura 39 -	Efeito do tratamento da Miricetina e do EHB de <i>Syzygium</i> <i>cumini</i> (L.) <i>Skeels</i> na expressão gênica do <i>Nrf2</i> no hipocampo .	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso popular do <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	26
Tabela 2 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> do EHB das folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	63

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.1	OBJETIVO GERAL .....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
3	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	22
3.1	ESPÉCIE VEGETAL DE <i>SYZYGIUM CUMINI</i> (L.) <i>SKEELS</i> .....	22
3.1.1	<b>Características botânicas</b> .....	22
3.1.2	<b>Características químicas</b> .....	23
3.1.3	<b>Características farmacológicas</b> .....	25
3.2	DOENÇA DE PARKINSON .....	27
3.2.1	<b>Sintomatologia da Doença de Parkinson</b> .....	29
3.2.2	<b>Etiologia da Doença de Parkinson</b> .....	32
3.2.3	<b>Fisiopatologia da Doença de Parkinson</b> .....	34
3.2.4	<b>Estresse Oxidativo e Doença de Parkinson</b> .....	38
3.2.5	<b>Inflamação e Doença de Parkinson</b> .....	43
3.2.6	<b>Tratamento Farmacológico da Doença de Parkinson</b> .....	46
3.3	MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON .....	48
3.3.1	<b>Modelo da Doença de Parkinson induzido pela rotenona</b> .....	49
4	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	53
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	53
4.2	PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i> (EHB) .....	53
4.3	OBTENÇÃO DO PRODUTO FITOTERÁPICO .....	53
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i> (EHB) .....	54
4.4.1	<b>Prospecção fitoquímica do EHB das folhas de <i>S. cumini</i></b> .....	54
4.4.2	<b>Determinação do peso seco e avaliação do rendimento do EHB das folhas de <i>S. cumini</i></b> .....	54
4.4.3	<b>Caracterização química do EHB das folhas de <i>S. cumini</i></b> .....	54
4.4.3.1	Cromatografia Líquida (HPLC-UV/Vis) .....	54
4.4.3.2	Espectrometria de Massas por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> .....	55

4.5	TESTES COM O EXTRATO BRUTO (IN VITRO) .....	55
4.5.1	<b>Testes de citotoxicidade</b> .....	55
4.5.1.1	Ensaio de atividade hemolítica .....	55
4.5.1.2	Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i> com larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	56
4.5.2	<b>Testes antioxidantes</b> .....	56
4.5.2.1	Método de DPPH .....	56
4.5.3	<b>Ensaio de viabilidade celular v</b> .....	57
4.5.3.1	Ensaio de redução de Tetrazólio (MTT) .....	57
4.6	GRUPOS EXPERIMENTAIS (ENSAIOS <i>IN VIVO</i> ) .....	58
4.6.1	<b>Animais</b> .....	58
4.6.2	<b>Grupos experimentais</b> .....	58
4.6.2.1	Indução com rotenona (ROT) .....	59
4.6.2.2	Avaliação da função motora e cognitiva .....	59
4.6.2.3	Seção e obtenção dos sobrenadantes cerebrais .....	60
4.6.2.4	Análise de amostra tecidual por PCR (Real time) .....	60
4.7	ABORDAGEM ÉTICA .....	61
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	61
5	<b>RESULTADOS</b> .....	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EHB DAS FOLHAS DE <i>SYZYGIUM CUMINI</i> (L.) SKEELS .....	62
5.1.1	<b>Caracterização química do EHB das folhas do <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível (CLAE/UV-vis)</b> .....	62
5.1.2	<b>Caracterização química do EHB das folhas do <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels por Espectrometria de Massas por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup></b> .....	62
5.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE .....	67
5.2.1	<b>Avaliação da atividade hemolítica (YANG et. al.; 2005)</b> .....	67
5.2.2	<b>Avaliação de toxicidade utilizando larvas de <i>Tenebrio molitor</i> (LIMA et. al., 2011; SOUZA et. al., 2016)</b> .....	68
5.2.3	<b>Avaliação de viabilidade celular (Ensaio de redução de Tetrazólio - MTT)</b> .....	69
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	70
5.3.1	<b>Método de DPPH (BLIOS, 1958)</b> .....	70

5.3.2	<b>Avaliação do efeito do extrato de <i>S.cumini</i> em modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona ...</b>	71
5.3.2.1	Análise do peso dos animais após indução da rotenona .....	71
5.3.2.2	Análise da atividade locomotora dos animais após a indução da rotenona – Teste Campo Aberto .....	72
5.3.2.3	Análise da atividade locomotora dos animais após a indução da rotenona – Teste Rotarod .....	73
5.3.2.4	Efeito do tratamento com Miricetina e do EHB de <i>Syzygium cumini</i> ( <i>L.</i> ) <i>Skeels</i> na expressão gênica do <i>Nrf2</i> (nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2) em tecidos cerebrais .....	74
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE A - Pedido de patente depositado</b> .....	114
	<b>ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEUA/UFMA</b> .....	132
	<b>ANEXO B - Resultados da expressão gênica em PCR - real time dos genes das enzimas oxidativas nos grupos experimentais ...</b>	133

## **EFEITO NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS E DA MIRICETINA NA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

Naime Diane Sauaia Holanda Silva

### **1 INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento da expectativa de vida da população mundial resultando em um aumento no número de idosos. Em 2010, esse número no Brasil era de 14 milhões de pessoas, no entanto em 2050, estima-se que mais de 38 milhões de brasileiros terão mais de 65 anos. Associado ao processo de envelhecimento populacional, também se observa um aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas (CHAIMOWICZ, 2013).

Doenças neurodegenerativas são desordens progressivas do sistema nervoso que afetam a função e manutenção de populações neuronais específicas (EMERIT et. al., 2004). A maioria destas doenças partilha várias características comuns, tais como: ausência de sintomas durante os primeiros estágios da doença e rápida progressão com o envelhecimento; perdas cognitivas (principalmente aprendizado e memória); transtornos afetivos, de humor e de comportamento; desordens motoras; surgimento de depósitos proteicos anormais (proteínas mal enoveladas) e perda progressiva neuronal e/ou glial (EMERIT et. al., 2004; COSTELLO et. al., 2009).

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio caracterizado principalmente por seus sintomas motores e cognitivos, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum afetando 10 milhões de idosos no mundo, sendo no Brasil uma média de 200 mil pessoas acometidas pela doença, segundo dados da OMS publicados em 2014 (SILVA; CARVALHO, 2019).

A incidência e prevalência da DP aumentam com a idade, caracterizando o envelhecimento como o fator de risco mais importante para esta doença. Nos últimos anos, o aumento da prevalência da DP tem gerado altos custos econômicos para os sistemas de saúde e para as famílias dos pacientes (LAU; BRETELER, 2006; PRINGSHEIM et. al., 2014; REEVE; SIMCOX; TURNBULL, 2014).

Histopatologicamente a DP é caracterizada pela degeneração dopaminérgica nigroestriatal, via responsável pela produção de dopamina (DA) (SHERER et. al., 2003; OBESO et. al., 2000). A DA é um neurotransmissor que está relacionado

principalmente com a coordenação dos movimentos, atividade cognitiva e límbica, sabe-se que a própria degradação espontânea da dopamina resulta em estresse oxidativo, com produção de ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios (HAUSER; HASTINGS, 2013).

A origem neuroquímica da DP foi elucidada em 1960 por Hornykiewicz, que demonstrou que o conteúdo de DA da Substância Negra parte compacta (SNpc) e do núcleo caudado/putâmen (também conhecido como estriado) em encéfalos *post-mortem* de pacientes com a DP, era muito baixo, e estava associado à redução do número de neurônios dopaminérgicos (MEREDITH et. al., 2008).

Posteriormente, documentou-se que a DP estava relacionada a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos de todos os núcleos da base (núcleo caudado/putâmen, globo pálido, núcleo subtalâmico, SNpc) e presença de agregados proteicos intraneuronais conhecidos como corpúsculos de Lewy (SELVARAJ et. al., 2012).

A etiologia da DP ainda permanece desconhecida, porém vários estudos têm considerado que a causa da DP é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (DEXTER; JENNER, 2013). A principal característica patológica é a degeneração de neurônios dopaminérgicos da SNpc e consequente redução da concentração de DA no estriado, o que tem sido associado aos sintomas cardinais da DP: rigidez muscular, bradicinesia, tremor de repouso e instabilidade postural (GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015; MILLER; O'CALLAGHAN, 2015; WU et. al., 2012).

Ocorre ainda um processo neuroinflamatório com ativação de células da glia e liberação de óxido nítrico (RODRÍGUEZ et. al., 2013). A presença de estresse oxidativo na doença DP está associada ao aumento da oxidação de lipídios, de ácido desoxirribonucleico e de proteínas com a geração de espécies reativas de oxigênio, que são espécies químicas instáveis (SUBRAMANIAM; ELLIS, 2013).

O estresse oxidativo e a inflamação estão entre os principais mecanismos envolvidos na neurodegeneração dopaminérgica característica da DP, exercendo um papel importante na fisiopatologia desta doença (HWANG, 2013; ROCHA; DE MIRANDA; TEIXEIRA, 2015; WANG; LIU; ZHOU, 2015). Nos últimos anos, os modelos animais de DP têm se mostrado úteis para estudar o papel do estresse oxidativo e da inflamação na fisiopatologia da DP, bem como têm indicado que a terapia com compostos antioxidantes e anti-inflamatórios pode ser uma alternativa

para a prevenção ou tratamento da DP (JAGMAG et. al., 2016; JOERS et. al., 2016; KOPPULA et. al., 2012; MACHADO-FILHO et. al., 2014).

A deficiência de terapias neuroprotetoras para a DP e as complicações associadas as mesmas têm incentivado o desenvolvimento de estudos com o objetivo de desvendar os mecanismos fisiopatológicos desta doença, bem como formular estratégias terapêuticas capazes de prevenir a neurodegeneração (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016; TAGLIAFERRO; BURKE, 2016).

Nenhum dos tratamentos disponíveis é capaz de prevenir a progressão ou restaurar o dano neuronal característico da DP. Portanto, o tratamento dos pacientes com DP é apenas sintomático (DEXTER; JENNER, 2013). A terapia de reposição dopaminérgica através do uso da L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) permanece a opção de primeira escolha para o tratamento dos sintomas motores da DP. Contudo, a eficácia da terapia com L-DOPA declina ao longo do tempo e complicações motoras, tais como discinesias e flutuações motoras, têm sido associadas ao seu uso prolongado (DEXTER; JENNER, 2013; OLANOW, 2015).

Entretanto, até o momento não foi encontrado uma terapêutica definitiva que cure ou impeça, de forma efetiva, a progressão da DP, sendo que, as drogas utilizadas atualmente no tratamento são apenas sintomáticas, uma vez que nenhuma delas faz desaparecer o dano neuronal caracterizado pela doença. Desta forma, substâncias naturais e de baixo custo que possam atuar protegendo as células do estresse oxidativo, minimizando as alterações mitocondriais, da inflamação e apoptose, são fortes candidatas ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da cura e da prevenção (HALLIWELL, 2006).

As plantas medicinais são importantes fontes de drogas potencialmente terapêuticas. Estudos realizados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) constataram que 65 a 80% da população de países em desenvolvimento, devido à pobreza e o não acesso ao medicamento alopático, dependem essencialmente de plantas medicinais para a terapêutica de suas enfermidades. Além disso, os vários efeitos colaterais indesejáveis devido ao uso, correto ou incorreto, de medicamentos sintéticos, têm causado nos últimos anos uma procura considerável de medicamentos obtidos a partir de produtos naturais. Neste contexto, as plantas medicinais podem ser os substratos adequados para obtenção de novos medicamentos, uma vez que são insumos acessíveis e já contam com a aceitação popular (GURIB-FAKIM, 2006).

O Maranhão é um dos Estados do Nordeste do Brasil com maior biodiversidade, principalmente de espécies vegetais, permitindo um considerável crescimento do uso de plantas medicinais para diversos fins terapêuticos. Dentre as várias plantas que fazem parte do tradicional arsenal terapêutico maranhense, destaca-se a espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels (RÊGO, 2008).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels, da família Myrtaceae, é uma árvore de grande porte amplamente distribuída por todo território nacional e frequente no Maranhão conhecida popularmente como jambolão. Tradicionalmente são atribuídas a espécie atividades contra tosse, asma, disenteria, helmintíases e infecções diversas (bactérias, vírus, fungos e protozoários) e relacionado a seu alto poder antioxidante, ações contra inflamações, diabetes e dislipidemias, também são relatadas (SAGRAWAT et al, 2006).

Dados na literatura evidenciam a riqueza de compostos e metabólitos secundários na espécie com comprovada ação antioxidante, dentre eles os flavonóides, quercetina e miricetina e os ácidos ascórbico, gálico, elágico, ferúlico e ursólico (REYNERTSON et al, 2005).

Os compostos fenólicos são atribuídos propriedades antioxidantes (BROINIZI et. al., 2008), as quais estão associadas à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, principalmente: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ROMANO et. al., 2013).

Em estudos recentes avaliou-se *in vivo* o potencial efeito anti-hipertensivo do extrato das folhas de *Syzygium cumini* em ratos normotensos Wistar e em ratos espontaneamente hipertensos, bem como o seu efeito *in vitro* sobre a reatividade de artérias de resistência, nos quais o Jambolão reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos. (RIBEIRO et. al., 2013), assim como também *in vivo* o extrato das folhas do Jambolão apresentou efeitos anti-obesidade, hipolipemiante e hipoglicemiante em ratos com obesidade induzida pelo L-glutamato monossódico (MSG) (SANCHES et. al., 2016).

Outro estudo também recente avaliou a obtenção de uma formulação e seu uso no auxílio da prevenção e do tratamento do diabetes tipo II e suas complicações. A formulação foi obtida a partir de uma mistura de dois extratos hidroalcoólicos liofilizados, obtidos das folhas de duas espécies vegetais, *Averrhoa carambola* e *Syzygium cumini*. A preparação farmacêutica contendo os extratos de folhas das plantas foi efetiva no auxílio da prevenção (intolerância à glicose e dislipidemia) e do

tratamento do diabetes tipo II (resistência à insulina) e suas complicações (ABREU et. al., 2013).

Frente aos promissores resultados que tem sido obtido com relação ao potencial terapêutico da espécie vegetal *Syzygium cumini* e considerando que a patogênese de doenças neurodegenerativas e ausência de estudos na literatura avaliando os efeitos neuroprotetores da espécie e sua atividade sobre o estresse oxidativo gerado pelas drogas indutoras de doenças neurodegenerativas; o presente estudo teve por objetivo avaliar a ação antioxidante e neuroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* em modelo animal com Doença de Parkinson induzido por aumento de estresse oxidativo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- a) Desenvolver um produto fitoterápico derivado das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels com atividade antioxidante e neuroprotetora aplicável no controle da doença Parkinson.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos do EHB de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. e do fitoterápico padrão miricetina sobre controle da doença de Parkinson;
- b) Realizar caracterização química dos compostos fenólicos do EHB de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e do fitoterápico padrão miricetina;
- c) Investigar a toxicidade e a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do EHB de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels;
- d) Verificar a ação do EHB de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e do fitoterápico padrão miricetina sobre parâmetros comportamentais em modelo experimental (induzido por rotenona) da doença de Parkinson;
- e) Quantificar a atividade antioxidante do EHB de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e do fitoterápico padrão miricetina por biologia molecular em metodologia definida;
- f) Validar um produto natural para possível utilização como matéria prima na produção de medicamentos.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 ESPÉCIE VEGETAL DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS

*Syzygium cumini* (L.) Skeels (*S. cumini*) é uma árvore do subcontinente indiano que foi trazida para países ocidentais em meados do século XIX, onde começou a ser usada como agente antidiabético mesmo antes da descoberta da insulina (CHAGAS et. al., 2018).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels considerada uma planta nativa do sudeste asiático possui várias sinonímias incluindo *Eugenia jambolana* Lam., *Myrtus cumini* Linn., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Eugenia djouant* Perr., *Calyptranthes jambolana* Willd., *Eugenia cumini* (Linn.) Druce. e *Eugenia caryophyllifolia* Lam. Pertencente à família Myrtaceae, sendo característica desta uma ampla distribuição nas regiões tropicais, sobretudo América e Austrália (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

No Brasil a espécie vegetal é bem adaptada devido ao clima tropical, localizando-se com frequência nos estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio grande do Sul e frutifica fartamente no mês de fevereiro (PIO CORRÊA, 1984). É conhecida popularmente como “Jambolão”, “Jamelão”, ‘azeitona roxa’, ‘Jambo da Índia’, ‘Jambol’, variando de acordo com a região (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

##### 3.1.1 Características botânicas

*Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma árvore de grande porte com folhagem sempre verde e densa. O caule apresenta-se com casca grossa em tom acastanhado, esfoliante e em escamas lenhosas além de madeira esbranquiçada, granulada e durável. Já as folhas são coriáceas, oblongo ovadas a elípticas com 6 a 12 centímetros de comprimento. Suas flores são perfumadas, branco esverdeadas, em grupos de apenas alguns ou 10 a 40 e são redondas ou oblongas. O cálice é em forma de funil, com cerca de 4 milímetros de comprimento e dentado e seus frutos são frutos e muitas vezes são arredondados a oblongos, com 1,5 a 3,5 centímetros de comprimento, roxo escuro ou quase preto, carnudos e comestíveis, contém uma única semente grande (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

Possuem um sabor muito doce, tornando-se ligeiramente adstringentes nas bordas da polpa à medida que a fruta amadurece. A fruta tem uma combinação de sabor doce, levemente azedo e adstringente com uma tendência a colorir a língua na cor roxa (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012), exemplificado na figura 1.

Figura 1 - Espécie vegetal de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



Fonte: Chagas (2018)

### 3.1.2 Características químicas

*Syzygium cumini* (L.) Skeels apresenta constituintes químicos diversos, por meio da triagem fitoquímica, os compostos apresentam variabilidade nas diferentes estruturas de sua anatomia, sendo nas sementes encontrados taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico), quercetina, antimelina, óleo essencial ( $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, cis-ocineno, trans-ocineno,  $\gamma$ terpineno, acetato de bornila,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno e candineno), materiais resinosos e glicose; nas cascas foram encontrado ácido acetil-oleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina; já nas folhas foram encontrados ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina, enquanto que nos frutos foram encontradas antocianidinas e finalmente nas flores foi encontrado ácido oleanólico (MIGLIATO et. al.,2006).

Polifenóis são fitoquímicos que foram relatados como exercendo benefícios saudáveis, estudos epidemiológicos mostram que o consumo de dietas ricas em

polifenóis está inversamente associado ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e neurodegenerativas, além do câncer (RZEPECKA-STOJKO et. al., 2015; GORMAZ et. al., 2016).

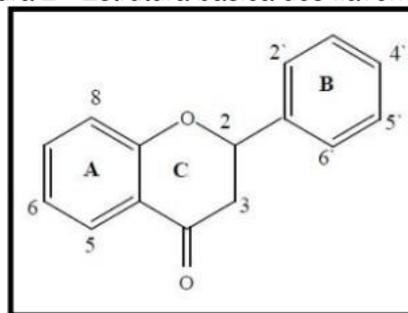
*S. cumini* é composto fitoquimicamente por compostos como taninos hidrolisáveis, flavonóides, antocianinas, terpenos e ácidos alifáticos (BALIGA et. al., 2011). Diferentes partes de *S. cumini* têm composições diferentes, mas todas compartilham um alto conteúdo de polifenóis (SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

Tanto frutas quanto flores são enriquecidas em antocianinas como cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina (BRITO, 2007). A semente contém rutina e quercetina, e as folhas têm metabólitos secundários importantes, como kaempferol, quercetina, miricetina e seus glicosídeos (CHAGAS et. al., 2018).

Os Flavonóides pertencem a uma classe de compostos polifenólicos, são biossintetizados por vegetais a partir da via dos fenilpropanóides e possuem grandes propriedades no combate a radicais livres (DORNAS et. al., 2007). Estão presentes na maioria das plantas, sendo concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001).

Os flavonóides e sua estrutura basicamente é formada por um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 2) (DI CARLO et. al., 1999; PIETTA, 2000).

Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóides



Fonte: Dornas et. al. (2007)

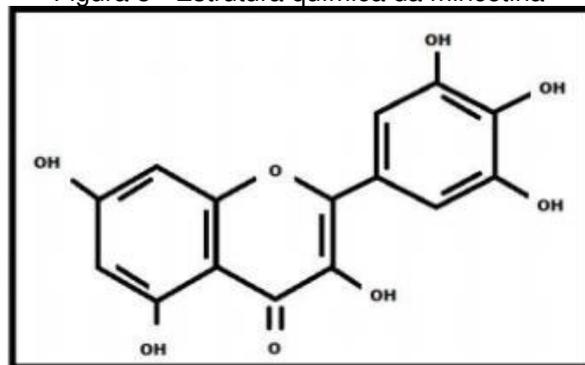
Trata-se de uma classe de compostos naturais, com baixo peso molecular, que diferem entre si por sua estrutura química e por características particulares. As diferenciações se dão no anel C (padrão) e tende a resultar em diferentes classes de flavonóides, tais como: flavonas, flavonóis, flavononas, dihidroflavonóis, flavonodióis,

chalconas, auronas e antocianidinas. Entretanto, substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro da mesma classe (HOLLMAN; KATAN, 1999).

Os flavonóides possuem propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, cardiovasculares e antioxidantes (CORY et. al., 2018). A estrutura química é que determina a capacidade antioxidante, as hidroxilas podem doar elétrons e suportar o deslocamento em torno do sistema aromático. Estas hidroxilas localizadas em C4 e C3, atuam no aumento do potencial antioxidante, assim a classe das agliconas (ex. quercetina, luteolina, miricetina e canferol) têm grande capacidade antioxidante, maior que de flavonóides conjugados, como a quercetina-3-glicosídica (LIEN et. al., 1999; SCOTTI et. al., 2007; CORY et. al., 2018).

A miricetina (Figura 3) é um flavonoide natural, pertencente à família dos polifenóis, estruturalmente muito similar a quercetina (HUANG et. al., 2010). Ambas possuem grupos hidroxila fenólicos e desempenham o papel de citoprotetor duplo, atuando como antioxidantes diretos por meio de eliminação de radicais livres, e indiretamente induzindo a produção de enzimas citoprotetoras em sistemas biológicos (QIU et. al., 2018).

Figura 3 - Estrutura química da miricetina



Fonte: Alves et. al. (2007)

A miricetina apresenta dados controversos quanto a sua capacidade de ação quando utilizada in vivo ou in vitro, como propriedades anticarcinogênica, pró-tumorigênica, antioxidante, pró-oxidante e ação fitoestrogênica (YANG et. al., 2017; RAHIMIFARD et. al., 2017).

### 3.1.3 Características farmacológicas

A utilização intensa desta planta na medicina popular estimulou a pesquisa científica, identificando indicações terapêuticas devido às inúmeras ações

farmacológicas do jambolão, discriminadas conforme as partes utilizadas da planta (MIGLIATO et. al., 2006), de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 - Uso popular do *Syzygium cumini* (L.) Skeels

PARTE DA PLANTA	USO POPULAR	REFERÊNCIAS
Folhas	Diabetes, ação hipotensiva, diuréticas, adstringência, obstipação, leucorréia, estômago, cataplasma em doenças de pele, acalmar prurido, antiinflamatória.	ROSS,1999 ALBERTON et. al., 2001 ZANOELLO et. al., 2002
Casca	Atividade antidiarréica, ação inibitória contra atividade do HIV - 1 protease, hipoglicemiante, adstringência e obstipação, e é utilizada no tratamento de hemorragias e leucorréia, diabetes e úlcera venérea, indigestão e purificação do sangue, disenteria, dispepsia, anti-séptico, adstringente em ulcerações bucais, gengivas esponjosas e estomatite, inflamações locais, queimaduras, cardiotônico e estimulante do SNC, antipirético.	ROSS,1999 ALBERTON et. al., 2001 PEPATO et. al., 2001
Sementes	Anticonvulsivante, hipoglicemiante, adstringente e obstipação, atividade eupéptica, anti-hemorrágica, para alterações no estômago, antiinflamatória, bactericida, diarréia, diabetes, disenteria e hipertensão.	ROSS,1999 ALBERTON et. al., 2001 DAMASCENO et. al., 2002 PEPATO et. al., 2001
Frutos	Hipoglicemia, adstringência e obstipação, diuréticos e estomáticos, tratamento gastrointestinal, adstringente e oralmente para úlcera de estômago, redução de acidez e diabetes, carminativo, antiescorbútico e diurético, diarréia aguda e crônica, retenção urinária, gargarejo para irritações da garganta, loção descamação do couro cabeludo, antiinflamatório, antipirético, adstringente, no tratamento de disenteria, diarréia e diabetes.	ROSS,1999 ALBERTON et. al., 2001 SHARMA et. al., 2003
Flores	Atividades antibióticas.	SHARMA et. al., 2003
Raiz	Antiemético, aumentar a lactação em lactantes.	ROSS,1999

Fonte: O autor

Popularmente é atribuída a espécie atividades hipoglicemiante, hipotensiva, diurética, antitussígena, antiasmática, helmíntica e antimicrobiana, além de ações contra inflamações, diabetes e doenças neurodegenerativas, relacionadas a seu alto poder antioxidante (SAGRAWAT, 2006).

Dados na literatura evidenciam a riqueza de compostos e metabólitos secundários na espécie com comprovada ação antioxidante, dentre eles os flavonóides, quercetina e miricetina e os ácidos ascórbico, gálico, elágico, ferúlico e ursólico (REYNERTSON, 2005). Estudos farmacológicos evidenciam ações hipoglicêmicas e anti-hiperglicêmica, antiinflamatória, antioxidante, anti edematogênica, antimicrobiana, leishmanicida e atividade hipotensora (AYYANAR, 2012; SUBASH-BABU, 2012; SAGRAWAT, 2006).

Um estudo de pesquisadores associados ao Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia (LPPF – UFMA) avaliou *in vivo* o potencial efeito anti-hipertensivo do extrato das folhas de *Syzygium cumini* em ratos normotensos Wistar e em ratos espontaneamente hipertensos, bem como o seu efeito *in vitro* sobre a reatividade de artérias de resistência. Este estudo demonstrou que o Jambolão reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos. (RIBEIRO et. al., 2013). Outro estudo também recente avaliou a obtenção de uma formulação e seu uso no auxílio da prevenção e do tratamento do diabetes tipo II e suas complicações. A formulação foi obtida a partir de uma mistura de dois extratos hidroalcoólicos liofilizados, obtidos das folhas de duas espécies vegetais, *Averrhoa carambola* e *S. cumini*. A preparação farmacêutica contendo os extratos de folhas das plantas foi efetiva no auxílio da prevenção (intolerância à glicose e dislipidemia) e do tratamento do diabetes tipo II (resistência à insulina) e suas complicações. (ABREU et. al., 2013).

O grupo de pesquisadores associados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Fisiologia (LEFisio) têm dado especial atenção à espécie vegetal *Syzygium cumini* observando efeitos anti – obesidade, hipolipemiante e hipoglicemiante relacionados aos compostos fenólicos encontrados na espécie (FRANÇA et. al., 2014). E em outra publicação mais recente esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o extrato rico em polifenol da folha de *Syzygium cumini* melhora duplamente a sensibilidade à insulina periférica e a função das ilhotas pancreáticas em ratos obesos induzidos por L-glutamato monossódico (SANCHES et. al., 2016).

### 3.2 DOENÇA DE PARKINSON

O envelhecimento populacional, decorrente do aumento da expectativa de vida, é uma importante conquista em nível global, no entanto em conjunto verifica-se um aumento progressivo de enfermidades relacionadas à idade, como doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (SHIMADA et. al., 2003).

Estima-se que em 2015 cerca de 46,8 milhões de pessoas apresentavam manifestação clínica de pelo menos alguma dessas patologias. Além disso, se essas doenças continuarem a se expressar na mesma frequência atual, é esperado que a cada 20 anos o número de pessoas afetadas dobre, chegando a 131,5 milhões de pessoas em 2050 (THE GLOBAL, 2015).

Tais desordens neurodegenerativas têm grande impacto social e, com o passar do tempo, têm se configurado como um problema de saúde pública, primeiro devido ao fato de que são a quarta principal causa de morte no mundo, ficando atrás apenas dos índices de morte por doenças cardíacas, câncer e acidente vascular cerebral (AVC), e também por fatores relacionados ao contingenciamento econômico pois, somente em 2015, foram gastos 118 bilhões de dólares no custeio financeiro para tratamento dessas doenças em todo o mundo (THE GLOBAL, 2015).

As doenças neurodegenerativas são condições debilitantes e incuráveis que resultam na degeneração progressiva devido a morte de neurônios, que entre outras coisas causam ataxias, problemas como o movimento e com funcionamento cerebral (SHIMADA et. al., 2003). São patologias caracterizadas pela destruição irreversível de certos neurônios, o que leva à perda progressiva e incapacitante de determinadas funções do sistema nervoso (FALCO et. al.,2016).

A maioria destas doenças partilham várias características comuns, tais como: ausência de sintomas durante os primeiros estágios da doença e rápida progressão com o envelhecimento; perdas cognitivas (principalmente aprendizado e memória); transtornos afetivos, de humor e de comportamento; desordens motoras; surgimento de depósitos proteicos anormais (proteínas mal enoveladas) e perda progressiva neuronal e/ou glial (EMERIT et al, 2004; COSTELLO et al, 2009). Dentre essas as mais recorrentes e comuns são a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP) e a doença de Huntington (DH) (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008).

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio caracterizado principalmente por seus sintomas motores e cognitivos, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum afetando 10 milhões de idosos no mundo, sendo no Brasil uma média de 200 mil pessoas acometidas pela doença, segundo dados da OMS publicados em 2014 (SILVA; CARVALHO, 2019).

A DP foi originalmente descrita em 1817 pelo médico inglês James Parkinson no artigo intitulado "*Essay on the Shaking Palsy*" ("Ensaio da paralisia agitante"). Neste estudo, James Parkinson definiu a enfermidade, determinou os sintomas patognomônicos, descreveu o diagnóstico diferencial e fez considerações a respeito da etiologia e do tratamento desta doença (TIEVE; MENEZES, 2003).

A DP é a uma doença crônica progressiva altamente prevalente, sendo considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum, após a Doença de Alzheimer. Sua prevalência é ligeiramente maior em homens do que em mulheres e a

incidência aumenta com a idade (LAU; BRETELER, 2006; PRINGSHEIM et. al., 2014; WIRDEFELDT et. al., 2011).

Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas são acometidas pela DP em todo o mundo. Na América do Sul, a prevalência da DP é de aproximadamente 600 casos por 100.000 pessoas em indivíduos com idade entre 60 e 69 anos (PRINGSHEIM et. al., 2014).

Dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde caracteriza a DP como um distúrbio neurológico que afeta o sistema motor causando tremores, rigidez, lentidão nos movimentos e alterações de equilíbrio; com caráter progressivo, crônico e degenerativo, a doença pode estar ainda associada a sintomas como alucinações e confusão, além de problemas no trato urinário e intestinal. De acordo com a OMS cerca de 200 mil pessoas sofrem com a doença no Brasil (MS, 2018). Estima-se que em 2020 aproximadamente 40 milhões de pessoas no mundo terão desordens motoras secundárias à DP (LANA et. al., 2007)

A DP é considerada uma doença de alto custo econômico, uma vez que gera gastos diretos (tratamento medicamentoso, serviços de saúde, exames diagnósticos) e indiretos (redução de produtividade). Geralmente, a utilização de serviços de saúde e os custos com pacientes com DP são significativamente mais altos comparados aos da população controle (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

### **3.2.1 Sintomatologia da Doença de Parkinson**

A DP causa um dano direto sobre o estriado que pode levar a um quadro chamado de parkinsonismo, caracterizado por tremor de repouso, rigidez, lentidão ou ausência de movimento voluntário, instabilidade postural e freezing. A DP é o tipo mais comum de parkinsonismo, atingindo aproximadamente 80% dos casos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Não existe um biomarcador até o momento que possa ser utilizado como diagnóstico validado para a DP. Desta forma, o diagnóstico da DP ainda é baseado nas características clínicas e histórico do paciente, bem como na resposta dos sintomas a agentes dopaminérgicos (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016).

Os sintomas motores mais frequentes são o tremor de repouso unilateral, a bradicinesia, rigidez muscular, instabilidade postural, alterações na marcha e

alterações de voz (LEES et. al. 2009; BOLOGNA et. al., 2016; KARUNANAYAKA et. al., 2016).

Dentre os sintomas motores, as alterações vocais muitas vezes passam despercebidas. Todavia, acometem em torno de 90% dos pacientes com DP. Geralmente são acompanhadas de dificuldade de deglutição, que ocorre em decorrência de modificações da musculatura da laringe, modulada pela dopamina da via nigroestriatal (CIUCCI et. al., 2013; KALF et. al., 2011; WALSH; SMITH, 2012).

Essas modificações de fala, que incluem dificuldade de elaboração de frases e na manutenção do tom de voz, são também chamadas de disfonias ou disartrias. São classificadas por movimentos lentos, fracos, imprecisos ou descoordenados da musculatura envolvida na produção da fala, devido a transtornos na execução motora que envolve múltiplas áreas do encéfalo, incluindo os núcleos da base (SPENCER; ROGERS, 2005; CIUCCI et. al., 2013).

Um crescente número de evidências tem sugerido que sintomas não-motores, incluindo distúrbios olfatórios, desordens do sono, dor, ansiedade, depressão, déficits cognitivos e disfunção autonômica, estão presentes em pacientes com DP e podem preceder os sintomas motores em alguns anos (DEXTER; JENNER, 2013; PARKER et. al., 2013).

Dentre os sintomas não motores a Depressão Maior (DM) é o distúrbio psiquiátrico mais frequentemente associado à Doença de Parkinson, afetando quase 35% dos pacientes (AARSLAND et. al., 2012).

Em estudo realizado por Riedel et. al. (2010), demonstrou-se que a presença de depressão em pacientes com DP reduz o grau de independência, refletindo na piora da qualidade de vida dos pacientes.

O comprometimento da neurotransmissão da dopamina é tido como uma das causas da depressão associada à DP, porém, além do déficit de dopamina, outros neurotransmissores também estão reduzidos, como a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA). Portanto, a hipótese da redução das aminas cerebrais, associada à hipótese psicogênica como consequência das limitações motoras, são as mais aceitas na tentativa de esclarecer a fisiopatologia da depressão na DP (KANDA et. al., 2008; POLITIS et. al., 2012; SANTIAGO et. al., 2015).

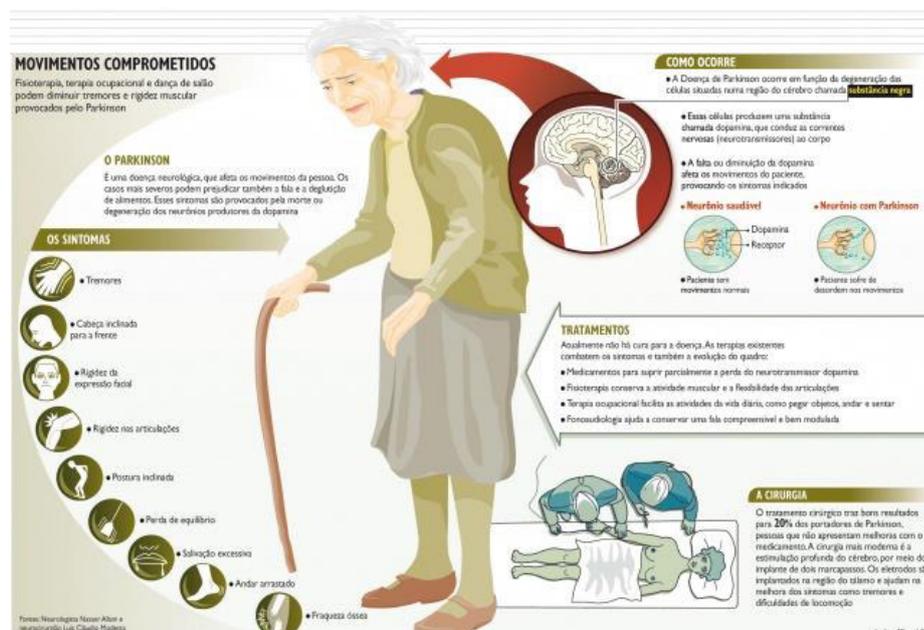
A perda de energia e interesse, anedonia, dificuldade de tomar decisões, sentimento de tristeza, desamparo e distúrbio de sono são alguns dos sintomas decorrentes da DM mais comumente observados. Vários desses sintomas também se

desenvolvem na depressão associada ao Parkinson. Muitas vezes, torna-se difícil diagnosticar essa depressão, uma vez que alguns dos sintomas podem ser mascarados pelos próprios sintomas da DP (POLITIS et. al., 2012; TORBEY et. al., 2015).

As deficiências de memória também são comuns em pacientes com DP, sendo que quadros de demência ocorrem em torno de 15% a 40% dos pacientes. Diferente da depressão, a perda de memória não antecede os sintomas motores. Costuma se desenvolver e se agravar conforme a evolução da doença (TITOVA et. al., 2017; AARSLAND et. al., 2012).

O comprometimento da memória observado na DP geralmente acomete a memória de trabalho, memória implícita, memória episódica e aprendizagem processual (LINDGREN; DUNNETT, 2012; SOLARI et. al., 2013). Essas deficiências de memória têm sido relacionadas aos déficits na transmissão dopaminérgica, mas também parecem ter associações com prejuízos de outros neurotransmissores, como serotonina, acetilcolina e glutamato (LINDGREN; DUNNETT, 2012; AARSLAND et. al., 2012).

Figura 4 - Ilustração de Paciente com Doença de Parkinson



Portanto, a investigação de sintomas não-motores tem ganhado suporte, nos últimos anos, com o objetivo de possibilitar um diagnóstico precoce da DP (OBESO et. al., 2010). Os sintomas da DP tornam-se altamente incapacitantes com a evolução

da doença. Pacientes com DP (Figura 4) tendem a apresentar perda da funcionalidade e autonomia para exercer suas atividades da vida diária, levando-os a se tornarem dependentes de familiares e/ou cuidadores, o que leva a uma redução da sua qualidade de vida (FILIPPIN et. al., 2014; TAKAHASHI et. al., 2016).

### **3.2.2 Etiologia da Doença de Parkinson**

Em relação a etiologia da DP acredita-se que é um resultado de uma combinação de fatores ambientais e genéticos (CORTI et. al., 2011; ZAVARIZ, 2012).

Na década de 1980, a hipótese de fatores ambientais envolvidos na DP foi apoiada pela identificação de uma droga sintetizada em laboratório chamada MPTP (1-metil-4-fenil1,2,3,6-hidropiridina), que causa a degeneração neuronal seletiva, levando a uma síndrome parkinsoniana em roedores, primatas e seres humanos. Desde então, um grande número de agentes ambientais, hábitos e condições foram examinados, incluindo toxinas industriais, metais pesados, tabagismo, ingestão de bebidas como chá ou café, a prática da agricultura e o estilo de vida rural (CORTI et. al., 2011; ZAVARIZ, 2012).

A maioria dos casos ocorre de forma esporádica, afetando aproximadamente 95% dos pacientes, geralmente com mais de 50 anos. Embora nesses casos a doença não seja herdável, uma história familiar positiva está associada com um risco elevado da DP (CORTI et. al., 2011).

Com relação aos fatores ambientais, tem se notado que a exposição frequente a herbicidas e pesticidas está relacionada com o desenvolvimento da doença, além da exposição crônica a metais pesados, como chumbo, manganês e cobre que está relacionada ao aparecimento de sintomas típicos da DP (GORELL et. al., 2004; HANCOCK et. al., 2008).

Estudos de longa data fazem referência a hereditariedade da DP, mesmo não se manifestando a doença, existe a chamada predisposição para o seu desenvolvimento e requer acompanhamento constante. Isso foi explicado por possíveis alterações genéticas que podem ocorrer com 10 genes diferentes já elucidados, condicionando a DP como uma doença de herança autossômica dominante e recessiva (ABELIOVICH; GITLER, 2016; ABID SHEIKH et. al., 2016; LIU et. al., 2016). A caracterização dessa forma da doença permitiu descoberta de dezoito locus cromossômicos denominados "PARK" que estão associados à DP (KLEIN;

WESTENBERGER, 2012). Algumas das mutações nestes genes estão associadas à forma familiar autossômica dominante (PARK 1, 4 e 8), ou autossômica recessiva da DP (PARK 2, 6,7, e 13) (DUQUE et. al., 2015).

Por outro lado, sabe-se também que o estresse oxidativo, a excitotoxicidade e a neuroinflamação têm papel fundamental na neurodegeneração. A respiração mitocondrial gera, por si só, uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, gerando o chamado estresse oxidativo, que intensifica a morte de neurônios. O próprio envelhecimento parece acentuar esse processo e, na DP, ele se torna ainda mais evidente. A ativação da micróglia pode ocorrer devido a esse processo de morte neuronal produzido pelo estresse oxidativo. Para tal, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios produzidos nas células da glia, que aumentam a neurotoxicidade e influenciam na neurodegeneração (MOSLEY et. al., 2006; SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013; SANTIAGO et. al., 2015).

A excitotoxicidade ocorre devido ao excesso de glutamato no meio extracelular, que promove a ativação constante de seus receptores, principalmente dos receptores de N-metil D-aspartato (NMDA), desencadeando um processo neurotóxico (STAYTE; VISSEL, 2014). Sabe-se hoje que essa superatividade está relacionada ao desenvolvimento de uma série de patologias, entre elas, as doenças neurodegenerativas (STAYTE; VISSEL, 2014).

Nesses casos, a neurotransmissão excitatória passaria a ocorrer de modo desenfreado levando à morte neuronal, alterando a excitabilidade da membrana e promovendo a ativação excessiva de enzimas intracelulares capazes de disparar uma cascata química destrutiva (STAYTE; VISSEL, 2014).

No entanto, a etiologia da DP ainda permanece desconhecida, porém é considerada um processo complexo que envolve vários mecanismos, tais como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, fatores genéticos, exposição a toxinas ambientais e processo inflamatório, porém o envelhecimento é considerado o principal fator de risco para a DP (DEXTER; JENNER, 2013; RIZEK; KUMAR; JOG, 2016).

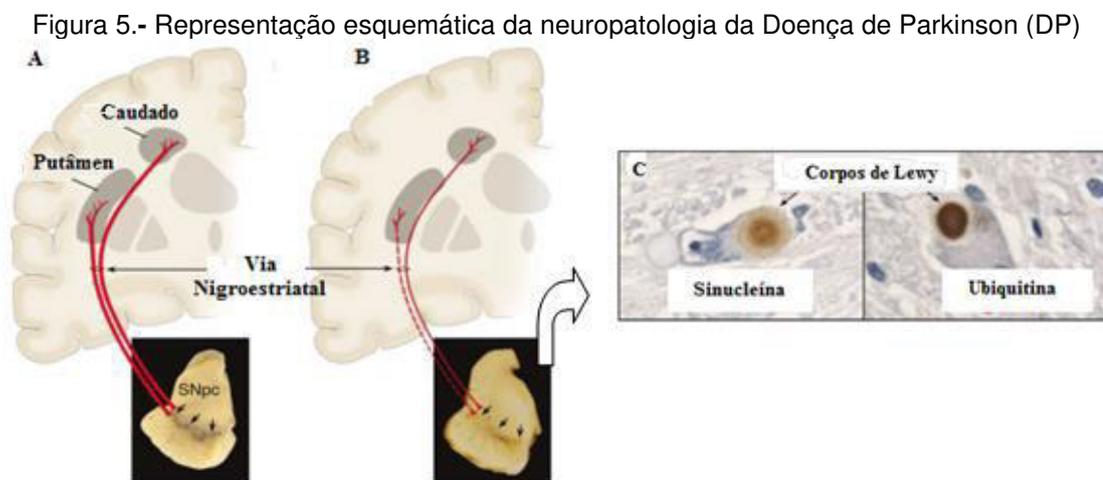
Múltiplas mutações genéticas têm sido associadas a DP, incluindo mutações dos genes da  $\alpha$ -sinucleína (SNCA), parkina (PARK2, PARK7) e Quinase 2 repetida rica em leucina (LRRK2). A exposição a toxinas ambientais, tais como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e rotenona, também tem sido relacionada ao desenvolvimento dos sintomas da DP. No entanto, mutações genéticas e exposição a toxinas ambientais são responsáveis por menos de 10% de todos os casos de DP,

sendo a maioria dos casos de etiologia desconhecida (GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015).

### 3.2.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

A origem neuroquímica da DP foi elucidada em 1960 por Hornykiewicz, que demonstrou que o conteúdo de dopamina (DA) da *substância negra parte compacta* (SNpc) e do núcleo caudado/putâmen (também conhecido como estriado) em encéfalos *post-mortem* de pacientes com a DP, era muito baixo, e estava associado à redução do número de neurônios dopaminérgicos (HORNYKIEWICZ, 2006; MEREDITH et. al., 2008).

Posteriormente, documentou-se que a DP estava relacionada a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos de todos os núcleos da base (núcleo caudado/putâmen, globo pálido, núcleo subtalâmico e *substância negra parte compacta*) e presença de agregados proteicos intraneuronais conhecidos como corpúsculos de Lewy (SELVARAJ et. al., 2012). Em estados avançados a degeneração pode prejudicar também a integridade funcional do córtex pré-frontal (SELVARAJ et. al., 2012).



Via nigroestriatal em condição normal (A) e na DP (B). Em (C), marcação imunohistoquímica demonstrando corpos de Lewy, contendo alfa sinucleína e ubiquitina.

Fonte: (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003)

Histopatologicamente a DP é caracterizada pela degeneração de neurônios pigmentados dopaminérgicos da Substância Negra parte compacta (SNpc) e consequente redução dos níveis de dopamina no estriado (núcleo caudado e putâmen). Também são observadas inclusões intra-citoplasmáticas denominadas Corpos de Lewy, compostos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (Figura 5),

nos neurônios remanescentes. No entanto, estudos imunohistoquímicos têm demonstrado que os Corpos de Lewy contêm mais de 90 moléculas (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015; WAKABAYASHI et. al., 2013).

Outra característica neuropatológica observada em pacientes da DP é a presença de corpúsculos de Lewy em diversas regiões mesencefálicas. Esses corpúsculos tratam-se de agregados proteicos arredondados de proteínas neurofilamentares como  $\alpha$ -sinucleína (de forma mais expressiva), ubiquitina, sinfilina-1 e proteínas proteossomais, que se distribuem perinuclearmente de forma difusa nos neurônios remanescentes da SNpc, córtex cerebral e núcleos monoaminérgicos do tronco encefálico (BLANDINI et. al., 2000; FUCHS et. al., 2004; ELBAZ; TRANCHANT, 2007; CICCHETTI et. al., 2009).

Na DP também é descrito a presença dos neuritos de Lewy, que possuem composição semelhante aos corpúsculos de Lewy, entretanto possuem arranjo tridimensional alongado e se localizam preferencialmente nos axônios. Esses agregados proteicos se acumulam nos neurônios acarretando em neurotoxicidade com consequente morte neuronal e redução da aferência dopaminérgica para o núcleo caudado/putâmen (MCKEITH; MOSIMANN, 2004; CICCHETTI et. al., 2009).

A fisiopatologia da DP está associada à disfunção dos sistemas neurotransmissores, principalmente, por uma redução nas concentrações de dopamina no estriado em decorrência da perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (BURCH; SHEERIN, 2005)

Os “gânglios da base” podem ser entendidos como um conjunto de estruturas subcorticais importantes para controlar e iniciar os movimentos, pois regulam o fluxo das informações provenientes do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinhal. Além do papel desempenhado no controle motor, os gânglios da base estão envolvidos em várias funções emocionais e cognitivas (PURVES, 2010). Constituem os gânglios da base: (a) estriado, formado pelo núcleo caudado e putâmen; (b) globo pálido, que se divide em globo pálido externo (GPe) e globo pálido interno (GPi); (c) substância negra, dividida em parte compacta (SNpc) e parte reticulada (SNpr) e o (d) núcleo subtalâmico (NST) (BRUNTON et. al., 2012; KANDEL et. al., 2014).

As informações provenientes do estriado são projetadas para os núcleos de saída, que são o GPi e a SNpr. A projeção do estriado para os núcleos de saída é realizada por duas vias diferentes: via direta e via indireta (UC; FOLLET, 2007).

A via direta transfere informação do estriado para os núcleos de saída (GPi/SNpr), resultando na desinibição do tálamo, o que intensifica estímulos excitatórios do tálamo ao córtex cerebral, facilitando o movimento. O neurotransmissor inibitório que participa da via direta é o ácido gama-aminobutírico (GABA) (BRUNTON et. al., 2012; UC; FOLLET, 2007).

A via indireta transmite a informação do estriado ao GPe. Por sua vez, essa estrutura envia projeções para o NST, que gera estímulos eferentes para a os núcleos de saída (GPi/SNpr). Assim como ocorre com a via direta, as duas conexões iniciais – projeções do estriado para o GPe e deste para o NST – utilizam o neurotransmissor inibitório GABA. Contudo, a conexão final – projeção do NST para os núcleos de saída (GPi/SNpr) – é uma via glutamatérgica excitatória. Desta forma, a estimulação da via indireta resulta na redução da saída dos estímulos excitatórios, inibindo o tálamo, e consequentemente, inibindo o movimento (BRUNTON et. al., 2010; UC; FOLLET, 2007).

A SNpc através da via nigroestriatal, libera dopamina no estriado, sendo um dos moduladores da atividade dos gânglios da base. Nos neurônios espinhosos médios do corpo estriado, estão os dois principais tipos de receptores para a dopamina: D1 (excitatório) na via direta e D2 (inibitório) na via indireta. Desse modo, a dopamina liberada no estriado tende a aumentar a atividade da via direta e reduzir a da via indireta. Enquanto que a depleção de dopamina que ocorre na DP produz o efeito contrário. A estimulação dopaminérgica reduzida, consequentemente, acentua os estímulos inibitórios provenientes dos núcleos de saída (GPi/SNpr) para o tálamo e reduz a excitação do córtex cerebral, determinando assim, as manifestações dos sintomas motores da DP (BRUNTON et. al., 2012; PURVES et. al., 2010), podemos observar na Figura 6 abaixo.

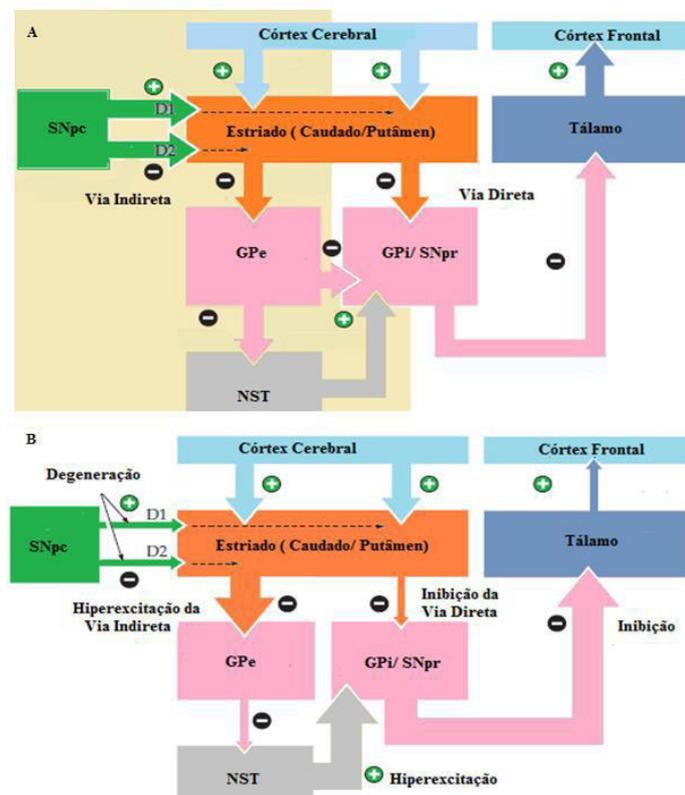
Na via direta expressam altos níveis de receptores dopaminérgicos tipo D1 e receptores muscarínicos M4, e co-expressam dinorfina e substância P. Em contraste, os da via indireta expressam altos níveis de receptores dopaminérgicos tipo D2 e receptores de adenosina A2, e co-expressam encefalina (KREITZER, 2009; OBESO et. al., 2010).

Os receptores dopaminérgicos D1 e D2 são receptores metabotrópicos e estão ligados a diferentes vias de sinalização intracelular (diferentes tipos de proteína G). A dopamina exerce efeitos distintos sobre estes receptores, ao apresentar efeito excitatório sobre os receptores D1 na via direta e efeito inibitório sobre os receptores

D2 na via indireta. Desta forma, em condições fisiológicas (Figura 6A), os efeitos da dopamina no sistema nigroestriatal resulta em uma facilitação da via tálamo-cortical e consequente liberação do movimento (GALVAN; DEVERGNAS; WICHMANN, 2015).

Na DP, os neurônios aferentes dopaminérgicos para o estriado são perdidos e o funcionamento das vias direta e indireta torna-se alterado. A depleção de dopamina no estriado causa uma hiperativação da via indireta e um hipoativação da via direta, o que promove uma hiperestimulação do NST e Gpi/SNr e uma inibição da via tálamo-cortical (Figura 6B), resultando em uma redução da atividade locomotora e movimentos (CALABRESI et. al., 2014).

Figura 6 - Esquema representativo do efeito da dopamina nas vias direta e indireta



Em condições fisiológicas (A) e na DP (B). (+) excitação, (-) inibição. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalâmico; SNpr: substância nigra parte reticulada; SNpc: substância nigra parte compacta

Fonte: (PURVES et. al., 2005)

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que outras regiões cerebrais, tais como área tegumentar ventral (VTA- *ventral tegumentar area*), locus ceruleus e núcleos da rafe, também estão comprometidas em pacientes com DP. Todos estes núcleos também degeneram e apresentam corpos de Lewy, sugerindo um processo patogênico similar ao que ocorre na SNpc. Portanto, outros sistemas de

neurotransmissão tais como o noradrenérgico e serotoninérgico também estão envolvidos na fisiopatologia da DP e tem sido relacionado aos sintomas não-motores da DP (DEXTER; JENNER, 2013; OBESO et. al., 2010).

### **3.2.4 Estresse Oxidativo e Doença de Parkinson**

Na DP o estresse oxidativo desempenha um papel importante na degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP, interrupções na manutenção fisiológica do potencial redox nos neurônios interferem em vários processos biológicos, levando à morte celular (DIAS et. al., 2013). É definido como a situação na qual a formação de espécies reativas (de oxigênio, nitrogênio, etc.) excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo da célula, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula levando-a a morte por apoptose precoce ou necrose (BARBOSA et. al., 2006).

Caracterizado pela presença de radicais livres, os quais são moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, sendo denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente. Os radicais livres podem reagir com substratos biológicos e causar danos a organelas e macromoléculas e, conseqüentemente, promover dano a saúde do organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são metabólitos ubíquos, reativos e de curta meia-vida, produzidos durante o metabolismo do oxigênio em todos os sistemas biológicos (ZHOU et. al., 2008).

Regiões encefálicas ricas em catecolaminas são extremamente vulneráveis a geração de radicais livres (MOSLEY et. al., 2006), a DA, por exemplo, durante o seu processo de metabolismo gera radicais livres como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). A metabolização da DA pode ocorrer através de enzimas como a monoamino oxidase (MAO) ou por decomposição espontânea através da auto-oxidação, neste caso ocorre liberação do radical livre  $H_2O_2$  e DA-quinona. Níveis elevados de  $H_2O_2$  podem liberar íons férricos de heme proteínas, como a hemoglobina e citocromo, que por sua vez reduzem o  $H_2O_2$  a

radical hidroxila (HO<sup>-</sup>). O HO<sup>-</sup> é o radical mais reativo encontrado *in vivo* capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA. Portanto, o metabolismo da DA pode agravar os danos nos tecidos pelo aumento dos níveis do radical livre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MOSLEY et al, 2006; BARBOSA et. al., 2006).

Os neurônios dopaminérgicos são particularmente susceptíveis ao estresse oxidativo, pois EROs são geradas durante o metabolismo da dopamina. Além disso, neurônios dopaminérgicos da substância negra contêm ferro (Fe<sup>2+</sup>), o qual reage com peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton, e produz o radical hidroxila (HO<sup>-</sup>). O HO<sup>-</sup> é o radical mais deletério ao organismo, pois apresenta uma meia-vida curta e dificilmente é sequestrado *in vivo* pelas enzimas antioxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HWANG, 2013; UTTARA et. al., 2009).

Na DP, a degeneração de neurônios dopaminérgicos leva a um aumento do metabolismo da dopamina pelos neurônios remanescentes e uma produção excessiva de EROs, resultando em aumento do estresse oxidativo. Em casos idiopáticos e genéticos da DP, o estresse oxidativo exerce uma função crítica na fisiopatologia da doença, e tem sido implicado como um mecanismo que leva a disfunção celular e eventual morte neuronal (BLESA et. al., 2015).

A presença de excesso de ferro, diminuição de glutathiona reduzida (GSH), diminuição da atividade da superóxido dismutase, peroxidação lipídica, modificação de proteínas e DNA e lesão oxidativa na SNPc de pacientes com DP sugerem um estado de estresse oxidativo e lesão oxidativa. Os neurônios dopaminérgicos da SNPc parecem ser especialmente vulneráveis a EROs (HASHIMOTO et. al., 2003).

A degradação espontânea da dopamina resulta na produção de radicais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ânion hidroxila e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios. Essas espécies reativas poderiam atacar facilmente o DNA mitocondrial, por ser este desprovido de histonas protetoras, resultando em alteração desta estrutura. (ASANUMA et. al., 2004; BISAGLIA et. al., 2014).

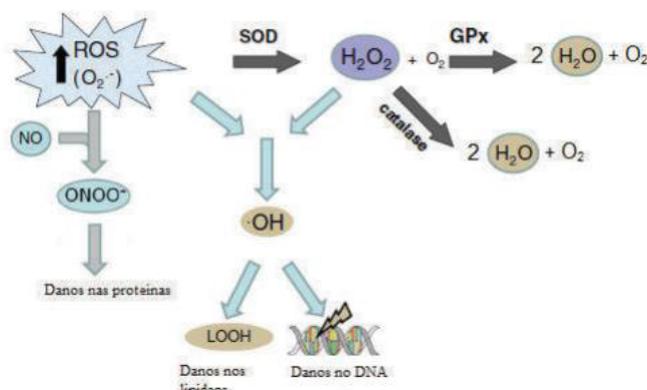
A citotoxicidade dos radicais livres está relacionada com a habilidade dessas moléculas de oxidar constituintes celulares, particularmente membranas lipídicas, proteínas e DNA e sinalizar a iniciação de apoptose. As EROs são geradas durante o funcionamento celular normal, principalmente durante a respiração mitocondrial e são inativadas por antioxidantes endógenos (FISKUM et al, 2003).

O estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo de desintoxicar por meio de seus antioxidantes. Os radicais livres que danificam principalmente as células incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), o óxido nítrico (NO) e o radical superóxido, enquanto os antioxidantes importantes no corpo humano incluem moléculas de baixo peso molecular tais como GSH, vitaminas C e E, além de enzimas como SOD (superóxido dismutase), catalase, glutathione peroxidase e ácido úrico (WEI et. al., 2018).

Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir ou evitar a oxidação de uma biomolécula, seja através da interação e estabilização de espécies reativas ou transformando-as em moléculas mais estáveis, reduzindo a sua reatividade (HALLIWEL, 2011; MARCHIORO et. al., 2016). O sistema antioxidante é formado por componentes enzimáticos, representado pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Enquanto que o sistema não enzimático é composto por antioxidantes endógenos, como a GSH, coenzima Q10, e antioxidantes exógenos, adquiridos na dieta, como vitaminas (vitamina C, vitamina E e vitamina B2), minerais (zinco e selênio), carotenóides e compostos fenólicos (VASCONCELLOS et. al., 2007; MARCHIORO et. al., 2016).

A SOD catalisa a conversão dos radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e, em seguida, o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio pela catalase e glutathione peroxidase. A glutathione peroxidase também converte nitrato em nitrito, o que indica a atividade do NO. O ácido úrico é convertido pela xantina oxidase durante o passo limitante do catabolismo das purinas exemplificado nas Figuras 7 e 8 abaixo.

Figura 7 - Mecanismo de defesa antioxidante



Fonte: (DIAS et. al. 2013, WEI et. al., 2018)

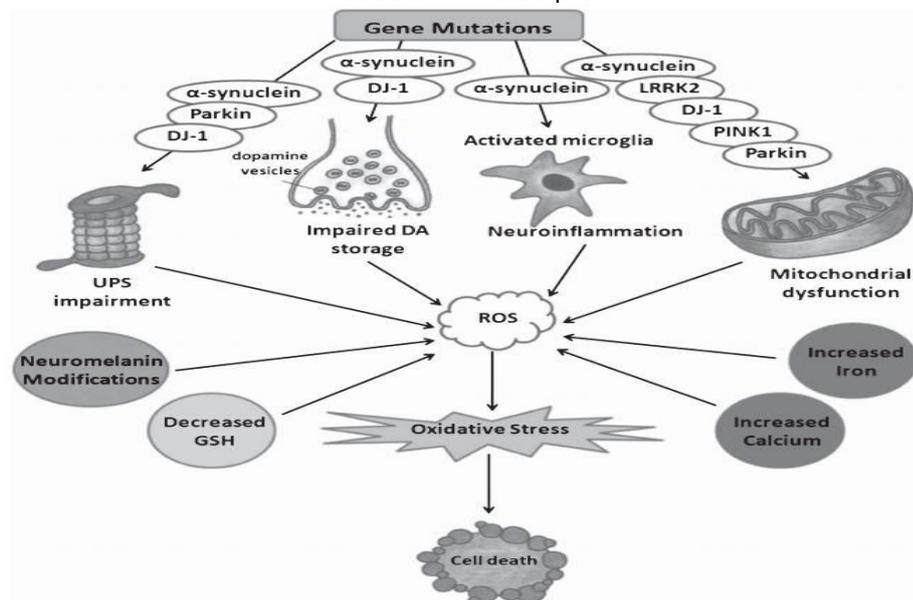
A falha do sistema de defesa antioxidante em proteger contra a geração de radicais livres danifica todos os componentes da célula, incluindo DNA, lipídios e

proteínas, levando eventualmente à morte celular, que tem sido importante no desenvolvimento da DP (DIAS et. al. 2013, WEI et. al., 2018).

Entretanto, agentes antioxidantes representam uma estratégia terapêutica atrativa para a prevenção ou tratamento da neurodegeneração observada na DP (KOPPULA et. al., 2012; PÉREZ-HERNÁNDEZ et. al., 2016; SHAHPIRI et. al., 2016).

No envelhecimento, bem como no caso de diversas doenças neurodegenerativas, há um declínio nos mecanismos de defesa antioxidante normais, aumentando a vulnerabilidade do cérebro para os efeitos deletérios do dano oxidativo e as enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT, GPx e a glutathiona redutase (GSH-Rd) encontram-se com as atividades reduzidas (BURGENER et. al., 2008; MYTHRI et. al., 2011; TRUSHINA; MCMURRAY, 2007). A baixa ingestão dietética de substâncias antioxidantes pode contribuir também para o aumento das concentrações de espécies reativas no organismo, e assim, por estas razões, a manutenção do balanço em favor dos antioxidantes é de essencial importância para a integridade do cérebro (CHIEN et. al., 2014; DANTAS; FRANK; SOARES, 2008; GUERREIRO, 2010; MARCHIORO et. al., 2016).

Figura 8 - Mecanismos que levam ao estresse oxidativo na DP e o papel dos produtos gênicos relacionados à DP nesse processo



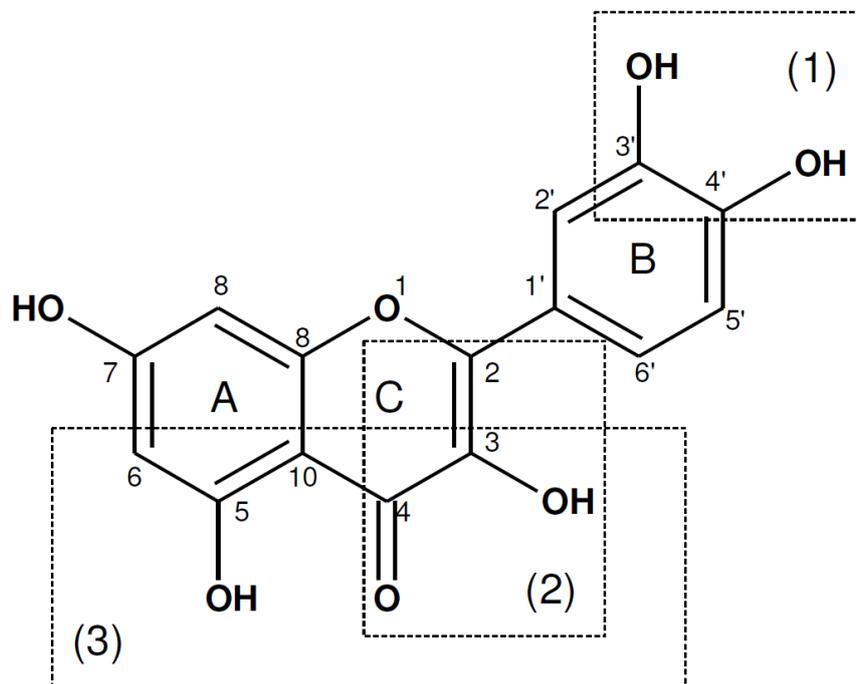
DA = dopamina; EROs = espécies reativas de oxigênio; UPS = sistema ubiquitina-proteassoma; GSH = glutathiona

O reino vegetal é uma fonte riquíssima de moléculas antioxidante naturais, dentre essas se destacam os polifenóis pela sua extensa capacidade ou variedade de atividades biológicas como cardioprotetora, anti-inflamatória, antitumoral,

antienvhecimento e outras muito uteis na prevenção ou manejo de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e neoplasias (LI et. al., 2013).

Os flavonóides são polifenóis responsáveis por vários efeitos biológicos devido a sua extensa capacidade antioxidante. Essa atividade antioxidante dos flavonóides é dependente das estruturas nucleares e arranjos de seus grupos funcionais. Dentre as principais características estruturais responsáveis pela capacidade sequestradora de EROs estão: (a) presença do grupo catecol no anel B, determinante para deslocalização eletrônica; (b) dupla ligação na posição 2,3 conjugada à função cetônica no C-4 no anel C, importante para reforço da deslocalização de elétrons no anel B e (c) grupos hidroxilas nas posições 3 dos aneis A e C, respectivamente, proporcionando a formação de pontes de hidrogênio com o grupo cetônico de acordo com a Figura 9 em seguida (CHAGAS et. al., 2018)

Figura 9 - Principais características estruturais dos flavonoides requeridas para sequestro de espécies reativas

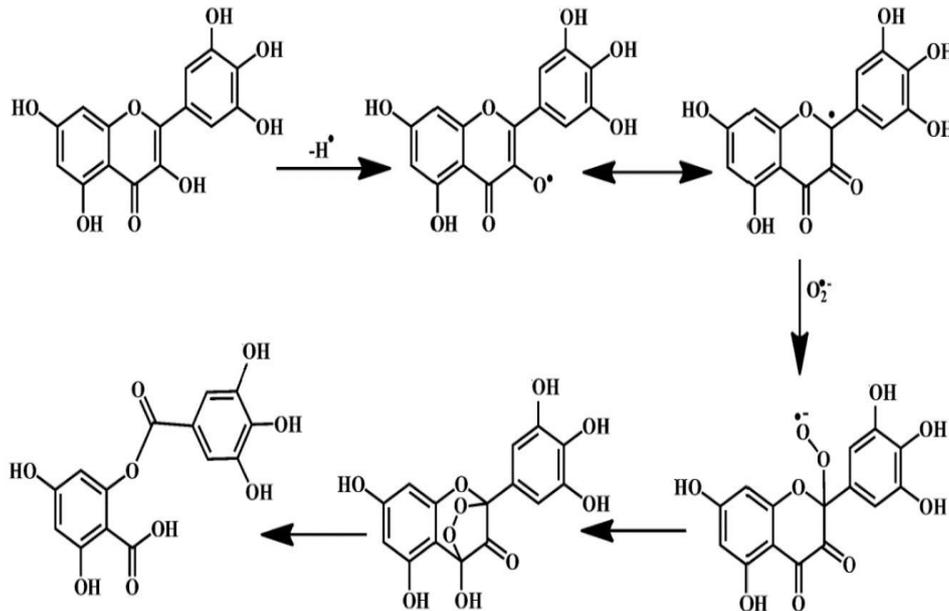


- (1) presença do grupo catecol no anel B; (2) dupla ligação em C-2,3 e carbonila no anel C;  
 (3) hidroxila em C-3 (anel A) e C-5 (anel C)

Fonte: (CHAGAS et. al., 2018).

Dentre os flavonóides a miricetina se destaca pela sua capacidade sequestradora de EROs, que acontece pelo mecanismo de sequestro do ânion radical superóxido demonstrado na Figura 10 abaixo (PROCHÁZKOVÁ et. al., 2011).

Figura 10 - Mecanismo da atividade da miricetina no sequestro do ânion radical superóxido



Fonte: (CHAGAS, 2018)

A potente atividade antioxidante caracterizada pela estruturas químicas dos flavonoides tornam este um metabólito muito útil na prevenção e atenuação de danos causados pelas EROs. A exemplo de fontes de flavonoides destaca-se o *Syzygium cumini*, como uma espécie vegetal com elevado teor de flavonoides e grandes perspectivas terapêuticas. (AGATI et. al., 2012; CHAGAS et. al. 2018).

### 3.2.5 Inflamação e Doença de Parkinson

Avanços recentes revelam o envolvimento direto de processos inflamatórios e oxidativos da SNpc na DP. A patogênese da DP envolve especificamente degeneração neuronal dopaminérgica grave na SNpc e estriado. A morte celular neuronal dopaminérgica é devida à cascata inflamatória, incluindo ativação microglial e secreção excessiva de agentes citotóxicos, como citocinas pró-inflamatórias e radicais livres. Assim, considerando a importância da inflamação na progressão da DP, estratégias neuroprotetoras e anti-inflamatórias podem oferecer uma intervenção terapêutica promissora para o tratamento e manejo da DP (MANDAL et. al., 2017).

Várias evidências indicam que a neuroinflamação exerce uma função crítica na patogênese da DP (WANG; LIU; ZHOU, 2015; ALCALY, 2016). A neuroinflamação consiste numa integração complexa de respostas de todas as células imunes

presentes no SNC, incluindo microglia, astrócitos e linfócitos-T infiltradas (LE; WU; TANG, 2016).

O papel para a neuroinflamação na fisiopatologia da DP é mediada principalmente por microglia ativada. Microglia são células fagocíticas, componentes da imunidade inata sistema do sistema nervoso central, que geralmente são um fenótipo em repouso, mas tornam-se ativadas no cérebro podendo gerar lesão ou desafio imune. A Microglia ativada é uma fonte importante de superóxido e óxido nítrico, que por sua vez contribuem para a oxidação e nitratividade levando a estresse no microambiente cerebral, podendo também promover a neurodegeneração produzindo outras substâncias agentes tóxicos, como glutamato e fator necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ). (DIAS et. al. 2013).

McGeer et. al. (1988) mostraram a presença de microglia reativa na SNpc de pacientes com DP, onde a microglia reativa foi observada próxima a neurônios dopaminérgicos contendo melanina e foi associada com a neurodegeneração destes neurônios. Imamura et. al. (2003) demonstraram microglia reativa na SNpc e putamen de pacientes com DP, além de marcação positiva para as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 (interleucina-6) no putamen, sugerindo que a neuroinflamação está associada com o dano neuronal presente na DP. Esta hipótese é suportada pelos resultados de um estudo *in vivo* que utilizou tomografia por emissão de pósitrons em pacientes com DP e demonstrou um aumento na ativação microglial nos estágios iniciais da DP (pacientes em estágios I e II da DP). Esta ativação microglial foi correlacionada negativamente com a densidade dopaminérgica no putamen e positivamente ao comprometimento motor de pacientes com DP (OUCHI et. al., 2005).

Segundo Dias et. al. (2013) a ativação microglial é observado em modelos *in vitro* e *in vivo* utilizando toxinas como rotenona ou 6-OHDA, bem como com lipopolissacarídeo dopaminérgico, onde a morte neuronal libera proteínas oxidadas, lipídios e DNA no espaço extracelular que são reconhecidos como moléculas danificadas por microglia causando sua ativação. Ativação microglial, por sua vez, leva a um aumento da formação de citocinas, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e diminuiu secreção de fatores tróficos responsáveis pela normal manutenção normal da viabilidade neuronal.

Os astrócitos também exercem funções importantes no processo inflamatório da DP. A astrogliose dentro do SN leva à ativação local da microglia, mas a microglia também tem um duplo papel no cérebro, agindo como células neuroprotetoras através

da eliminação de substâncias endógenas ou exógenas, e eles têm altos níveis de GSH e glutathiona peroxidase, que agem para protegê-los dos níveis tóxicos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (DIAS et. al. 2013).

Uma astrogliose reativa pode ser observada em tecidos post-mortem de pacientes com DP e em modelos animais da DP (RAPPOLD; TIEU, 2010; WANG; LIU; ZHOU, 2015). Os astrócitos são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias sob condições patológicas, e podem ser ativados por citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  liberadas pela microglia (RAPPOLD; TIEU, 2010). Desta forma, os astrócitos podem atuar sinergicamente com a microglia e amplificar a resposta imune, aumentando a produção de fatores neurotóxicos e induzindo a morte de neurônios dopaminérgicos (SAIJO et. al., 2009).

Um recente estudo demonstrou que a concentração de citocinas, incluindo interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-2, foi significativamente mais elevada no plasma de pacientes com DP comparados com os indivíduos controle (QIN et. al, 2016). Estudos utilizando modelos animais da DP também demonstraram aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos animais tratados com neurotoxinas (MACHADO-FILHO et. al., 2014; HAAS et. al., 2016).

Segundo Wei et. al. (2018) vários estudos nos últimos vinte anos mostraram um importante papel da neuroinflamação na DP através da degeneração da via dopaminérgica nigrostriatal tendo como característica da neuroinflamação a ativação de células gliais cerebrais, principalmente micróglia e astrócitos, que liberam vários fatores solúveis, como radicais livres, citocinas e metabólitos lipídicos. Muitos desses fatores são pró-inflamatórios e neurotóxicos e particularmente são prejudiciais aos neurônios dopaminérgicos nigros que também são vulneráveis ao dano oxidativo.

Todos estes estudos e observações sugerem que a neuroinflamação com suas conseqüências, incluindo o estresse oxidativo é um componente crítico da patogênese da DP (DIAS et. al., 2013). Considerando o processo inflamatório como um dos mecanismos que induzem a neurodegeneração na DP, fármacos anti-inflamatórios têm sido considerados para o tratamento de pacientes com DP (ROCHA; DE MIRANDA; TEIXEIRA, 2015).

### 3.2.6 Tratamento Farmacológico da Doença de Parkinson

O tratamento da DP é fundamentalmente farmacológico, iniciando com a levodopa é o precursor metabólico da dopamina e isoladamente o fármaco mais eficaz para o tratamento da DP, este fármaco ao entrar no sistema nervoso central (SNC), é convertido em dopamina por descarboxilação, principalmente dentro das terminações pré-sinápticas dos neurônios dopaminérgicos do estriado. Na prática, o uso deste fármaco está associado à Carbidopa ou Benserazida, pois administrada isoladamente ela é em grande parte descarboxilada pelas enzimas presentes na mucosa intestinal e em outros tecidos periféricos. O uso desta alivia alguns dos sintomas relacionados à função motora da DP (RANG et. al., 2007; FERREIRA et. al., 2010).

O pramipexol é outra droga utilizada no tratamento da DP que possui afinidade preferencial pela família de receptores D3. Mostra-se eficaz quando utilizado como monoterapia no parkinsonismo leve. O pramipexol também é útil em pacientes com doença avançada, permitindo uma redução da dose de levodopa e atenuação das flutuações nas respostas. Pode melhorar os sintomas afetivos. Foi sugerido um possível efeito neuroprotetor, em virtude de sua capacidade de eliminar peróxido de hidrogênio e intensificar a atividade neurotrófica em culturas de células dopaminérgicas mesencefálicas. O pramipexol sofre rápida absorção e atinge concentrações plasmáticas máximas em cerca de 2 horas, sendo excretado, em grande parte, na sua forma inalterada na urina (AMINOFF, 2006; FERREIRA et. al., 2010).

Enquanto que a amantadina é um agente antiviral com propriedades antiparkinsonianas, seu modo de ação no parkinsonismo ainda não foi esclarecido, porém a droga pode potencializar a função dopaminérgica ao influenciar a síntese, a liberação de catecolaminas a partir das reservas periféricas, ela é menos potente do que a levodopa e seus benefícios podem ser de curta duração, desaparecendo frequentemente depois de apenas algumas semanas de tratamento (RIBEIRO, 2002; FERREIRA et. al., 2010).

A selegilina é outro fármaco utilizado no tratamento da DP, um inibidor irreversível da monoamina oxidase B (MAO-B), uma enzima importante no metabolismo da dopamina. Em virtude do bloqueio do seu metabolismo, a dopamina torna-se mais disponível para estimular seus receptores. A selegilina como monoterapia pode ser eficaz no paciente recém-diagnosticado com DP, visto que seu

efeito farmacológico potencializa ações da dopamina endógena, podendo ser utilizada em associação com levodopa-carbidopa no estágio mais avançado do parkinsonismo (SONSALLA, 2005; FERREIRA et. al., 2010).

O Biperideno é um agente antimuscarínico, empregado como adjuvante na terapia antiparkinsoniana. Recomenda-se seu uso no controle sintomático do parkinsonismo, sendo útil para a diminuição dos tremores, bradicinesia, rigidez, melhora da fala e marcha (RIBEIRO, 2002). Enquanto que a Entacapona e Tolcapona prolongam a ação da levodopa ao diminuir o seu metabolismo periférico podendo serem úteis em pacientes que fazem uso de levodopa, que desenvolveram flutuações da resposta resultando em resposta mais atenuada, e na opção de reduzir a dose diária total de levodopa (AMINOFF, 2006; FERREIRA et. al., 2010).

O tratamento farmacológico da DP não mudou substancialmente nos últimos 30 anos e a terapia dopamimética é o padrão-ouro. A L-dopa e os agonistas dopaminérgicos são os principais fármacos utilizados, mas uma série de inibidores enzimáticos (inibidores periféricos da descarboxilase, inibidores da catecol-O-metil-transferase e inibidores da monoaminoxidase-B, MAO-B) também apoiam a terapia dopamimética (FRIAS et. al., 2014)

O tratamento da DP tem sido inteiramente sintomático, baseado em estratégias que visam restaurar ou aumentar os níveis de dopamina, principalmente através da administração da L-DOPA, um precursor deste neurotransmissor. A maioria dos pacientes com DP respondem bem a L-DOPA. Contudo, 40% a 50% dos pacientes desenvolvem flutuações motoras e discinesias dentro de 5 anos de tratamento crônico e 70% a 80% dos pacientes apresentam complicações motoras após 10 anos de tratamento (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016). Lang e Obeso, 2004 completam afirmando que a introdução da levodopa revolucionou o tratamento da doença de, contudo flutuações motoras e discinesias complicam o tratamento com a levodopa, na maioria dos pacientes, dentro de 5-10 anos do início do tratamento (BISAGLIA et. al., 2014).

A dopamina produzida a partir da L-DOPA pode ser metabolizada em espécies reativas de oxigênio, produzindo estresse oxidativo. Desta forma, estudos tem sugerido que o uso prolongado de L-DOPA pode causar uma toxicidade aos neurônios dopaminérgicos e acelerar o processo de neurodegeneração, além de causar efeitos colaterais (OLANOW, 2015; STAYTE; VISSEL, 2014).

Outros fármacos também são utilizados como coadjuvantes da L-DOPA. Destacam-se os agonistas dopaminérgicos, inibidores das enzimas monoamina

oxidase (MAO) e catecol o-metil transferase (COMT), agentes anticolinérgicos, antagonistas do receptor A2A de adenosina e antagonistas glutamatérgicos. Todas estas drogas apresentam efeito sobre os sintomas motores, porém demonstram pouco ou nenhum efeito sobre os sintomas não-motores da DP, além de não serem capazes de retardar a progressão da doença (DEXTER; JENNER, 2013; FAHN, 2015; STAYTE; VISSEL, 2014).

Os tratamentos disponíveis não possuem efeito neuroprotetor comprovado, por isso, ao longo dos últimos anos, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar novas drogas com atividade neuroprotetora capazes de prevenir ou retardar a progressão da DP (STAYTE; VISSEL, 2014). Estas terapias têm ação sintomática e não diminuem ou param a degeneração neuronal, por isso pesquisas com produtos naturais que apresentem propriedades neuroprotetoras representam uma importante fonte de novos compostos bioativos contra esta enfermidade.

### 3.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

Modelos animais são fundamentais para os avanços das ciências médicas, pois nos permitem o estudo dos mecanismos patogênicos e dos princípios terapêuticos do tratamento e dos sintomas das doenças humanas mimetizadas. Estes refletem as características da doença no homem, simulam as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença e seus distúrbios funcionais (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003; LIMA et. al., 2006). Entretanto a DP é uma doença humana, e não se manifesta espontaneamente em animais, sendo necessária a indução da doença através da administração de agentes neurotóxicos. Infelizmente ainda não existe um modelo que pode de forma independente representar fidedignamente todos os sinais da DP (CUNHA et. al., 2008; SCHOBBER, 2004).

O conhecimento sobre a fisiopatologia e o tratamento da DP é oriundo de estudos realizados com animais submetidos a diferentes modelos experimentais, destacando a importância destes modelos para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos da DP e para o estudo de novas intervenções terapêuticas para esta doença (DUTY; JENNER, 2011; STAYTE; VISSEL, 2014). Ao longo das últimas décadas, vários modelos animais da DP têm sido desenvolvidos. Onde são classificados em dois grupos: modelos tóxicos e modelos genéticos, e algumas vezes, ambos podem ser combinados. Os modelos tóxicos são induzidos através do uso de

neurotoxinas sintéticas ou ambientais, enquanto que os modelos genéticos utilizam a expressão *in vivo* de mutações relacionadas a DP (BLESA et. al., 2012).

Os modelos animais de DP induzidos por fármacos, tais como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), reserpina, paraquat, maneb, rotenona e ferro, são capazes de reproduzir algumas alterações na sinalização das vias direta e indireta dos núcleos da base, resultando em características fisiopatológicas e sintomáticas similares aquelas observadas em pacientes com DP (BLESA et. al., 2012; PROU; PRZEDBORSKI, 2005).

### **3.3.1 Modelo da Doença de Parkinson induzido pela rotenona**

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar as doenças neurodegenerativas entre os quais alguns modelos genéticos e outros farmacológicos. A 6-hidroxidopamina, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina e a rotenona são alguns dos modelos farmacológicos de indução da doença de Parkinson. É nas mitocôndrias que o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina e a rotenona produzem a intoxicação, levando, em modelos animais, a sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson observados em seres humanos (BETARBET et. al., 2002), observados na Figura 8.

A rotenona é uma substância química que pertence à família das isoflavonas, utilizada como um inseticida de amplo espectro. A sua meia-vida é de 3-5 dias, dependendo da exposição solar (CICCHETTI et. al., 2009). É altamente lipofílica e não é dependente do transportador de dopamina. Uma vez dentro da célula a rotenona acumula-se no complexo I mitocondrial, onde inibe a transferência de elétrons de ferro-enxofre (Fe-S) aumentando a produção de EROs que podem interagir com NO, especialmente O<sub>2</sub> e HO<sup>-</sup>, levando à formação de ONOO<sup>-</sup>, resultando em danos aos neurônios dopaminérgicos (DAUER et al, 2003; CANNON et al, 2009). A rotenona liga-se no mesmo local que o MPTP e inibe o complexo mitocondrial (CICCHETTI et. al., 2009).

O modelo da rotenona foi proposto por Alam e Schmidt (2002) em que a rotenona é um potente membro dos rotenóides, pertencentes à família dos isoflavonóides obtidos de plantas leguminosas tropicais e comumente usada como pesticida em plantações (MAPOPE; DAKORA, 2013). Atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e acumula-se em organelas intracelulares como as mitocôndrias (PERIER et. al., 2003; KARUPPAGOUNDER et. al., 2013). O modelo da rotenona

promove uma inibição sistêmica do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, pois inibe a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (PERIER et. al., 2003; CANNON et. al., 2009; KARUPPAGOUNDER et. al., 2013).

Esta inibição contribui para o aumento da habilidade deste pesticida produzir as EROs e, conseqüentemente, gerar estresse oxidativo, pois reagem e formam radicais hidroxilados, altamente tóxicos, com subsequente aumento na peroxidação lipídica, danos no DNA e desorganização do citoesqueleto celular. Na presença deste inseticida, os elétrons provenientes da nicotinamida adenina dinucleotídeo não podem entrar na cadeia de transporte de elétrons, o que resulta na incapacidade de produzir adenosina trifosfato a partir da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (BERNDT et. al., 2013).

Devido ao dano mitocondrial ocorre entrada excessiva de cálcio e escape de citocromo-C mitocondrial. O acúmulo de radicais também produz inflamação, reação microglial e finalmente apoptose (LEE et. al., 2014). Estudos realizados por Sherer e colaboradores (2003) mostrou que a exposição subcutânea à rotenona (2-3 mg/kg) causa lesões seletivas nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, com a formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína no citoplasma dos neurônios da substância negra, não sendo observado degeneração em outras regiões cerebrais. O mecanismo pelo qual a  $\alpha$ -sinucleína está relacionada à doença de Parkinson e a morte de neurônios dopaminérgicos ainda não foi completamente elucidado, porém evidências de estudos prévios indicam que a vulnerabilidade deste tipo de célula pode estar relacionada ao potencial oxidativo e citotóxico da dopamina (PEREZ et. al., 2002).

A rotenona parece replicar quase todas as características da DP, incluindo o bloqueio do complexo I mitocondrial, alterações comportamentais, neuroinflamação, estresse oxidativo, agregação da  $\alpha$ -sinucleína e formação dos corpos de Lewy, dificilmente encontrados na indução com 6-OHDA (GREENAMYRE et al, 2010).

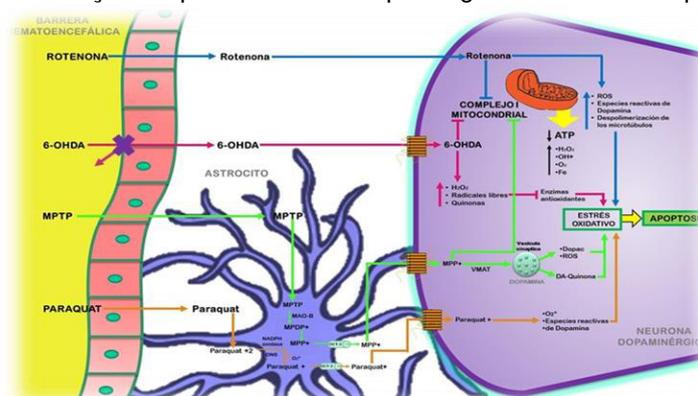
A administração oral de rotenona causa pouca neurotoxicidade; por outro lado, a administração sistêmica causa toxicidade e letalidade em ratos, tratados durante uma semana com 10-18 mg/kg por infusão intravenosa. Estes animais mostram lesões bilaterais no estriado e globo pálido, caracterizadas por perda neuronal e gliose, apesar do feixe nigroestriatal permanecer intacto. Já a injeção subcutânea de 15 mg/kg de rotenona de uma vez ou 1,5 mg/kg em injeções múltiplas, embora cause morte dos animais, não afeta o sistema estriatal. Um regime de injeção intravenosa ou subcutânea de 2-3 mg/kg, diariamente por três semanas, causa neurodegeneração

nigroestriatal, mostrando uma perda de 30% dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e 55% no estriado (GREENAMYRE et al, 2010).

Ao contrário dos modelos de 6-OHDA e MPTP, no modelo da rotenona, os neurônios dopaminérgicos remanescentes mostram inclusões proteicas, como os corpúsculos de Lewis na DP; essas inclusões são imunorreativas para ubiquitina e  $\alpha$ -sinucleína. Além da perda dopaminérgica, verifica-se também no modelo da rotenona redução de 26% nos neurônios noradrenérgicos, no *locus ceruleus*, e de 29% nos neurônios colinérgicos, no núcleo pedúnculo pontino. Os ratos injetados com rotenona exibem mobilidade reduzida, postura flexionada e, em alguns casos, rigidez ou catalepsia. Quatro semanas após a infusão podem ser observados 70% de diminuição na atividade espontânea dos animais, apesar das alterações comportamentais nem sempre se correlacionarem com a perda dopaminérgica (WU; JOHNSON, 2011).

A rotenona por ser um pesticida altamente lipofílico, capaz de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e independe do transportador de dopamina para entrar em neurônios dopaminérgicos. Uma vez no neurônio, a rotenona bloqueia a atividade do complexo I, provocando a formação de ERO e a diminuição da atividade do proteassoma. Em ratos, a rotenona causa a degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais além da formação de inclusões citoplasmáticas como os corpos de Lewy, contendo ubiquitina e  $\alpha$ -sinucleína e também reduz a atividade motora dos animais. A desvantagem deste modelo experimental é que o uso da rotenona pode ocasionar toxicidade sistêmica, tornando-se necessário administrações repetitivas e em baixas doses desta substância (GARCIA et. al., 2014; MARCHIORO et. al., 2016).

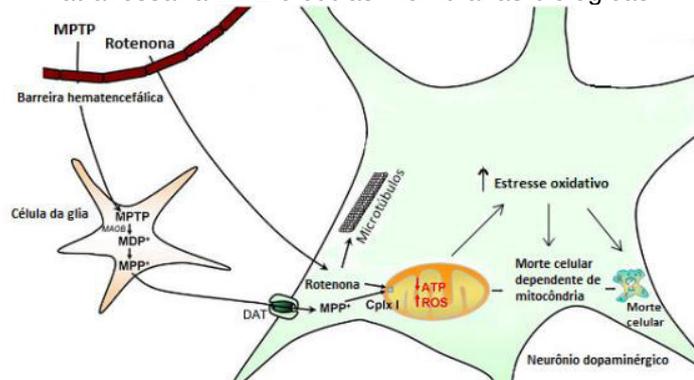
Figura 11 - Representação esquemática da fisiopatologia em modelos experimentais de DP



Fonte: (LEE et. al., 2014)

A desvantagem deste modelo é sua inespecificidade para neurônios nigroestriatais e reprodutibilidade, sendo observada grande variação de deficiência motora ou perda dopaminérgica, dentro do mesmo grupo experimental (JACKSON-LEWYS et. al., 2012).

Figura 12 - Mecanismo de ação da rotenona. A rotenona é um composto lipofílico que pode atravessar a BHE e outras membranas biológicas



Acumula-se nas mitocôndrias, onde inibe o complexo I (Cplx I) da cadeia respiratória mitocondrial. A inibição do complexo I conduz à diminuição nos níveis de ATP, aumento na produção de ROS e à ativação da via de morte celular dependente de mitocôndria. A rotenona também pode induzir a despolimerização de microtúbulos celulares, o que pode contribuir no processo de morte celular

Fonte: (BOVÉ;PERIER, 2012)

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Syzygium cumini* foram coletadas no horto medicinal Professora Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e posteriormente encaminhadas para o Herbário Ático Seabra da UFMA, onde foram identificadas e catalogadas.

### 4.2 PREPARO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *S. CUMINI* (EHB)

A preparação do extrato segundo o método descrito por Sharma et. al. (2008), com modificações. Resumidamente as folhas pulverizadas secas (150 g) foram submetidas à extração por maceração com etanol: água (70: 30 v/v) sob agitação constante por 24 horas a 25 °C (hidromódulo 1:6 m/v). O macerado foi filtrado com papel filtro e o pó residual e o pó residual submetido pelo mesmo processo por mais duas vezes, totalizando três extrações. Os extratos foram reunidos, centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi concentrado (38 °C) em rotoevaporador para obtenção do extrato hidroalcólico bruto (EHB). O EHB foi submetido à partição com clorofórmio (1:1 v/v 3') e a fase orgânica foi lavada com acetato de etila (1:1 v/v 3'). A fração do acetato de etila foi concentrada a (38 °C) e liofilizada, rendendo a fração rica em polifenóis (FRP).

### 4.3 OBTENÇÃO DO PRODUTO FITOTERÁPICO

Para obtenção do produto fitoterápico, o EHB e a FRP foram submetidos ao teste de estabilidade acelerada. Ambos foram solubilizados em veículos líquidos, submetidos a condições variáveis de temperatura  $4,0 \pm 2,0$  °C,  $25,0 \pm 2,0$  °C (Temperatura Ambiente Controlada),  $40,0 \pm 2,0$  °C com umidade relativa de  $75,0 \pm 5,0$  % com valor da perda de peso multiplicado por 3. As leituras foram realizadas antes do início do teste (24 h após o preparo das formulações) e no 15º, 30º, 45º, 60º, 75º, 90º dias. Os parâmetros avaliados foram: características organolépticas, valor do pH e determinação do comportamento reológico (BRASIL, 2005).

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *S. CUMINI* (EHB)

##### 4.4.1 Prospecção fitoquímica do EHB das folhas de *S. cumini*

Os testes realizados seguiram a metodologia proposta por MATOS (2009) para prospecção dos constituintes do EHB a 70% e os resultados foram utilizados como parâmetro inicial para avaliar a presença de determinadas classes de metabólitos secundários no extrato.

Os testes foram realizados para avaliar a presença de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, esteroides, triterpenóides, saponinas, alcaloides e bases quaternárias.

##### 4.4.2 Determinação do peso seco e avaliação do rendimento do EHB das folhas de *S. cumini*.

Do volume total reservado para prospecção fitoquímica, retirou-se uma alíquota de 3 ml para realização do peso seco. Essa alíquota foi dividida em três partes, 1 ml cada e transferida para frascos separados, previamente pesados, que foram levados para secagem total através da corrente de ar aquecido. Após a secagem total da parte líquida, os frascos foram novamente pesados, tirou-se uma média de valores obtidos para determinar a concentração do EHB em g/ml. Com esses dados realizou-se o cálculo de rendimento da extração através de métodos matemáticos.

##### 4.4.3 Caracterização química do EHB das folhas de *S. cumini*

###### 4.4.3.1 Cromatografia Líquida (HPLC-UV/Vis)

A identificação dos compostos do EHB foi primeiramente pelo HPLC-UV/Vis onde primeira metade a fase diclorometânica (5 mg) foi diluída em MeOH grau HPLC. Alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente na HPLC-UV com detecção a 254 nm. Utilizou-se um sistema (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo

de bombas binário, detector UVVis (SPA-10A). A coluna utilizada foi Luna 5 $\mu$ m C18 100 Å (150  $\mu$ m x 4,6  $\mu$ m). A fase móvel foi constituída por água deionizada e MeOH acidificados com 0,01% de ácido fórmico, em sistema gradiente: 10–100% de MeOH em 70 min, fluxo de 1 mL/min.

#### 4.4.3.2 Espectrometria de Massas por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>.

O extrato bruto foi analisado análise por injeção em fluxo (FIA) acoplado em um analisador do tipo ion trap linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma voltagem do spray de 5,00 kV, tensão capilar de -90 V, lentes de tubo de -100 V e um fluxo de 5  $\mu$ L/min. A análise completa da varredura foi registrada na faixa de m/z de 100-1000. As fragmentações em estágios múltiplos (ESI-MS<sup>n</sup>) que foram realizadas pelo método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento de varredura se dá por um espectro de massa completo para aquisição dos dados sobre íons nessa faixa de m/z. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada utilizando uma varredura de dados dependente nas moléculas [M-H]<sup>-</sup> dos compostos de interesse com energia de colisão de 30 % e tempo de ativação de 30 min. Os íons produzidos foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos (ROCHA et. al., 2015VASCONCELOS com adaptações).

A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico foi feita comparando o tempo de retenção com dados obtidos da literatura através da espectrometria de massas.

## 4.5 TESTES COM O EXTRATO BRUTO (IN VITRO)

### 4.5.1 Testes de citotoxicidade

#### 4.5.1.1 Ensaio de atividade hemolítica

O ensaio foi realizado segundo o método de Yang et. al. (2005). Coletou-se o sangue e uma alíquota de 4 mL foi lavada três vezes com solução salina (0,9 %) por

centrifugação a 3000 rpm, durante 5 min, sendo o sobrenadante descartado. Os eritrócitos sedimentados no tubo foram diluídos em solução salina até obtenção de uma suspensão a 1 %. Um volume de 0,5 mL desta suspensão de células foi misturado a 0,5 mL de soluções contendo concentrações de 1000 a 5 µg/mL dos EHB. As misturas foram incubadas a 37 °C, com agitação contínua, durante 60min. As soluções foram, então, centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. A absorvância do sobrenadante foi medida a 540 nm. As suspensões de hemácias acrescidas de solução salina e de água destilada foram, respectivamente, o controle hemolítico mínimo e máximo. Para eliminar a interferência dos EHB na absorvância, foram preparadas soluções controle (branco), não havendo a adição da solução de hemácias. Todos os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata.

#### 4.5.1.2 Ensaio de toxicidade *in vivo* com larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *Tenebrio molitor* foram separadas, contadas, pesadas (~ 100 mg), desinfetadas com álcool a 70 % e distribuídas 10 larvas em grupos experimentais (teste e controle) em placas de Petri. Concentrações de 1000 a 5 µg/mL dos EHB foram preparadas a partir de solução salina (0,9 %) e DMSO a 1 % e com auxílio de seringa de insulina, injetou-se 10 µL na região caudal das larvas na segunda esternite visível, na porção ventral. O controle foi solução salina (0,9 %) e DMSO a 1 %. As larvas permaneceram em temperatura ambiente e a taxa de sobrevivência foi observada em intervalos de 24 h, durante 5 dias. Para estabelecer a morte das larvas, verificou-se visualmente a melanização e a resposta aos estímulos físicos tocando-as suavemente (LIMA et. al., 2011; SOUZA et. al., 2016). Todos os experimentos foram realizados duas vezes em duplicata.

### 4.5.2 Testes antioxidantes

#### 4.5.2.1 Método de DPPH

Este método consistiu na preparação do reagente que constava primeiramente em diluição de 0,008 g de DPPH e leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm, a absorvância deve estar entre 0.600 e 0.700, utilizou o extrato de 10 mg/mL, logo em seguida realizou o procedimento fazendo a diluição de em placa

de microdiluição do solvente em diferentes concentrações do extrato, dessa diluição retira-se 40 µL e adiciona em outra placa de microtitulação em triplicata para cada extrato; o mesmo procedimento será realizado para um padrão o ácido gálico. Em seguida, um poço separado colocou 40 µL do solvente utilizado para diluir o extrato (controle); adicionou 250 µL do reagente de DPPH em todos os poços; esperou-se 25 minutos em ambiente escuro; realizou-se leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm; onde finalmente o resultado foi expresso em porcentagem de sequestro de radicais livres (BLIOS, 1958).

### 4.5.3 Ensaio de viabilidade celular

#### 4.5.3.1 Ensaio de redução de Tetrazólio (MTT)

a) Condições da cultura celular:

- Utilizou-se a linhagem de células humanas de carcinoma da mama MCF-7 e manteve-se seguindo as diretrizes da ATCC (*American Type Culture Collection*, do inglês). Resumidamente, a linhagem de células foi cultivada em meio Dulbecco MEM /baixa glicose (Vitrocell®), 2018. Este meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB; Gibco®), 1 % de penicilina/estreptomicina e pH 7,4. As células foram cultivadas a 37 °C com 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> e foram expandidas para atingir a quantidade ideal para os experimentos;

b) Ensaio de proliferação celular:

- As células foram semeadas a  $5 \times 10^3$  células por poço, em placa de 96 poços, e deixadas *overnight*. Depois tratadas durante 48 horas com o extrato hidroalcoólico liofilizado de *S. cumini* (100, 200, 400, 800 e 1.000 µg/mL diluídos em meio de cultura). A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, segundo Barbisan et. al. (2014). Resumidamente, para medir a porcentagem de proliferação celular das células MCF-7 *in vitro* foi utilizado o ensaio de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]. Uma placa de 96 poços foi semeada com 200 µL de meio contendo  $5 \times 10^3$  células e incubadas durante 48 horas. A placa foi tratada com concentrações crescentes em meio de cultura de 100, 200, 400, 800 e 1.000 µg/mL de extrato. Após 48 horas de incubação com o extrato, o

meio foi removido e os poços foram lavados três vezes com PBS. Em seguida, 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas durante 1h30 min a 37 °C, seguindo-se do descarte do meio contendo MTT, adição de 100 µL de solução solubilizante (90 mM HCl em isopropanol absoluto) e deixadas 30 min sob agitação. A placa foi então lida a 590 nm utilizando um espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices) e a porcentagem de proliferação foi calculada quando comparada ao grupo controle (100 %).

#### 4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS (ENSAIOS *IN VIVO*)

##### 4.6.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, (machos, 90 dias, 400 ± 50 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aclimatados pelo período de 90 dias no Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia, mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura média de 22 ± 2 °C e livre acesso à água e ração.

Todos os protocolos animais previstos no projeto foram executados após aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Maranhão.

##### 4.6.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 4 grupos com média de 5 animais por grupo, os quais foram denominados e tratados como se segue:

a) **Grupo controle negativo (CTR):**

- onde ratos receberam óleo de girassol por via subcutânea (s.c.) e solução salina 0,9 % por via oral (v.o.) em doses de 0,1 ml/100 g de peso;

b) **Grupo induzido:**

- ratos foram induzidos com rotenona 2,5 mg/kg (s.c.) e receberão salina (v.o.);

c) **Grupo controle positivo:**

- ratos que receberam rotenona (s.c.) e miricetina 10 mg/kg (v.o.);
- d) **Grupos induzidos e tratados com EHB de *S. cumini*:**
  - ratos que receberam rotenona (s.c.) e tratados com o extrato vegetal de *S. cumini* (EHB) na dose de 500 mg/kg (v.o.).

#### 4.6.2.1 Indução com rotenona (ROT)

O teste de indução com rotenona seguiu o protocolo modificado a partir de Alam e Schmidt (2002). Foram administradas por via subcutânea doses de 2,5 mg/kg de solução de rotenona (óleo de girassol como veículo) diariamente por um prazo máximo de 15 dias (em casos de debilidade avançada do animal o sacrifício poderá ocorrer antes). Ao fim da indução, os animais foram reunidos e craniotomizados para a realização dos testes subsequentes.

#### 4.6.2.2 Avaliação da função motora e cognitiva

- a) Teste do rotarod:
  - Para avaliação da coordenação motora, os animais foram submetidos ao teste do *rotarod*, onde foram mantidos em jejum por 2 horas antes do experimento e expostos a uma barra giratória (2,5 cm, 12 rpm) por 5 minutos. O resultado foi expresso pela média de tempo em segundos de permanência de cada grupo no aparelho (HAMM et. al., 1994);
- b) Teste do campo aberto:
  - A atividade motora foi mensurada no teste do campo aberto. O aparelho usado constituiu uma arena circular (uma caixa de madeira com 100 cm de diâmetro e 40 cm de altura). O chão do aparato foi dividido com linhas pretas em 20 pequenos segmentos (10x10 cm aproximadamente). Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Durante a observação foram avaliados parâmetros: os quadrantes percorridos; quadrantes centrais do campo aberto; quadrantes periféricos; rearings; groomings e defecação. Os tempos de imobilidade e latência para o início do movimento foram mensurados por meio de cronômetros, e a limpeza da arena, após a retirada de cada animal, foi realizada com solução de álcool

a 5 %. Este procedimento é similar aquele descrito por Broadhurst (1957) e Bernardi e Palermo-Neto (1979).

#### 4.6.2.3 Seção e obtenção dos sobrenadantes cerebrais

Após a craniotomia, os cérebros dos animais foram removidos das calotas e seccionados em placas de petri acondicionadas sobre camadas de gelo e com solução de tampão fosfato resfriada (PBS; pH 7,4) durante todo o procedimento. As áreas isoladas foram os hipocampus, os estriados e as substâncias nigras. O lado esquerdo destas áreas cerebrais foram reservadas para os procedimentos histológicos e as áreas do lado direito serão homogeneizadas e centrifugadas (seguindo as especificações dos kits de avaliação de atividade enzimática) para obtenção dos sobrenadantes cerebrais (SC), que serão mantidos sob refrigeração em -80 °C até a realização das avaliações posteriores (MARTINS et. al., 2012).

#### 4.6.2.4 Análise de amostra tecidual por PCR (Real time)

A extração do RNA do sobrenadante hipotalâmico foi feita utilizando o reagente Trizol® seguindo as orientações do fabricante. Inicialmente, os tecidos hipocampus, os estriados e as substâncias nigras. Primeiramente realizou-se uma lise das amostras e separação de fase onde se adicionou 1 ml de Trizol™ Reagente por 50-100 mg de amostra/volume e homogeneizou o tecido, em seguida homogeneizou a amostra por pipetagem, incubou por 5 min, após centrifugação (13.000 rpm, 10 min), o sobrenadante será transferido para outro microtubo contendo 200 µl de clorofórmio, agitado por inversão durante 15 segundos, mantido em temperatura ambiente (3 min) e novamente centrifugados. Após a centrifugação a mistura foi separada em 3 fases na parte inferior ficando o fenol-clorofórmio de cor vermelha, enquanto que na parte superior estava a fase aquosa que contém o RNA e entre ambas as fases estava a intermediária e orgânica que contém DNA e proteína.

A fase aquosa superior foi recolhida e o RNA foi precipitado com a adição de 500 µl de álcool isopropílico PA e 1 ml de Trizol® incubado por 10 min e centrifugado por 10 min, após nova centrifugação o pellet contendo o RNA foi lavado com etanol 75% e resuspendido em 25 µl de água DEPC (0,01%).

O RNA foi quantificado medindo a absorvância em 260 nm e a pureza pela relação entre a absorvância em 260/280 nm e por análise das bandas de rRNA em gel de agarose (0,8%) contendo brometo de etídio. O mRNA (3 ug) foi convertido em cDNA pela incubação com OligodT (25 ng/uL), dNTP (500  $\mu$ M de cada), DTT (5  $\mu$ M), RNase OUT (2U/ $\mu$ L) e SuperScript II, a 42 °C por 50 min. As soluções de reação para as corridas de PCR quantitativo foram realizadas com: primers (200 nM), reagente Sybr MasterMix (Invitrogen) conforme especificações do fabricante e cDNA 150ng.

Para a medida do cDNA dos genes *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (*Nrf2*), superóxido dismutase (*SOD*), glutationa peroxidase (*GPx*), catalase (*CAT*) as reações foram acompanhadas no termociclador LightCycler® Nano SW 1.0 (modelo Roche Diagnostics) utilizando a expressão do GAPDH como normalizador de acordo com as orientações fabricante.

#### 4.7 ABORDAGEM ÉTICA

A pesquisa foi submetida à apreciação do Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão/UFMA em protocolo de nº 23115.007993/2017-13 e aprovado em parecer consubstanciado CIEAP nº 01.0341.2014. Realizado de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), assegurando assim, a realização pesquisa (ANEXO A).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados e estatística foram utilizados os softwares Microsoft Excel 2013 e Graph Pad Prism 5. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias. Previamente os resultados obtidos serão avaliados por meio da análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste Students-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$  (SOKAL; ROHLF, 2012).

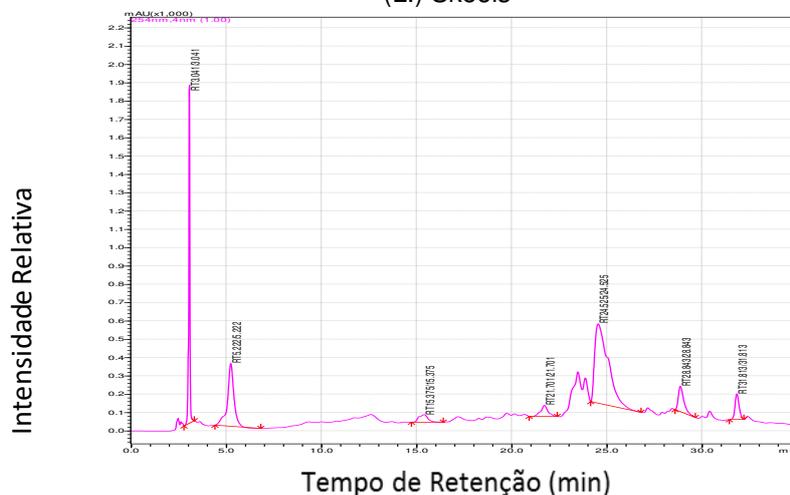
## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EHB DAS FOLHAS DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS

#### 5.1.1 Caracterização química do EHB das folhas do *Syzygium cumini* (L.) Skeels por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível (CLAE/UV-vis)

A Figura 13 abaixo representa o cromatograma ilustrativo do EHB das folhas *Syzygium cumini* (L.) Skeels onde foram apresentados 7 picos mais significativos com diferentes tempos de retenção de substâncias que foram identificadas por outra metodologia no Laboratório de Produtos Naturais do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão – UFMA. Porém como a metodologia se concentra na extração de polifenóis as substâncias identificadas são referentes aos polifenóis.

Figura 13 - Perfil cromatográfico por CLAE/UV-Vis a 254 nm do EHB das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

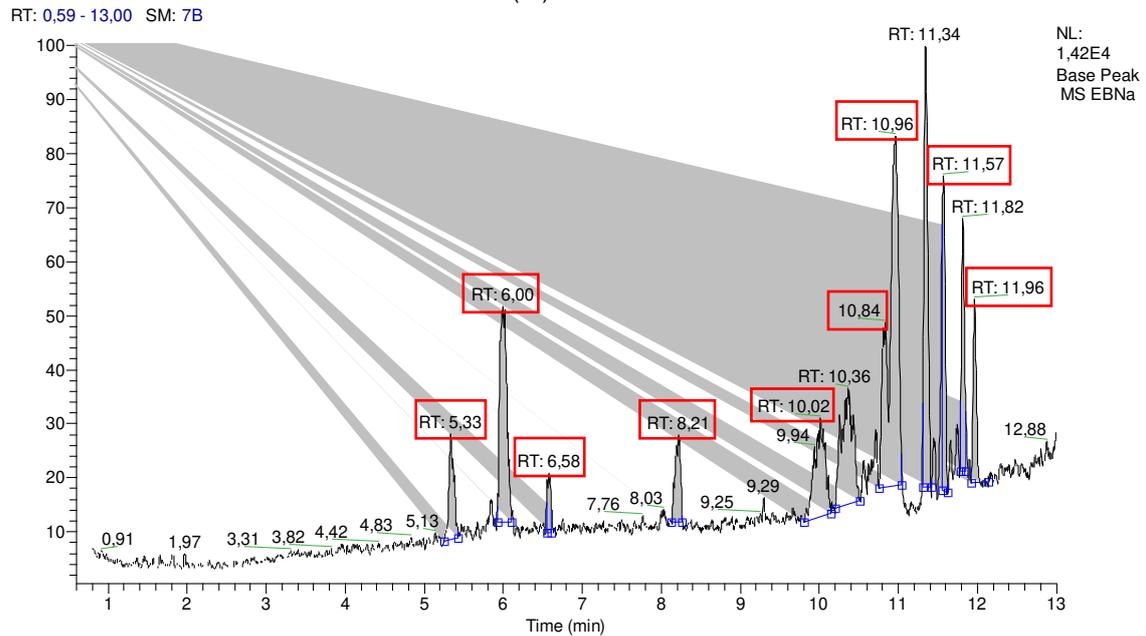


Fonte: O autor

#### 5.1.2 Caracterização química do EHB das folhas do *Syzygium cumini* (L.) Skeels por Espectrometria de Massas por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>.

A Figura 14 abaixo representa o cromatograma ilustrativo do EHB das folhas *Syzygium cumini* (L.) Skeels onde foram apresentados 9 picos mais significativos com diferentes tempos de retenção de substâncias que foram identificadas.

Figura 14 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> do EHB das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.



Fonte: O autor

A tabela 2 abaixo mostra a identificação das substâncias químicas do EHB das folhas do *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

Tabela 2 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> do EHB das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

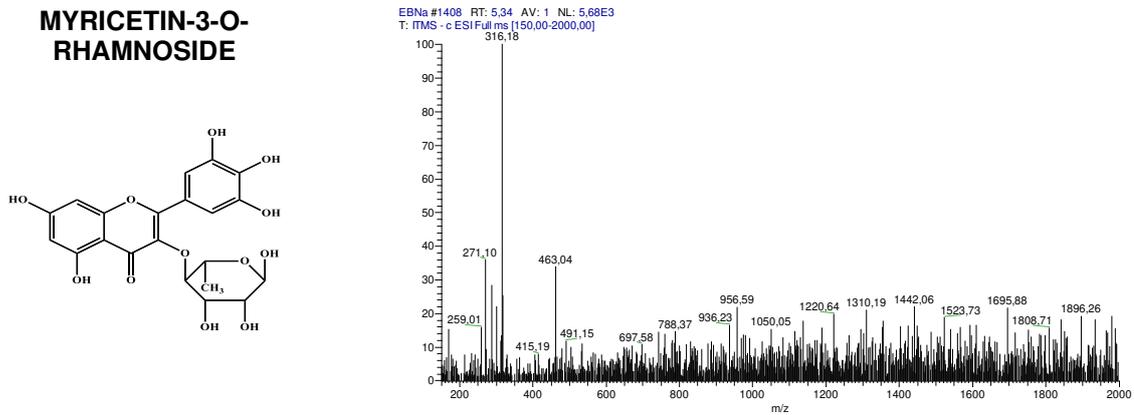
Nº	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>n</sup> (m/z)	Compostos	Referências
1	5,34	463	316;271	myricetin-3-O-rhamnoside	FRACASSETI et. al., 2013
2	6,00	505	316;271	miricetina-3- O- acetil-rhamnoside	RODRIGUEZ-PEREZ et. al., 2013
3	6,58	519	331;316;169	rhamnetin-3- O - (6- O "- acetilglucosídeo)	SIMIRGIOTIS et. al., 2013
4	8,21	293	220	derivado de acido cafrarico	SILVA et. al., 2019
5	10,0	311	183	caftaric acid	SILVA et. al., 2019
6	10,8	523	455;381;183	ligstroside	SANZ et. al., 2012
7	10,9	591	523;455	derivado da rutina	JIA et al 2017
8	11,57	635	411;203;190	trigaloil glicose	SINGH et. al., 2019; SILVA et. al., 2018
9	11,97	695	619; 504	obebioside A	PEREIRA et. al., 2014

Fonte: O autor

Cada composto está representado nas figuras abaixo as quais descrevem em forma de cromatograma específico e fórmula estrutural cada um.

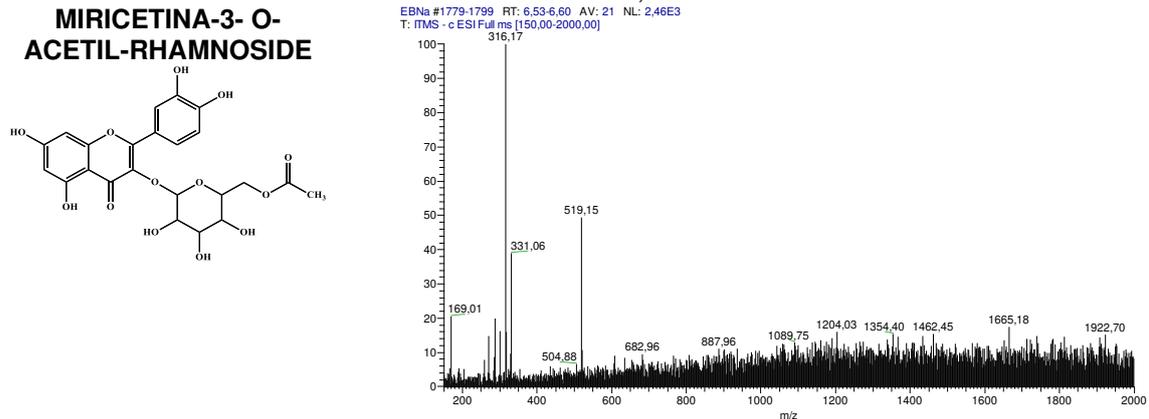
A Figura 15 abaixo representa a substância **myricetin-3-O-rhamnoside**, com t<sub>R</sub> = 5,34 (FRACASSETI et. al., 2013).

Figura 15 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **myricetin-3-O-rhamnoside** com  $t_R = 5,34$



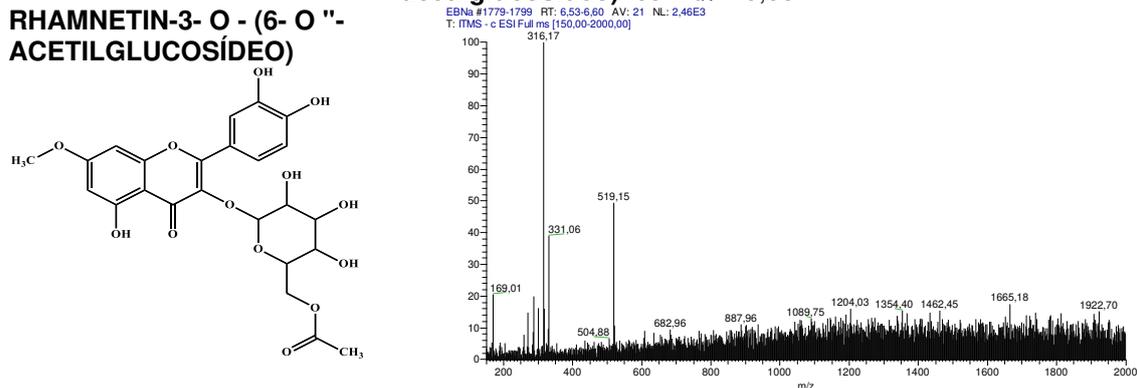
A Figura 16 abaixo representa a substância **miricetina-3-O-acetil-rhamnoside** com  $t_R = 6,00$  (RODRIGUEZ-PEREZ et. al., 2013)

Figura 16 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **myricetin-3-O-acetil-rhamnoside** com  $t_R = 6,00$



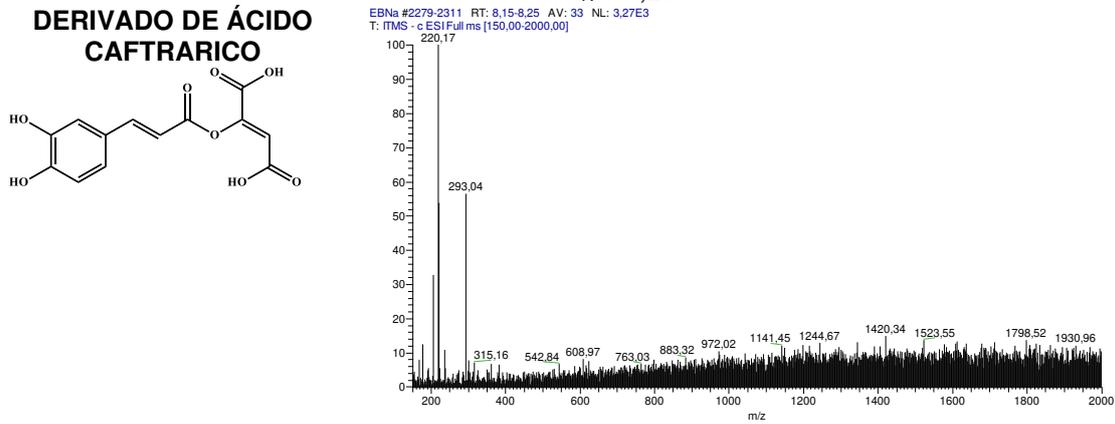
A Figura 17 abaixo representa a substância **rhamnetin-3-O-(6-O''-acetilglucosídeo)** com  $t_R = 6,58$  (SIMIRGIOTIS et. al., 2013).

Figura 17 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **rhamnetin-3-O-(6-O''-acetilglucosídeo)** com  $t_R = 6,58$ .



A Figura 18 abaixo representa a substância **derivado de ácido caftrarico** com  $t_R = 8,21$  (SILVA et. al., 2019).

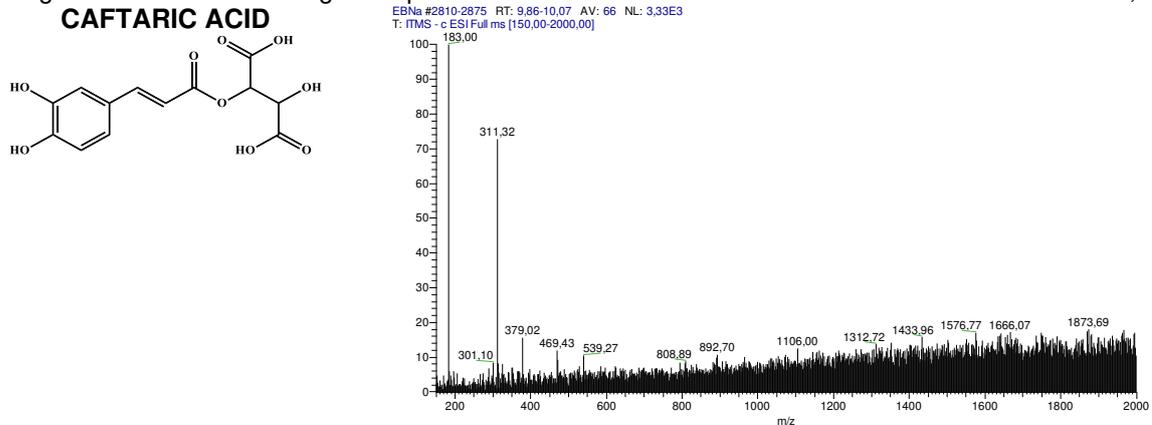
Figura 18 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **derivado de ácido caftrarico** com  $t_R = 8,21$ .



Fonte: O autor

A Figura 19 abaixo representa a substância **caftaric acid** com  $t_R = 10,0$  (SILVA et. al., 2019).

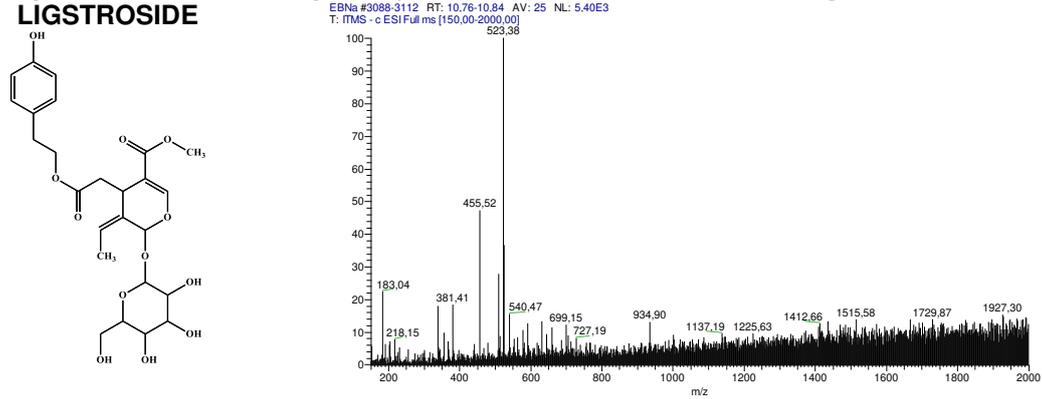
Figura 19 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **caftaric acid** com  $t_R = 10,0$



Fonte: O autor

A Figura 20 abaixo representa a substância **ligstroside** com  $t_R = 10,8$  (SANZ et. al., 2012).

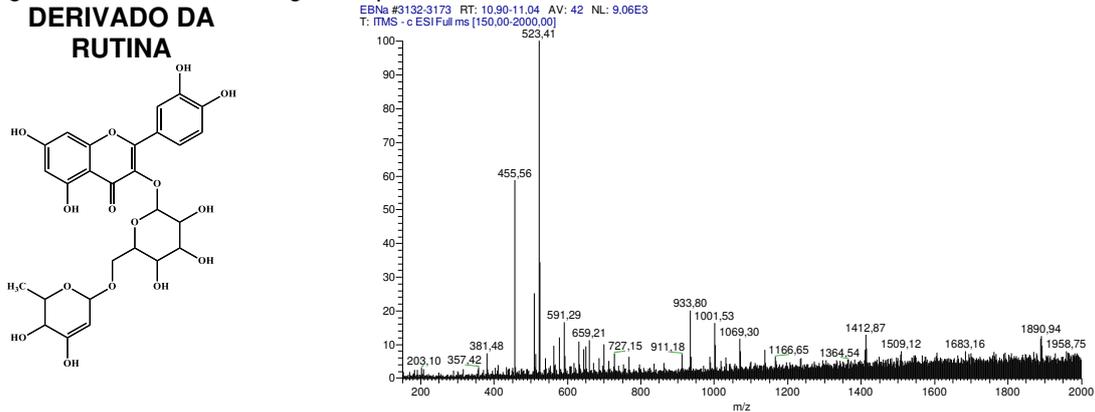
Figura 20 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **ligstroside** com  $t_R = 10,8$ .



Fonte: O autor

A Figura 21 abaixo representa a substância **derivado da rutina** com  $t_R = 10,9$  (JIA et al, 2017).

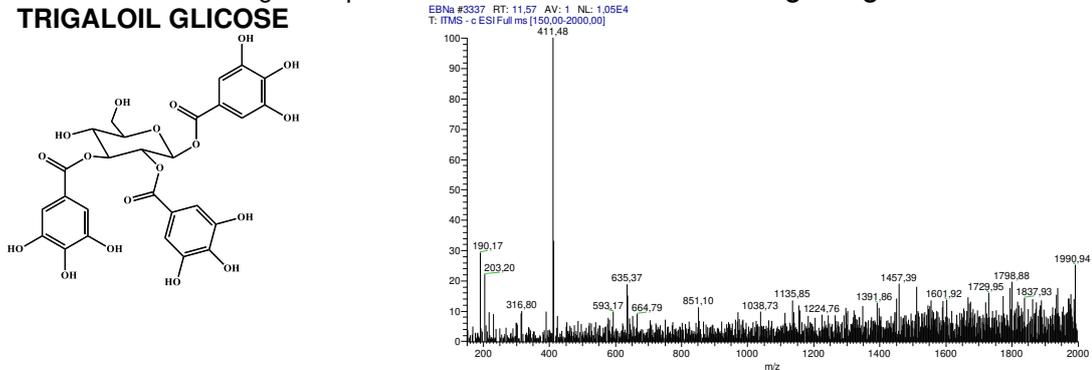
Figura 21 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **derivado da rutina** com  $t_R = 10,9$ .



Fonte: O autor

A Figura 22 abaixo representa a substância **trigaloil glicose** com  $t_R = 11,57$  (SINGH et. al., 2019; SILVA et. al., 2018).

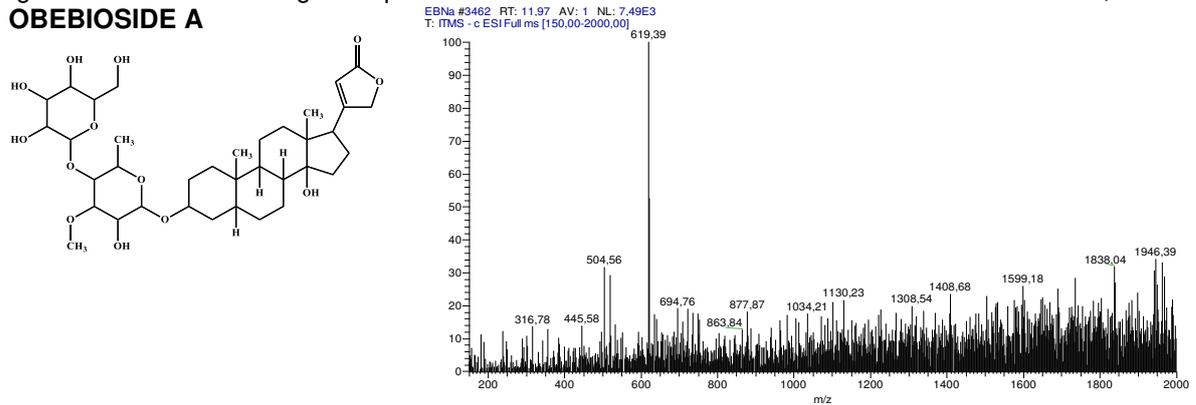
Figura 22 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **trigaloil glicose** com  $t_R = 11,57$ .



Fonte: O autor

A Figura 23 que segue representa a substância **obebioside A** com  $t_R = 11,97$  (PEREIRA et. al., 2014).

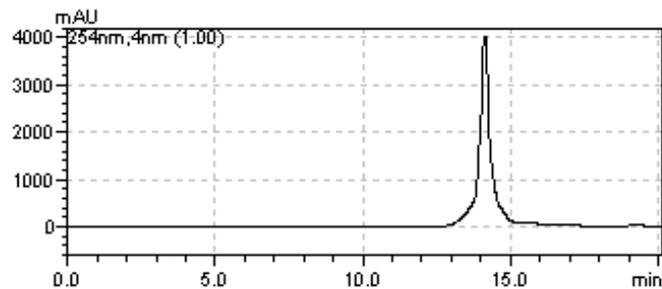
Figura 23 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **obebioside A** com t<sub>R</sub>= 11,97



Fonte: O autor

Em relação a droga padrão utilizada no experimento foi a Miricetina, onde a Figura 24 abaixo representa o cromatograma da substância

Figura 24 - Perfil cromatográfico por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> da substância **Miricetina**



Fonte: O autor

## 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

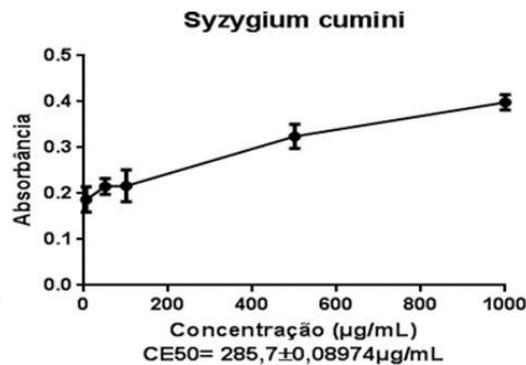
### 5.2.1 Avaliação da atividade hemolítica (YANG et. al.; 2005)

A atividade hemolítica do extrato esta representada na Figura 25, onde foram apresentadas doses do extrato bruto em que observou-se hemólise de eritrócitos e conseqüentemente pode-se concluir que não houve toxicidade do extrato testado, destacando-se a absorbância do sobrenadante no teste que foi medida a 540 nm e as suspensões de hemácias crescidas de solução salina e de água destilada foram, respectivamente, os controles hemolíticos mínimo e máximo, onde todos os testes foram realizados em triplicata.

Foram testadas as doses de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL, 50µg/mL e 5 µg/mL respectivamente, as doses do extrato bruto nesse experimento que

apresentaram resultados significantes estão na variação de 400-600  $\mu\text{g/mL}$  de acordo com as Figuras 26A e 26B abaixo.

Figura 25 - Ensaio de toxicidade através da atividade hemolítica do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

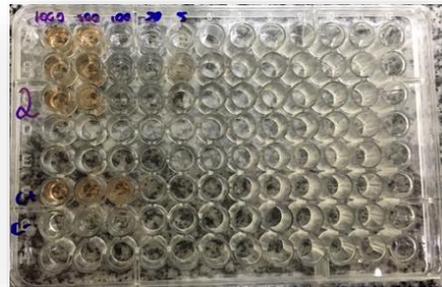


Fonte: O autor

Figuras 26A e 26B - Placas de ELISA da atividade hemolítica de doses do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



A



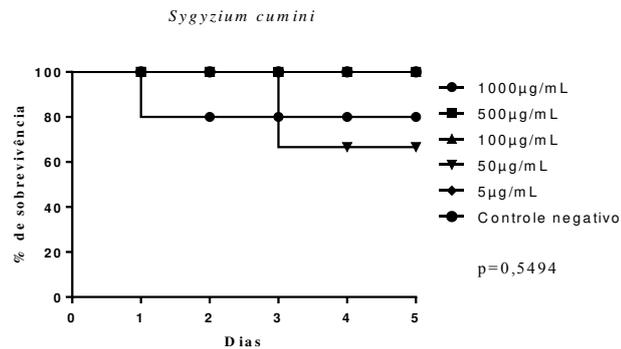
B

Fonte: O autor

### 5.2.2 Avaliação de toxicidade utilizando larvas de *Tenebrio molitor*. (LIMA et. al., 2011; SOUZA et. al., 2016).

Esse método foi realizado através da sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* representado na Figura 27. No gráfico abaixo foi observado doses que não houve diferença significativa entre as concentrações do extrato bruto e o controle negativo com  $p = 0,5494$ . Percebe-se que a taxa de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* em relação ao extrato é alto, principalmente na variação de 100 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , o que caracteriza ser um extrato viável principalmente nessa faixa de concentração.

Figura 27 - Taxa de sobrevivência das larvas em relação ao extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



### 5.2.3 Avaliação de viabilidade celular (Ensaio de redução de Tetrazólio - MTT)

Esse método foi realizado para avaliação da proliferação de células humanas de câncer de mama, representado nas Figuras 28 e 29, as quais as doses do extrato testadas, mostraram que a partir da dose de 100 µg/mL foi observada uma atividade antiproliferativa do extrato de *S. cumini* de 31,49% e que nas doses de 200, 400, 800, 1.000 e 1.500 µg/mL foi de 30,89%, 38,42%, 40,48%, 33,02% e 34,81% de inibição da proliferação celular, respectivamente. Nossos resultados mostraram que todas as doses do extrato hidroalcoólico de *S. cumini* testadas apresentaram porcentagem semelhante de atividade antiproliferativa nas células humanas de câncer de mama, o que afirma uma boa viabilidade celular do extrato nas doses testadas.

Figura 28 - Ensaio de viabilidade celular do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels em cultura de células de câncer de mama.

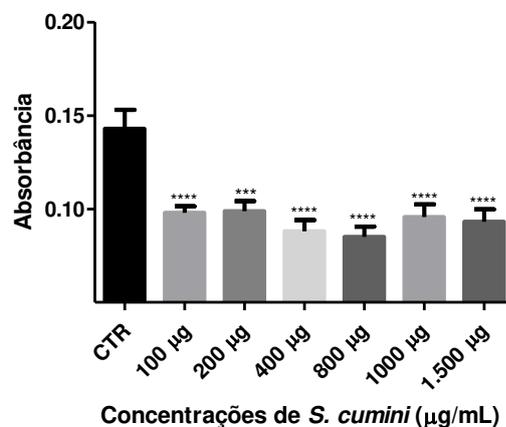
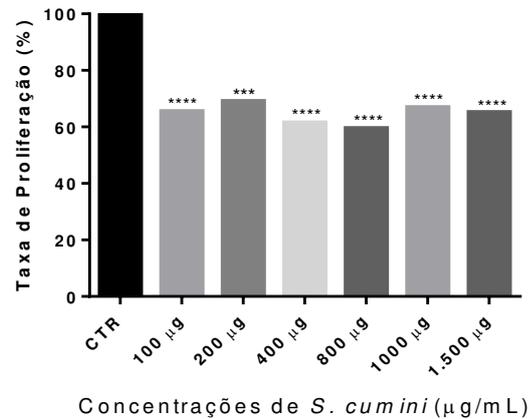


Figura 29 - Taxa de proliferação celular em relação ao extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



Fonte: O autor

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 5.3.1 Método de DPPH (BLIOS, 1958)

Em relação a atividade antioxidante pelo método DPPH pode ser observado na Figura 30 e o padrão com ácido gálico (AG) na Figura 31 a representação da atividade antioxidante em doses do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, considerando que as concentrações do EHB a 100 e 500 µg/ml do EHB apresentando 10% e 25% de captura de radicais livres, respectivamente. Como pode ser observado a concentração ideal com capacidade antioxidante foi de 500 µg/ml do EHB numa variação de 5 a 1000 µg/ml ao capturar 25% de radicais livres, podendo ser representado também nas figuras 32 e figura 33 pelo método colorimétrico ELISA.

Figura 30 - Controle com ácido gálico para atividade antioxidante bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

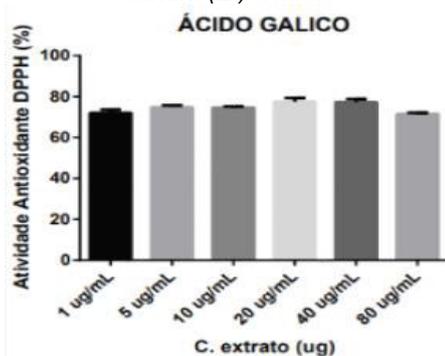


Figura 31 - Avaliação do efeito antioxidante nas concentrações do EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

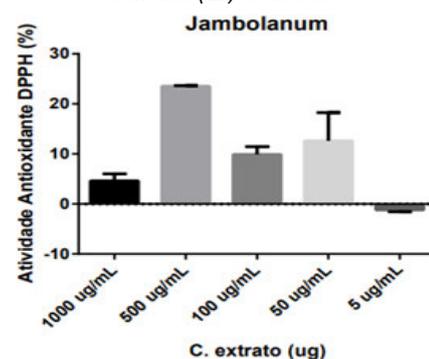


Figura 32 - Doses do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. para atividade antioxidante

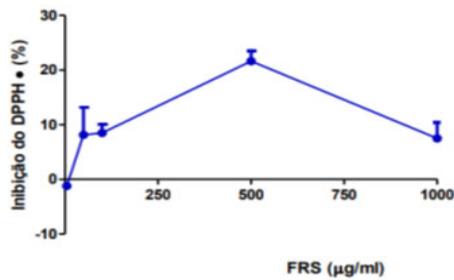


Figura 33 - Placa de ELISA da atividade antioxidante DPPH de doses do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.



Fonte: O autor

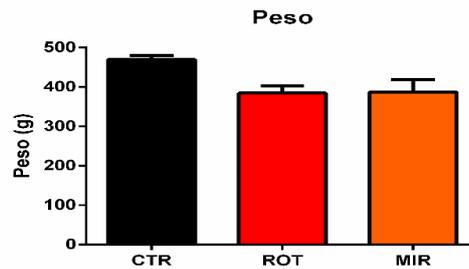
### 5.3.2 Avaliação do efeito do extrato de *S.cumini* em modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona.

Em relação aos experimentos *in vivo* foram realizados três experimentos o primeiro de avaliação ponderal, o segundo de avaliação motora e cognitiva pelo Teste de Campo aberto e o terceiro também avaliação motora e cognitiva pelo Teste Rotarod, estes dois últimos após administração da droga indutora do Parkinson experimental, rotenona.

#### 5.3.2.1 Análise do peso dos animais após indução da rotenona.

A quantificação do peso dos animais foi realizada por uma média de peso e erro padrão da média (EPM) onde o grupo controle apresentou uma média ponderal de  $469,5g \pm 10,57g$ , o grupo induzido por rotenona (2,5 mg/kg) teve uma diminuição de peso para uma média de  $384,5g \pm 18,40$ . Enquanto que o grupo induzido por miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve uma média ponderal um pouco maior de  $387,2g \pm 31,75$ . Efeito do tratamento com miricetina no peso dos animais apresentado nos resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) foram com  $p=0,200$ , sendo estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), e também estatisticamente significativa em relação à rotenona ( $p \leq 0,05$ ). Representado na Figura 34 abaixo.

Figura 34 - Efeito da administração via oral de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) no peso (g).



Fonte: O autor

### 5.3.2.2 Análise da atividade locomotora dos animais após a indução da rotenona – Teste Campo Aberto

O modelo da doença de Parkinson induzida pela rotenona avaliados por este teste temos cinco parâmetros motores.

O primeiro corresponde aos **quadrantes percorridos**, onde o controle teve uma média de  $23,55 \pm 7,35$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,75 \pm 0,25$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais não tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $3,40 \pm 1,16$ ; o segundo corresponde aos **quadrantes centrais do campo aberto**, onde o controle teve uma média de  $8,00 \pm 3,34$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,75 \pm 0,25$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais não tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $2,28 \pm 1,06$ .

O terceiro corresponde aos **quadrantes periféricos**, onde o controle teve uma média de  $15,25 \pm 4,04$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,75 \pm 0,25$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo semelhante ao grupo da rotenona com média de  $0,60 \pm 0,24$ ; o quarto corresponde aos **rearings**, onde o controle teve uma média de  $4,00 \pm 1,29$ , tanto o grupo induzido pela rotenona como o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo acentuado como no grupo da rotenona com média de  $0,00 \pm 0,00$  respectivamente.

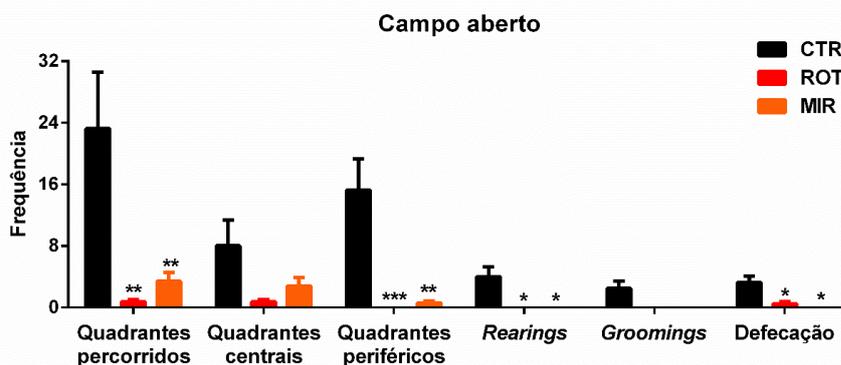
O quinto corresponde aos **groomings**, onde o controle teve uma média de  $2,50 \pm 0,95$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,00 \pm 0,00$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $0,00 \pm 0,00$  e o sexto foi a **defecação** onde o controle teve uma média de  $3,25 \pm 0,85$ , o grupo induzido pela

rotenona teve um decréscimo com média de  $0,50 \pm 0,28$  e o grupo com administração de miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais acentuado do que no grupo da rotenona com média de  $0,00 \pm 0,00$ . (Figura 17)

Neste teste a redução dos quadrantes percorridos pelos animais representa uma diminuição da atividade exploratória e da deambulação causada pela degeneração motora associada a rotenona, ou seja, a rotenona teve sucesso ao induzir o Parkinson, porém a miricetina não teve sucesso em revertê-lo.

Efeito do tratamento com miricetina no teste do *campo aberto*. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) foram com  $p=0,200$ , sendo estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), e também estatisticamente significativa em relação à rotenona ( $p \leq 0,05$ ). Representado na Figura 35 abaixo.

Figura 35 - Efeito da administração via oral de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) na deambulação (Campo aberto)



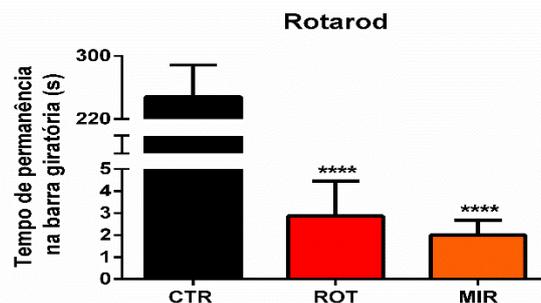
Fonte: O autor

### 5.3.2.3 Análise da atividade locomotora dos animais após a indução da rotenona – Teste Rotarod

A quantificação do desempenho motor foi realizada pelo teste do *rotarod*. A administração de rotenona, durante sete dias, promoveu uma diminuição significativa do tempo de permanência na barra giratória em segundos. Onde o grupo controle teve uma média de  $248,1 \pm 40,46$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $2,86 \pm 1,60$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais acentuado do que no grupo da rotenona com média de  $2,00 \pm 0,66$  (Figura 18).

Efeito do tratamento com miricetina no teste do *rotarod*. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) foram com  $p=0,200$ , sendo estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), e também estatisticamente significativa em relação à rotenona ( $p \leq 0,05$ ). Representado na Figura 36 abaixo.

Figura 36 - Efeito da administração via oral de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) na deambulação (Rotarod).



Fonte: O autor

Nos resultados comportamentais *in vivo* não aparece o grupo da droga a base de EHB rico em polifenóis de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, pois o grupo que testamos houve perda de animais significativos para realização dos testes.

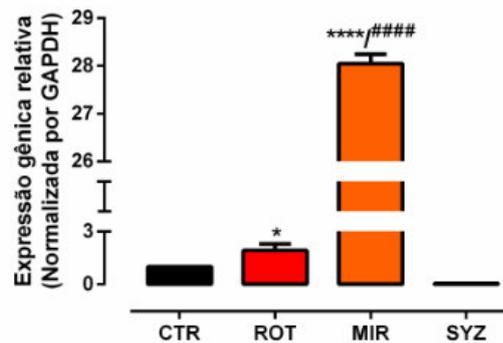
#### 5.3.2.4 Efeito do tratamento com Miricetina e do EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na expressão gênica do *Nrf2* (nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2) em tecidos cerebrais

Na substância negra, a administração de rotenona aumentou a atividade na expressão gênica do *Nrf2* comparado com o grupo controle (Figura 37), com média ( $1,93 \pm 0,37$ ). O tratamento com a miricetina na dose de 10 mg/kg mais rotenona aumentou significativamente a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e consequentemente a atividade enzimática desta enzima antioxidante na região analisada com média ( $28,05 \pm 0,18$ ). Enquanto, que o tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg mais rotenona não houve aumento da expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e consequentemente da atividade enzimática com média ( $0,049 \pm 0,00$ ).

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de uma via da variância

(ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Estatisticamente significativa em relação à rotenona (\* $p \leq 0,05$ ), estatisticamente significativa em relação a miricetina 10 mg/kg e rotenona (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ) e não estatisticamente significativa em relação ao EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg.

Figura 37 - Efeito do tratamento da Miricetina e do EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na expressão gênica do *Nrf2* na substância negra

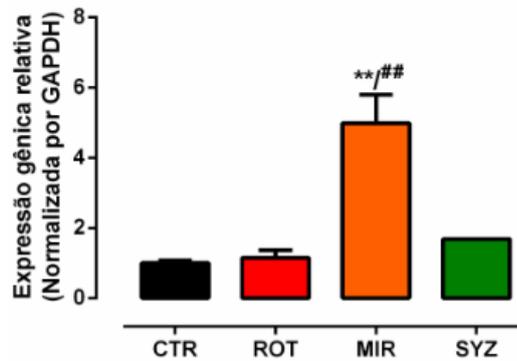


Fonte: O autor

No estriado, a administração de rotenona aumentou a atividade na expressão gênica do *Nrf2* comparado com o grupo controle (Figura 38), com média ( $1,14 \pm 0,22$ ). O tratamento com a miricetina na dose de 10 mg/kg mais rotenona aumentou a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e consequentemente a atividade desta enzima antioxidante na região analisada com média ( $4,98 \pm 0,81$ ). Enquanto, que o tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg mais rotenona, houve aumento da expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e consequentemente da atividade enzimática com média ( $0,68 \pm 0,00$ ), porém em menor proporção que o grupo anterior tratado com a miricetina e rotenona.

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de uma via da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Estatisticamente significativa em relação à rotenona (\* $p \leq 0,05$ ), estatisticamente significativa em relação a miricetina 10 mg/kg e rotenona (\*\*\*\* $p \leq 0,01$ ) e não estatisticamente significativa em relação ao EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg.

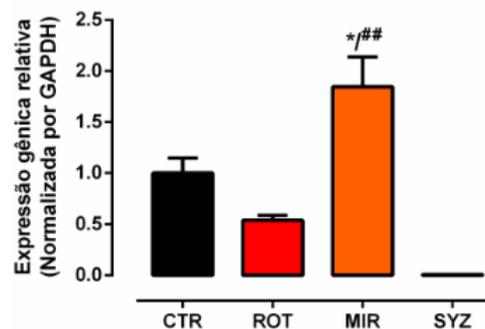
Figura 38 - Efeito do tratamento da Miricetina e do EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na expressão gênica do *Nrf2* no estriado



Fonte: O autor

No hipocampo, a administração de rotenona aumentou a atividade na expressão gênica do *Nrf2* comparado com o grupo controle (Figura 39), com média ( $0,53 \pm 0,047$ ). O tratamento com a miricetina na dose de 10 mg/kg mais rotenona aumentou significativamente a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente a atividade desta enzima antioxidante na região analisada com média ( $1,84 \pm 0,29$ ). Enquanto, que o tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg mais rotenona não causou aumento da expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente da atividade enzimática com média ( $0,008 \pm 0,00$ ).

Figura 39 - Efeito do tratamento da Miricetina e do EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na expressão gênica do *Nrf2* no hipocampo



Fonte: O autor

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de uma via da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Estatisticamente significativa em relação à rotenona ( $*p < 0,05$ ), estatisticamente significativa em relação a miricetina 10 mg/kg e rotenona ( $**p < 0,01$ ) e não estatisticamente significativa em relação ao EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico do *Syzygium cumini* (L.) Skeels (EHSc) e do fármaco padrão miricetina na Doença de Parkinson induzido por rotenona em ratos.

O EHSc de *Syzygium cumini* (L.) Skeels possui em sua composição nove compostos demonstrados em cromatogramas (Figura 15 a Figura 23) e descritos na Tabela 2, correspondendo as seguintes substâncias: (a) myricetin-3-O-rhamnoside; (b) miricetina-3-O-acetil-rhamnoside; (c) rhamnetin-3-O-(6-O"-acetilglucosídeo); (d) derivado de ácido caftarico; (e) caftaric acid; (f) ligstroside; (g) derivado da rutina; (h) trigaloil glicose; (i) obebioside A.

Um estudo realizado por Sanches et. al. (2016) demonstrou que o extrato hidroalcoólico do *Syzygium cumini* (L.) Skeels rico em polifenóis os dados espectrais do cromatograma de HPLC a 254 nm a identificação de quinze compostos pertencentes a taninos hidrolizáveis (elagitaninos e galotaninos) e flavonóis, onde o HPLC-MS / MS foi utilizado para determinar o perfil polifenólico do extrato hidroalcoólico do *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Um outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores Chagas et. al. (2018) demonstrou que o extrato hidroalcoólico do *Syzygium cumini* (L.) Skeels rico em polifenóis os dados espectrais do cromatograma de HPLC-MS/MS a identificação de cinco compostos, onde foram quantificados o ácido gálico, miricetina e quercetina, sendo a miricetina o flavonóide mais abundante, representando quase 20% da massa total do extrato.

Em relação aos experimentos *in vitro* para observamos a toxicidade e viabilidade do EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram realizados por três métodos: o primeiro foi através da atividade hemolítica representado na Figura 25, onde foram apresentadas doses do extrato bruto em que observou-se hemólise de eritrócitos e conseqüentemente pode-se concluir que não houve toxicidade do extrato testado, destacando-se a absorbância do sobrenadante no teste que foi medida a 540 nm e as suspensões de hemácias acrescidas de solução salina e de água destilada foram, respectivamente, os controles hemolíticos mínimo e máximo.

Foram testadas doses de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL respectivamente, as doses do extrato nesse experimento que apresentaram resultados significantes estão na variação de 400-600 µg/mL a baixa atividade hemolítica.

A confirmação da atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Os eritrócitos são células muito utilizadas para estudos de citotoxicidade *in vitro*, devido, principalmente, ao fácil acesso e à grande disponibilidade, permitindo a investigação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular. Após este ensaio, a baixa ocorrência de hemólise pôde ser diretamente relacionada com a baixa citotoxicidade dos extratos, contudo é evidente a necessidade de ensaios mais específicos de citotoxicidade (BATISTA et. al., 2007; FIRMINO, 2007; SCHIAR et. al., 2007; COSTA, 2015).

Na literatura, os relatos sobre atividade hemolítica de extratos irradiados de plantas do gênero *Syzygium* são escassos. Entretanto Costa, 2017 realizou em seu estudo um experimento que avaliou a atividade hemolítica dos extratos de raiz e caule de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Os resultados, na sua maioria, ficaram muito próximos a zero, o que indicou baixa taxa de hemólise, resultando em uma baixa toxicidade. Os extratos irradiados não aumentaram significativamente a taxa de hemólise, em quase todas concentrações utilizadas porcentagens diminuíram, se aproximando à zero. É notado também que a porcentagem de hemólise está diretamente ligada à concentração dos extratos, à medida que a concentração do extrato diminui, a hemólise se aproxima a zero e a concentração ideal ficou em 125 µg/mL a 250 µg/mL, similar a variação encontrada no nosso estudo.

Dando continuidade aos experimentos *in vitro* o segundo método utilizado para avaliar a toxicidade foi a sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* representado na Figura 27. Foi observado concentrações que não houve diferença significativa entre as concentrações do extrato bruto e o controle negativo com  $p= 0,5494$ . Percebe-se que a taxa de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* em relação ao extrato é alto, principalmente na variação de 100 a 500 µg/mL, o que caracteriza ser um extrato viável principalmente nessa faixa de variação. Na literatura, os relatos sobre atividade de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* nos extratos de plantas do gênero *Syzygium* são escassos, principalmente em relação a extrato de folhas secas.

Firmo (2018) em um estudo de bioprospecção de plantas medicinais do cerrado maranhense com propriedades antioxidante, antibacteriana contra *Corynebacterium spp* e toxicidade com aporte para o desenvolvimento de novos medicamentos, realizou experimentos com 8 espécies vegetais onde testou a toxicidade dos extratos etanólicos dessas espécie vegetais, para avaliar a toxicidade utilizou a sobrevivência de

larvas de *Tenebrio molitor*, dentre essas espécies não apresentaram do gênero *Syzygium*, porém apresentaram boa sobrevida e baixa toxicidade similar a esta pesquisa.

Martinez et. al. 2018, identificou os efeitos inseticidas dos óleos essenciais de canela e cravo-da-índia em *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), onde foram avaliadas as concentrações letais (CL50 e CL90), o tempo letal e o efeito repelente nas larvas, pupas e adultos de *T. molitor* após exposição a seis concentrações de cada óleo essencial e compostos tóxicos, este estudo apesar de ser com óleo essencial mostrou diferente atividade, óleos essenciais de canela e cravo e seus compostos causaram maior mortalidade e repelência em *T. Molitor* o que difere dos resultados desta pesquisa.

O terceiro e último método de análise de citotoxicidade foi a atividade antiproliferativa nas células humanas de câncer de mama, representado nas Figuras 28 e 29, em que foram observadas em todas as concentrações testadas do extrato. Mostraram que a partir da concentração de 100 µg/mL foi observada uma atividade antiproliferativa do extrato de *S. cumini* de 31,49% e que na concentração de 200, 400, 800, 1.000 e 1.500 µg/mL foi de 30,89%, 38,42%, 40,48%, 33,02% e 34,81% de inibição da proliferação celular, respectivamente. Nossos resultados mostraram que todas as concentrações do extrato hidroalcoólico de *S. cumini* testadas apresentaram porcentagem semelhante de atividade antiproliferativa nas células humanas de câncer de mama, o que afirma uma boa viabilidade celular do extrato nas concentrações testadas.

Ruthurusamy et. al., 2015 realizaram um estudo utilizando concentrações de extrato de acetato de etila e extrato metanólico de sementes de *Syzygium cumini* foram testados contra a linha celular MCF-7. O ensaio MTT foi realizado em placas de 24 poços, onde concluíram que as sementes de acetato de etila o extrato apresenta menor viabilidade das células quando comparado ao extrato metanólico de sementes de *Syzygium cumini*. Relataram a atividade anticancerígena de *Syzygium cumini* no acetato de etila e no extrato metanólico de sementes usando MTT.

Dos resultados, o extrato de semente de acetato de etila e extrato metanólico de *Syzygium cumini* apresenta alta atividade antineoplásica. No extrato metanólico a partir da concentração de 125 µg/mL foi observada uma atividade antiproliferativa do extrato de *S. cumini* de 50% e que na concentração de 250, 500 e 1.000 µg/mL foi de 36,20%; 25,86% e 12,06% respectivamente. Enquanto que no de acetato de etila a

partir da concentração de 125 µg/mL foi observada uma atividade antiproliferativa do extrato de *S. cumini* de % e que na concentração de 250, 500 e 1.000 µg/mL foi de 24,07%; 18,51% e 12,06% respectivamente (RUTHURUSAMY et. al., 2015), semelhante aos resultados deste experimento, porém o extrato utilizado nesse trabalho foi etanólico de folhas secas.

Em relação a atividade antioxidante pelo método DPPH pode ser observado na Figuras 31 e 32 o padrão com ácido gálico (AG) e na Figura 13 a representação da atividade antioxidante em concentrações do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) *Skeels*, considerando que as concentrações do EHSc a 100 µg/ml apresentou 10% de captura de radicais livres e a 500 µg/ml apresentou 25% de captura de radicais livres. Como pode ser observado a concentração ideal com capacidade antioxidante foi de 500 µg/ml do EHSc numa variação de 5 a 1000 µg/ml ao capturar 25% de radicais livres, podendo ser representado pelo método colorimétrico ELISA.

Segundo Sánchez – Moreno et. al. (1998), a qualidade da reação antioxidante de compostos fenólicos também pode ser inferida pelo tempo decorrido até que o sequestro do DPPH atinja o platô. Se o tempo é inferior a 5 minutos são classificados como rápidos, entre 5 e 30 minutos são intermediários e maiores que 30 minutos são antioxidantes de reação lenta, neste trabalho, o EHB atingiu o platô em tempo inferior a 5 minutos. Os dados desse trabalho estão de acordo com Ruan et. al. (2008), os quais exploraram a atividade antioxidante do extrato bruto e de frações obtidas do extrato metanólico das folhas de *S. cumini* através do método do DPPH e encontraram que a fração acetato de etila apresentava maior capacidade antioxidante.

Em literatura mais recente, segundo Chagas et. al. (2018) caracterizaram a composição química e avaliaram os efeitos antidiabéticos de um novo extrato rico em polifenóis obtido da folha de *S. Cumini*, nesse extrato específico foi realizado atividade antioxidante em relação ao DPPH e ao ABTS, em que mostraram forte atividade (IC50:  $3,88 \pm 1,09$  e  $5,98 \pm 1,19$  µg / mL, respectivamente) antioxidante nos dois métodos o que concorda com nossos resultados dessa pesquisa pois este estudo também trabalha com extrato rico em polifenóis.

Em relação aos experimentos *in vivo* foram realizados três experimentos o primeiro de avaliação ponderal, o segundo de avaliação motora e cognitiva pelo Teste de Campo aberto e o terceiro também avaliação motora e cognitiva pelo Teste Rotarod, estes dois últimos após indução da droga padrão rotenona.

A quantificação do peso dos animais após indução da rotenona foi realizada por uma média de peso e erro padrão da média (EPM) onde o grupo controle apresentou uma média ponderal de  $469,5 \pm 10,57$  g, o grupo induzido por rotenona (2,5 mg/kg) teve uma diminuição de peso para uma média de  $384,5 \pm 18,40$  g. Enquanto que o grupo induzido por miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve uma média ponderal um pouco maior de  $387,2 \pm 31,75$  g. Efeito do tratamento com miricetina no peso dos animais de acordo com a Figura 34.

Ahamed et. al (2018) mostrou em seu estudo o potencial neuroprotetor da polidatina um polifenol, assim como a miricetina e o EHB de *S. cumini* em termos de melhoria da degeneração de neurônios dopaminérgicos em regiões nigro-estriatais do cérebro e comportamento neuromotor distorcido no modelo rotenona da doença de Parkinson. Os animais parkinsonianos tratados com rotenona mostraram deterioração do comportamento motor, perda de peso, perda de neurônios dopaminérgicos e diminuição da reatividade imunológica nas seções das regiões nigrostriatais desses animais, o tratamento com polidatina + rotenona mostrou efeitos contraditórios ao parkinsonismo, com melhora na perda de peso, neuro- comportamento motor, perda dopaminérgica e reatividade imunológica contra neurônios dopaminérgicos, esses resultados são similares aos apresentados nessa pesquisa.

Em um estudo realizado por Silva (2014), avaliou o efeito neuroprotetor do Eugenol (EUG) sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração sistêmica de rotenona (modelo experimental da doença de Parkinson).

O Eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um composto fenólico, componente majoritário de óleos essenciais isolados a partir de *Eugenia carophyllata* (Myrtaceae), mesma família da espécie avaliada nesse estudo *S. cumini*, em relação ao peso corporal os animais administrados por rotenona mostraram diminuição significativa no peso corporal, comparado ao grupo controle (diferenças entre os pesos final e inicial), porém não houve diferenças significativas entre animais pré-tratados com o eugenol 37,5 mg / kg e pré-tratados com o levodopa que era o fármaco padrão (SILVA, 2014), podendo concordar com o nosso estudo em relação a preservação da perda do peso corporal menor no grupo induzido pela miricetina em relação ao grupo induzido pela rotenona.

Na literatura, os relatos sobre atividade comportamental de animais tratados com extratos de plantas do gênero *Syzygium* em modelo da doença de Parkinson induzida pela rotenona são escassos. A análise da atividade locomotora dos animais

após a indução da rotenona foi realizada primeiramente pelo Teste Campo Aberto, em que foi determinado cinco parâmetros motores descritos abaixo.

O primeiro foram **os quadrantes percorridos**, onde o controle teve uma média de  $23,55 \pm 7,35$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,75 \pm 0,25$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais não tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $3,40 \pm 1,16$ ; o segundo foram os **quadrantes centrais do campo aberto**, onde o controle teve uma média de  $8,00 \pm 3,34$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,75 \pm 0,25$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais não tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $2,28 \pm 1,06$ .

O terceiro foram os **quadrantes periféricos**, onde o controle teve uma média de  $15,25 \pm 4,04$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,75 \pm 0,25$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo, mas não tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $0,60 \pm 0,24$ ; o quarto foram os **rearings**, onde o controle teve uma média de  $4,00 \pm 1,29$ , tanto o grupo induzido pela rotenona como o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo acentuado como no grupo da rotenona com média de  $0,00 \pm 0,00$  respectivamente.

O quinto foram os **groomings**, onde o controle teve uma média de  $2,50 \pm 0,95$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,00 \pm 0,00$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo tão acentuado como no grupo da rotenona com média de  $0,00 \pm 0,00$  e o sexto foi **defecação** onde o controle teve uma média de  $3,25 \pm 0,85$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $0,50 \pm 0,28$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais acentuado do que no grupo da rotenona com média de  $0,00 \pm 0,00$ . (Figura 35)

Neste teste a redução dos quadrantes percorridos pelos animais representa uma diminuição da atividade exploratória e da deambulação causada pela degeneração motora associada a rotenona, ou seja, a rotenona teve sucesso ao induzir o Parkinson, porém a miricetina não teve sucesso em revertê-la.

Efeito do tratamento com miricetina no teste do campo aberto. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) foram com  $p=0,200$ , sendo

estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), e também estatisticamente significativa em relação à rotenona ( $p \leq 0,05$ ), representado na Figura 35.

Jimenez (2004) em um estudo *in vitro* pode desencadear a relação entre a doença de Parkinson, com o estresse oxidativo e a morte neuronal por apoptose. Induziu a rotenona e esta inibiu do complexo da cadeia de transporte eletrônico mitocondrial, para provocar a toxicidade e se comprovar a capacidade neuroprotetora de três antioxidantes das sustentações: fraxetrol, miricetina e N-acetilcisteína, esse estudo utilizou o mesmo fármaco padrão (miricetina) e o mesmo modelo experimental de indução de Parkinson porém *in vitro*, enquanto que esta pesquisa utilizou em modelos *in vivo*.

Shama et. al. (2017), investigou a atividade antibacteriana, antioxidante e capacidade neuroprotetora de extratos aquoso e alcoólico do caule de *Syzygium cumini in vitro também*, em que a capacidade neuroprotetora do extrato aquoso e etanólico de caule do *S. cumini* foram observadas na linhagem de feocromocitoma de rato (PC) -12, dando um choque neurotóxico às células PC-12 usando 6-hidroxidopamina. O extrato etanólico mostrou um número máximo de células viáveis, ou seja, 75% o extrato aquoso mostrou 50% do mesmo., este estudo sugere que o caule pode ser utilizado como uma boa fonte de antibacteriano, antioxidante e agente neuroprotetor.

Em estudos *in vivo* foram observados o perfil comportamental de outras espécies vegetais com constituintes fenólicos. como foi descrito no estudo de Linard (2014), o qual explicou que a rotenona modifica vários aspectos do comportamento motor e cognitivo, incluindo atividade motora reduzida, postura flexionada, rigidez e catalepsia correlacionada com a degeneração das células dopaminérgicas.

O teste do campo aberto foi utilizado para análise da frequência locomotora com o objetivo de avaliar a movimentação espontânea e deambulação: a frequência de levantar, o comportamento exploratório; e, o tempo para o início do movimento; a motivação, tais parâmetros são geralmente prejudicados na doença de Parkinson e este declínio da função neuromotora foi reproduzido usando a rotenona (LINARD, 2014).

O modelo da doença de Parkinson induzida pela rotenona promoveu uma redução significativa da frequência locomotora de  $83\% \pm 2,19$  e da atividade exploratória, quantificada pela frequência de levantar, acima de  $81\% \pm 0,64$ , quando

comparada aos animais dos respectivos grupos controle. O tratamento com ácido anacárdico, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg aumentou significativamente a atividade locomotora, em aproximadamente  $420\% \pm 2,92$ ,  $548\% \pm 4,06$  e  $715\% \pm 1,78$ , respectivamente, quando comparado ao grupo rotenona (LINARD, 2014).

Este mesmo tratamento, nas mesmas doses anteriores, foi capaz de aumentar a frequência de levantar, em aproximadamente  $440\% \pm 0,74$ ,  $446\% \pm 0,71$  e  $432\% \pm 0,93$  em relação ao grupo de animais que recebeu somente a rotenona. O tempo de imobilidade e o tempo para o início do movimento no grupo rotenona, aumentaram, significativamente, em relação ao grupo controle. O tratamento com ácido anacárdico, nas doses de 10, 25, 50 e 100 mg/kg, favoreceu uma diminuição significativa de  $41\% \pm 13,19$ ,  $58\% \pm 3,39$ ,  $74\% \pm 2,34$  e  $82\% \pm 1,95$ , respectivamente, no tempo de imobilidade e  $46\% \pm 2,78$ ,  $92\% \pm 0,28$ ,  $91\% \pm 0,46$  e  $90\% \pm 0,46$  no tempo para o início do movimento, em relação aos animais do grupo rotenona (LINARD, 2014).

Esse estudo mostrou que o extrato do *Anacardium occidentale* foi capaz de prevenir significativamente os efeitos induzidos pela rotenona sobre a frequência locomotora, duração da imobilidade e o tempo para o início do movimento nas duas doses testadas. Ao passo que, o ácido anacárdico a partir da dose de 25 mg/kg foi eficiente em proteger os efeitos induzidos pela rotenona sobre todos estes parâmetros, inclusive, também sobre a frequência de levantar. O efeito benéfico deste composto fenólico não foi alterado mesmo em doses mais elevadas. Esses resultados são consistentes com a ação neuroprotetora destes compostos nos parâmetros bioquímicos analisados neste trabalho. Em termos de parâmetros no teste de campo aberto tem resultados que são diferentes dos nossos, onde a redução dos quadrantes percorridos pelos animais representa uma diminuição da atividade exploratória e da deambulação causada pela degeneração motora associada a rotenona, ou seja, a rotenona teve sucesso ao induzir o Parkinson, porém a miricetina não teve sucesso em revertê-lo (LINARD, 2014).

O último teste para avaliação do desempenho cognitivo comportamental foi realizado pelo teste do rotarod. A administração de rotenona, durante sete dias, promoveu uma diminuição significativa do tempo de permanência na barra giratória em segundos. Onde o grupo controle teve uma média de  $248,1 \pm 40,46$ , o grupo induzido pela rotenona teve um decréscimo com média de  $2,86 \pm 1,60$  e o grupo com administração de Miricetina (10 mg/kg, v.o.) teve um decréscimo mais acentuado do que no grupo da rotenona com média de  $2,00 \pm 0,66$  (Figura 36).

Efeito do tratamento com miricetina no teste do rotarod. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) foram com  $p=0,200$ , sendo estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), e também estatisticamente significativa em relação à rotenona ( $p \leq 0,05$ ), representado na (Figura 36).

Linard (2014) também utilizou o teste de rotarod para quantificação do desempenho motor. A administração de rotenona promoveu uma diminuição significativa do tempo de permanência na barra giratória em  $89\% \pm 4,89$  no grupo rotenona em relação ao grupo controle. Enquanto o tratamento com ácido anacárdico nas doses de 3, 10, 25, 50 e 100 mg/kg propiciou um aumento significativo no tempo de permanência na barra giratória em relação ao grupo rotenona. A dose de 100 mg/kg foi a que apresentou o maior aumento em torno de  $834\% \pm 12,20$ , no tempo de permanência na barra giratória em relação ao grupo rotenona, esse estudo bem diferente do nosso o fármaco em teste teve um aumento do tempo de permanência, enquanto que no nosso estudo a miricetina teve um decréscimo, mas não tão acentuado como no grupo induzido pela rotenona.

Após a realização dos testes comportamentais foi realizado a retirada dos órgãos em cirurgia experimental para realização da análise do estresse oxidativo nos cérebros dos animais. Foi retirado as seguintes regiões cerebrais: substância negra, estriado e hipocampo direito e esquerdo respectivamente para análises utilizado biologia molecular (PCR-real time).

O metabolismo de carboidratos pelas mitocôndrias cerebrais é diferenciado. Elas têm grande capacidade de produzir peróxido de hidrogênio, mas curiosamente tem poucas enzimas antioxidantes clássicas, por isso os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio geralmente são irreversíveis (KARUPPAGOUNDER et. al., 2013).

A rotenona é um pesticida altamente lipofílico, capaz de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e não depende do transportador de dopamina para entrar em neurônios dopaminérgicos. Uma vez no neurônio, a rotenona bloqueia a atividade do complexo I, provocando a formação de EROs e a diminuição da atividade do proteossoma. Em ratos, a rotenona causa a degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais além da formação de inclusões citoplasmáticas como os corpos de Lewy, contendo ubiquitina e  $\alpha$ -sinucleína e também reduz a atividade

motora dos animais. A desvantagem deste modelo experimental é que o uso da rotenona pode ocasionar toxicidade sistêmica, tornando-se necessário administrações repetitivas e em baixas doses desta substância (GARCIA et. al., 2014).

Os ratos expostos ao tratamento prolongado com doses baixas de rotenona desenvolvem um fenótipo do tipo de DP caracterizado por disfunção motora, perda de neurônios dopaminérgicos, formação de inclusões do tipo Lewy e ativação microglial (KUJAWSKA et. al., 2018).

Nessa pesquisa, a administração de rotenona, por via subcutânea, promoveu aumento atividade da expressão gênica do *Nrf2* (nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2) em tecidos cerebrais (substância negra, estriado e hipocampo) mostrando que este protocolo foi eficaz na indução de estresse oxidativo em todas estas regiões, porém parcialmente no hipocampo onde teve um aumento, porém inferior ao grupo controle.

No processo de indução da DP em modelos experimentais utilizando neurotoxinas como a rotenona demonstram perdas neuronais em vias dopaminérgicas, em áreas cerebrais específicas. No caso da rotenona, a perda é maior no estriado e substância negra, e menor no hipocampo, bem como os animais apresentam sintomas como motores, como déficit de mobilidade devido a rigidez e tremores de extremidade, e déficit não motor como quadro depressivo (SAMPAIO, 2014), sendo similar ao processo de indução realizado nessa pesquisa, onde no hipocampo teve um aumento no grupo induzido, porém inferior ao grupo controle, enquanto que na substância negra e no estriado, o aumento no grupo induzido foi maior que no grupo controle.

O tratamento com miricetina foi capaz de bloquear quase completamente a oxidação ocasionada pela rotenona, provavelmente devido à capacidade antioxidante deste composto fenólico, enquanto que no tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, na substância negra e no hipocampo não demonstrou expressão significativa comparado ao grupo da miricetina, já no estriado houve expressão, porém em menor proporção que a miricetina.

Como a DP é um distúrbio neurodegenerativo complexo influenciado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, o estresse oxidativo e o comprometimento dos mecanismos de defesa antioxidante tem sido implicados como principais agravantes para patogênese da doença. A resposta antioxidante mediada

pela expressão gênica do *Nrf2* pode explicar a interação gene-ambiente em estudos genéticos da DP (TODOROVIC et. al., 2015).

Na substância negra, a administração de rotenona aumentou a atividade na expressão gênica do *Nrf2* comparado com o grupo controle (Figura 37), com média ( $1,93 \pm 0,37$ ). O tratamento com a miricetina na concentração de 10 mg/kg e rotenona aumentou significativamente a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente a atividade enzimática desta enzima antioxidante na região analisada com média ( $28,05 \pm 0,18$ ). Enquanto, que o tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na concentração de 500 mg/kg e rotenona não houve aumento da expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente da atividade enzimática com média ( $0,049 \pm 0,00$ ).

Outro tecido estudado foi o estriado, nesse tecido a administração de rotenona aumentou a atividade na expressão gênica do *Nrf2* comparado com o grupo controle (Figura 38), com média ( $1,14 \pm 0,22$ ). O tratamento com a miricetina na concentração de 10 mg/kg e rotenona aumentou a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente a atividade desta enzima antioxidante na região analisada com média ( $4,98 \pm 0,81$ ). Enquanto, que o tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na concentração de 500 mg/kg e rotenona, aumentou a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente da atividade enzimática com média ( $0,68 \pm 0,00$ ), porém em menor proporção que o grupo anterior tratado com a miricetina e rotenona.

E o último tecido estudado foi o hipocampo, onde nesse tecido a administração de rotenona aumentou a atividade na expressão gênica do *Nrf2* comparado com o grupo controle (Figura 39), com média ( $0,53 \pm 0,047$ ). O tratamento com a miricetina na concentração de 10 mg/kg e rotenona aumentou significativamente a expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente a atividade desta enzima antioxidante na região analisada com média ( $1,84 \pm 0,29$ ). Enquanto, que o tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na concentração de 500 mg/kg e rotenona não causou aumento da expressão gênica do *Nrf2* normalizada por *GADPH* e conseqüentemente da atividade enzimática com média ( $0,008 \pm 0,00$ ).

Os danos neuronais causados pelo estresse oxidativo são características importantes na DP. Uma vez que o tratamento se restringe apenas ao alívio dos sintomas, sem quaisquer efeitos significativos nos processos neurodegenerativos, estudos evidenciam que a neuroproteção pode ser um alvo farmacológico viável,

sugerindo que, dietas ricas em antioxidantes desempenham um importante papel na proteção contra a degeneração neuronal (SUTACHAN et. al., 2012; WOJDA; SALINSKA; KUZNICKI, 2008; MARCHIORO et. al., 2016).

Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas, representando um amplo grupo de compostos que possuem um anel aromático e caracterizado pela presença de um ou mais grupamentos hidroxil com diferentes complexidades estruturais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância. As principais fontes de compostos fenólicos são os frutos e hortaliças, mas também podem ser encontrados em sementes, cascas, raízes, folhas e flores, sendo a classe mais abundante de compostos fenólicos em plantas são os flavonoides, tais como flavonóis, flavanois, flavonas, isoflavonas e antocianidinas. (DORNAS et. al., 2007; MARCHIORO et. al., 2016).

Os agentes neuroprotetores da DP obtidos por compostos bioativos de produtos naturais, principalmente os flavonóides, estão em desenvolvimento com base na estrutura de compostos fotoquímicos permeáveis à barreira com o objetivo de melhorar a disfunção cerebral e prevenir a neurodegeneração (NAOI et. al., 2019)

Em um estudo experimental foi utilizado o pesticida rotenona em ratos para analisar os efeitos da quercetina na DP. Foi observado que os animais que fizeram uso deste flavonóide tiveram uma redução da perda de dopamina no estriado e o decréscimo de GSH na substância nigra foi amenizada. A rotenona induziu a diminuição da atividade do complexo I na substância nigra e os ratos tratados com a quercetina apresentaram um aumento significativo na atividade do complexo I quando comparados ao controle. A quercetina também se mostrou capaz de reverter a perda dos neurônios imunorreativos a TH (Tirosina Hidroxilase), indicando que este flavonoide pode ter ação neuroprotetora em neurônios dopaminérgicos (KARUPPAGOUNDER et. al., 2013).

Cui et. al.(2016) testaram a Curcumina principal componente ativo do polifenol extraído do rizoma de *Curcuma longa* (Zingiberaceae), em modelo experimental animal de DP induzido por rotenona para avaliar a disfunção motora e a função da enzima tirosina hidroxilase, demonstraram que este flavonoide restaurou os níveis de expressão do *Nrf2*, atenuando os efeitos neuroprotetores da substância negra parte compacta. Similar ao nosso estudo, com uma diferença utilizando outro flavonoide a Curcumina, ou seja, a expressão do gene *Nrf2* preservou mais a função mitocondrial na substância negra (\*\*p<0,01), entretanto em nosso estudo, a miricetina que também

é um flavonóide no mesmo modelo experimental apresentou uma significância maior ( $****p \leq 0,0001$ ) com ( $*p \leq 0,05$ ), ou seja, com uma maior capacidade de preservação mitocondrial nessa área cerebral.

O ácido ferúlico um tipo de polifenol que foi co-administrado em ratos tratados com rotenona por quatro semanas em que resgatou os neurônios DA na área substância negra e terminais nervosos no estriado de danos ocasionados pelo pesticida. O ácido ferúlico restaurou a atividade das enzimas antioxidantes e o conteúdo de GSH enquanto inibia a peroxidação lipídica. Após o tratamento com ácido ferúlico, a produção de mediadores inflamatórios como COX-2 e NOS induzível e citocinas pró-inflamatórias também foi reduzida. Além disso, esses efeitos foram confirmados por uma redução na expressão de dois genes *Iba1* e GFAP, sugerindo atenuação da ativação microglial e astrocítica. Portanto, pode-se concluir que os efeitos protetores do ácido ferúlico foram mediados por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (OJHA et. al., 2015).

Outro estudo mais recente realizado por Zhang et. al. (2018) constatou em seu estudo que um produto natural derivado da Laminaria japônica, um polissacarídeo sulfatado denominado Fucoidan protegeu o sistema dopamina e a função mitocondrial dos neurônios dopaminérgicos em um modelo de DP induzido por rotenona em ratos, a medicação aliviou os déficits comportamentais assim como a expressão do gene *Nrf2* na substância negra dos ratos com DP. Esse efeito protetor do Fucoidan pode ser mediado pela reserva da função mitocondrial envolvendo a via do gene *Nrf2*, para isso foi utilizado 3 doses escalonadas de 35, 70 e 140 mg/kg da droga em teste em todas as 3 dosagens apresentou ( $**p \leq 0,01$ ).

Similar ao nosso estudo, com uma diferença utilizando outra droga que o Fucoidan em doses escalonadas, os nossos resultados foram estatisticamente significantes também em relação à rotenona ( $*p \leq 0,05$ ), estatisticamente significativa em relação a miricetina 10 mg/kg e rotenona ( $****p \leq 0,0001$ ) e não estatisticamente significativa em relação ao EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na concentração 500 mg/kg, porém em relação a miricetina ( $****p \leq 0,0001$ ) o nosso estudo apresentou uma significância maior, ou seja, a expressão do gene *Nrf2* preservou mais a função mitocondrial na substância negra comparado a ação do Fucoidan ( $**p \leq 0,01$ ).

Outra pesquisa realizada por Jo et. al. (2019), investigando os potenciais mecanismos de proteção da gintonina uma glicolipoproteína derivada do ginseng em um modelo de DP mediada por MPTP *in vivo* e MPP + *in vitro*. Nossa hipótese foi de

que a ativação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 / heme oxigenase-1 (Nrf2 / HO-1, alvos terapêuticos em potencial para a neurodegeneração) com gintonina poderia anular a neurotoxicidade associada à DP modulando o acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína, neuroinflamação, e morte celular apoptótica em modelos MPTP / MPP + de DP. Os achados *in vivo* e *in vitro* sugerem que os efeitos neuroprotetores da gintonina foram associados à regulação da via Nrf2 / HO-1, que regulou a expressão de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico sintase e marcadores apoptóticos na substância negra e estriada de ratos. Além disso, os efeitos neuroprotetores da gintonina também foram associados a uma redução no acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína na substância negra e no estriado do camundongo. Os efeitos neuroprotetores da gintonina foram posteriormente validados pela análise dos efeitos da gintonina nas células SH-SY5Y tratadas com MPP +, o que confirmou os efeitos protetores da gintonina, importante na terapêutica da DP.

Esse estudo utilizou o uma glicolipoproteína e demonstrou proteção neuronal do estriado e substancia negra, uma atividade anti-inflamatória, porem diferente do nosso estudo, eles induziram a DP por MPTP e no nosso estudo foi utilizado a rotenona, porém assim como nosso estudo associaram a expressão do gene *Nrf2* como um sinalizador de proteção neuronal.

A DP por ser uma doença degenerativa comum do sistema nervoso central em idosos, com alterações patológicas nos neurônios DA nigroestriado (MARCHIORO et. al., 2016). Outra pesquisa realizada por Yang et. al. (2019) foram investigar o possível mecanismo de sua neuroproteção e anti-neuroinflamação no estriado e substância negra de camundongos estimulados por LPS. Os resultados mostraram que a miricetina 20 e 50 mg/kg em doses de melhorou a lesão neuronal e aumentou a expressão da proteína PSD-95 e da proteína TH no estriado e substância negra de camundongos estimulados por LPS. Além do que, a miricetina diminuiu a produção de fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , diminuiu o nível de quimiocina MCP-1 e suprimiu as expressões de COX-2 e iNOS. Enquanto isso, a miricetina suprimiu a expressão de HMGB1, TLR4 e MyD88 no nigrostriatum de camundongos estimulados por LPS, inibiu as vias de sinalização de NF- $\kappa$ B e MAPK ativadas pelo LPS. Em conclusão esse estudo, sugeriu que miricetina bloqueia a ativação das vias de sinalização NF- $\kappa$ B e MAPK para o neurônio nigroestriado de lesão em camundongos estimulados por LPS e é benéfico para o tratamento da inflamação nigroestriada da DP.

Esse estudo utilizou o mesmo polifenol que utilizamos e demonstrou além da proteção neuronal do estriado e substância negra uma atividade anti-inflamatória porém diferente do nosso estudo eles induziram a DP por LPS e no nosso estudo foi utilizado a rotenona.

Vardhan et. al. (2018) destacaram em seu estudo de revisão que problemas do Sistema Nervoso Central (SNC) como a doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e traumático por lesões cerebrais) estão piorando dia a dia por causa do estilo de vida, desequilíbrio ambiental e problemas genéticos. Em 2015, a OMS informou que a prevalência de problemas no SNC é de 27,8 em 1000 e 3 em cada 100 pessoas estão enfrentando algum desses problemas no SNC. No entanto, infelizmente, drogas sintetizadas quimicamente usadas para controlar esses problemas em pacientes apresentam efeitos colaterais, e, portanto, precisamos de agentes neuroprotetores naturais para evitar essas complicações (VARDHAN et. al., 2018).

Ressaltaram ainda que o *Syzygium cumini* é uma planta medicinal com propriedades medicinais relatadas em vários métodos tradicionais e modernos medicamentos. Compostos fitoquímicos de casca de caule, folhas, flores, frutos e sementes de *Syzygium cumini* foram usados para tratar também muitas doenças na medicina moderna. Até o momento, é usado principalmente para tratar diabetes mellitus, dor, inflamação, úlceras e diarreia, e em estudos recentes, foi comprovado que o *Syzygium cumini* pode ser usado como quimiopreventivo, radioprotetor e antineoplástico (VARDHAN et. al., 2018).

A eficácia da *Syzygium cumini* é bem estudada para muitas doenças sistêmicas, incluindo diabetes, muito precisa ser explorado sobre seu papel nas doenças neurológicas. Os fitoquímicos presentes em diferentes partes do *Syzygium cumini* estavam mostrando evidências de que ele pode mostrar neuroproteção de forma eficaz. Os fitoquímicos que já foram estudados como neuroproteção neles, um bom número desses fitoquímicos está presente no *Syzygium cumini*. É importante que o *Syzygium cumini* possa ser usado como um medicamento natural neuroprotetor eficaz (VARDHAN et. al., 2018).

A disponibilidade de constituintes fitoquímicos vegetais muito importantes (corilagina, ácido elágico, ácido gálico, quercetina, miricetina kaempferol, ácido oleanólico, antocianinas e 1, 8 cineol) em *Syzygium cumini* cujas funções neuroprotetoras já foram testadas para potenciais neuroprotetores em distúrbios neurológicos, destacaram nesta revisão os compostos fitoquímicos que podem

desempenhar um papel crucial contra problemas neurológicos. Com base em considerável evidência a planta de *Syzygium cumini* pode ser usada como uma melhor abordagem terapêutica nos problemas relacionados ao SNC (VARDHAN et. al., 2018).

Esta revisão pode esclarecer que apesar do tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg e rotenona não causou aumento expressivo da expressão gênica do *Nrf2* em três tecidos analisados comparado ao grupo que utilizou a miricetina 10mg/kg e rotenona. O EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels por ser um extrato rico em compostos fenólicos inclusive a miricetina pode ter relevância ou base para estudos com doses graduadas ou fracionamento do extrato que possam observar o sinergismo de droga e extrato bem como outros efeitos, pois o *Syzygium cumini* (L.) Skeels por uma espécie que possui constituintes químicos com potencial em propriedades neuroprotetoras para distúrbios neurológicos como a DP.

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo evidenciou que o extrato hidroalcolólico rico em polifenóis das folhas de *Syzygium cumini* L. (Skeels) identificou nove substâncias com potencial terapêutico.

Determinou as doses ideais de uso do extrato através de testes *in vitro* de citotoxicidade e viabilidade celular, foi observado também atividade antioxidante *in vitro* no extrato. Foi realizado também testes cognitivos e comportamentais para avaliar atividade neuroprotetora *in vivo* com esta espécie vegetal e com o fitoterápico padrão que corresponde a miricetina, resultados *in vivo* não aparece o grupo da droga a base de EHB rico em polifenóis de *Syzygium cumini*, pois o grupo que testamos não teve amostra com resultado significativo.

Após a realização dos testes comportamentais foi realizado a análise do estresse oxidativo nos cérebros dos animais das seguintes regiões cerebrais: substância negra, estriado e hipocampo direito e esquerdo respectivamente para análises utilizado biologia molecular (PCR-real time). a administração de rotenona, por via subcutânea, promoveu aumento atividade da expressão gênica do *Nrf2* (nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2) nesses tecidos cerebrais mostrando que este protocolo foi eficaz na indução de estresse oxidativo em todas estas regiões, porém parcialmente, no hipocampo onde teve um aumento, porém inferior ao grupo controle.

O tratamento com a miricetina foi capaz de bloquear quase completamente a oxidação ocasionada pela rotenona, provavelmente devido à capacidade antioxidante deste composto fenólico, enquanto que no tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, na substância negra e no hipocampo não demonstrou expressão significativa comparado ao grupo da miricetina, já no estriado houve expressão, porém em menor proporção que a miricetina.

O tratamento com EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na dose de 500 mg/kg mais rotenona não causou aumento expressivo da expressão gênica do *Nrf2* nos três tecidos analisados comparado ao grupo que utilizou a miricetina 10mg/kg e rotenona. O EHB de *Syzygium cumini* (L.) Skeels por ser um extrato rico em compostos fenólicos inclusive a miricetina pode ter relevância ou base para estudos com doses graduadas ou fracionamento do extrato que possam observar o sinergismo de droga e extrato bem como outros efeitos, pois o *Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma espécie que

possui constituintes químicos com potencial em propriedade neuroprotetoras para distúrbios neurológicos como a DP.

Pode-se então concluir que apesar de ainda necessitarem ser melhor explorados os últimos testes podemos dispor de um produto (APÊNDICE A) como um possível fitoterápico importante para diversas disfunções associadas ao quadro de estresse oxidativo e preservação neuronal presente na DP.

## REFERENCIAS

AARSLAND, D.; PAHLHAGEN, S.; BALLARD, C. G.; EHRT, U.; SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 8, p: 35–47, 2012.

ABREU I. C.; PAES, A. M. A.; BOGES, K. F. T.; CARTÁGENES, M. S. S.; BORGES, M. O. R.; RIBEIRO, R. M.; BENEVIDES, R. O. A.; SILVA, S. N.; FREIRE, S. M. F.; BARROSO, W. A. **Formulação da mistura dos extratos hidroalcóolicos liofilizados das folhas de Averrhoa carambola e de Syzygium cumini, suas composições farmacêuticas e seu uso na prevenção e no tratamento do diabetes tipo II e suas complicações**. Depositante: Universidade Federal do Maranhão; PI102012 005787-5 A2, Depósito: 01 mar. 2012, Concessão: 29 out. 2013.

ABELIOVICH, A.; GITLER, A. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease **Nature**, [s. l.], v.539, p. 207–216, 2016.

ABID SHEIKH, M., SAEED MALIK, Y., XING, Z., GUO, Z., TIAN, H., ZHU, X., CHEN, X., 2016. Polylysine-modified polyethylenimine (PEI-PLL) mediated VEGF gene delivery protects dopaminergic neurons in cell culture and in rat models of Parkinson's Disease (PD). **Acta Biomater**, [s. l.], v. S1742-7061, n. 16, p. 30717-6.

AGATI, G.; AZZARELLO, E; POLLASTRI, S; TATTINI, MASSIMILIANO. Review: Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, [s. l.], v. 196, p.67–76, 2012.

ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Rev Bras Farmacogn**, [s. l.], v. 11, p.37-50, 2001.

ALCALY, R. N. Cytokines as Potential Biomarkers of Parkinson Disease. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 73, n. 11, p. 1282–1284, 2016.

ALAM, M.; SCHMIDT, W. J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v.136, p. 317–324, 2002.

ASANUMA, M.; MIYAZAKI, I.; DIAZ-CORRALES, F. J.; OGAWA, N. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced Parkinsonism. **Acta Medica Okayama**, [s. l.], v. 58, n.5, p. 221-233, 2004.

AMINOFF, M. J. Tratamento Farmacológico do Parkinsonismo e de Outros Distúrbios do Movimento. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 375-386.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARBISAN, J. R.; MOTTA, A.; TROTT, V.; AZZOLIN, E. B.; DORNELLES, M.; MARCON, T. D.; ALGARVE, M. M.; DUARTE, C. P.; MOSTARDEIRO, T. C.; UNFER, K. L.; SCHOTT, I. B.; DA CRUZ. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **PLoS One**. [s. l.], v. 9, 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 65, p. 247-250, 1979.

BERNDT, N.; HOLZHÜTTER, H. G.; BULIK, S. Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: a model-based analysis. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 280, p. 5080-5093, 2013.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **BioEssays**, [s. l.], v. 24, p.308-318, 2002.

BISAGLIA, M.; FILOGRANA, R.; BELTRAMINI, M.; BUBACCO, L. Are dopamine derivatives implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease? **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 13, p. 107-114, 2014.

BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2012, 2012.

BLESA, J.; TRIGO-DAMAS, I.; QUIROGA-VARELA, A.; JACKSON-LEWIS, V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s. l.], v. 9, n. July, p. 1–9, 2015.

BOLOGNA, M.; LEODORI, G.; STIRPE, P.; PAPARELLA, G.; COLELLA, D.; BELVISI, D.; FASANO, A.; FABBRINI, G.; BERARDELLI, A. Bradykinesia in early and advanced Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 69, p. 286-29, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 1, 2005**. Guia para realização de estudos de estabilidade. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

BRITO, E. S.; DE ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A., "Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 23, p. 9389–9394, 2007.

BROADHURST, P. L. Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Br J Psychol**, [s. l.], v. 49, p. 12–20, 1957.

BROINIZI, P. R. B; ANDRADE-WARTHA, E. R. S; SILVA, A. M. O.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant properties in cashew apple byproduct (*Anacardium occidentale* L.): effect on lipoperoxidation and on the polyunsaturated fatty acids profile in rats. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 44, n.4, p.773-781, out-dez 2008.

BRUNTON, L.L.; HIL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica Goodman & Gilman**. 11. ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill/Artmed, 2010.

BRUNTON, L.L.; HIL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill/Artmed, 2012.

BATISTA, M. T. A.; RODRIGUES, H. G.; FONSECA, L. C.; BONETTI, A. M.; PENHASILVA, N.; NERES, A. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s. l.], v.3. n.2, p. 22-24, 2007.

BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Research International**, [s. l.], v.44, n. 7, p. 1776–1789, 2011.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease **Neuroscience**. [s. l.], v.1, n.211, p.51-76, 2012.

BURCH, D.; SHEERIN, F. Parkinsons disease. **The Lancet**, [s. l.], v.365, n.9495, p.361-363, 2005.

BURGENER, S. C.; BUETTNER, L.; COEN BUCKWALTER, K.; BEATTIE, A.; ROSSEN, D.; FICK, S.; FITZSIMMONS, S.; KOLANOWSKI, A.; RICHESON, N. E.; ROSE, K.; SCHREINER, A.; PRINGLE SPECHT J. K.; TESTAD, I.; YU, F.; MCKENZIE, S. Evidence supporting nutritional interventions for persons in early stage Alzheimer's disease (AD). **Journal Nutrition Health Aging**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 18-21, 2008.

CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A.; GHIGLIERI; MASSIMILIANO V. D. F. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v.17, p. 1022–1030, 2014.

CANNON, J. R.; TAPIAS, V.; NA, H. M.; HONICK, A. S.; DROLET, R. E.; GREENAMYRE, J. T. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 34, n.02, p.279–290, 2009.

CHAGAS, V. T.; COELHO, R. M. R. S.; GASPARGAS, R. S.; SILVA, S. A.; MASTROGIOVANNI, M.; MENDONÇA, C. J.; RIBEIRO, M. N. S.; PAES, A. M. A.; TROSTCHANSKY, A. Protective Effects of a Polyphenol-Rich Extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels Leaf on Oxidative Stress-Induced Diabetic Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, p.01-13, 2018.

CHAIMOWICZ, F. **Saúde do Idoso**. 2. ed. Belo Horizonte: NESCON, UFMG, 2013. 169p.

CHIEN, H. F.; FIGUEIREDO, T. R.; HOLLAENDER, M. A.; TOFOLI, F.; TAKADA, L. T.; PEREIRA, L. V.; BARBOSA, E. R. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in late-onset sporadic patients with Parkinson's disease. **Arquivo Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 356-359, 2014.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v.30, n. 9, p. 475-482, 2009.

CIUCCI, M.R.; GRANT, L. M.; RAJAMANICKAM, E. S. P.; HILBY, B. L.; BLUE, K. V.; JONES, C. A.; KELM-NELSON, C. A. Early Identification and Treatment of Communication and Swallowing Deficits in Parkinson Disease. **Semin Speech Lang**, [s. l.], v.34, n.03, p: 185-202, 2013.

CORTI, O.; LESAGE, S.; BRICE, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 91, p: 1161–1218, 2011.

CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTEI, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. **Frontiers Nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 87, 2018.

COSTA, A. J. **Avaliação fitoquímica e potencial toxicológico do caule de *Calotropis procera* (ait.) Ait.f. (Apocynaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2015. 30 p.

COSTA, M. C. V. V. **Citotoxicidade, propriedades antioxidantes e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeels após irradiação gama**. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017. 132 p.

COSTELLO, S. COCKBURN, M.; BRONSTEIN, J.; ZHANG, X.; RITZ, B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. **American journal of epidemiology**, [s. l.], v. 169. n. 8. p. 919-926, 2009.

CUI, Q.; LI, X.; ZHU, H. Curcumin ameliorates dopaminergic neuronal oxidative damage via activation of the Akt/Nrf2 pathway. **Mol Med Rep.** [s. l.], v. 13, n. 2, p.1381-1388, 2016.

CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E.; FERRO, M.; MERTINEZ, G.; VITAL, M. HIPOLIDE, D.; TUFIK, S.; CANTERAS, N. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v.189, n. 02, p. 364-372, 2008.

DAMASCENO, D. C.; LIMA, P. H. O.; GALHIANE, M. S.; VOLPATO, G. T.; RUDGE, M. V. C. Avaliação do efeito hipoglicemiante da sapogenina extraída de sementes de *Eugenia jambolana* Lam. **Rev Bras Plantas Med**, [s. l.], v. 4, p.46-54, 2002.

DANTAS, A. M. C.; FRANK, A. A.; SOARES, E. A. Vitaminas antioxidantes na Doença de Parkinson. **Revista Brasileira Geriatria Gerontologia**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 105-116, 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. **Neuron**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 62, p. 132–144, 2013.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 461-491, 2013.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, [s. l.], v.65, n. 04, p.337-353, 1999.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DOORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, [s. l.], v.28, n.03, p. 241-249, 2007.

DUQUE, C.; JANUÁRIO, C.; LEMOS, J.; FONSECA, P.; CORREIA, A.; RIBEIRO, L.; BERNARDES, R.; FREIRE, A. Optical coherence tomography in LRRK2-associated Parkinson Disease. **Neurology**, [s. l.], v.84, n.14, p. 2-147, 2015.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress" **Biomedicine & pharmacotherapy**, [s. l.], v.58, n.1, p. 39-46, 2004.

ELBAZ, A., TRANCHANT, C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**. [s. l.], v. 262, p. 37-44, 2007.

FALCO, A.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**. [s. l.], v. 39, n.1, p. 63-80, 2016.

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 4–18, 2015.

FERREIRA, F. D.; FERREIRA, F. M. D.; HELENO, R. B.; JUNIOR, S. E. M. Doença de parkinson: aspectos fisiopatológicos e terapêuticos. **Revista Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 221-228, 2010.

FELDMANN, K. A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Curr Opin Plant Biol**, [s. l.], v.4, p. 162-167, 2001.

FILIPPIN, N. T.; MARTINS, J. S.; DELA LIBERA, L. B.; HALBERSTADT, B. F.; SEVERO, A. R. Qualidade de vida de sujeitos com doença de Parkinson e seus cuidadores. **Fisioterapia em Movimento**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 57-66, 2014.

FIRMINO, C. B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007. 89 p.

FIRMO, W. C. A. **Bioprospeção de plantas medicinais do cerrado maranhense com propriedades antioxidante, antibacteriana contra *Corynebacterium spp* e toxicidade**: aporte para o desenvolvimento de novos medicamentos. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.165 p.

FISKUM, G.; STARKOV, A.; POLSTER, B. M.; CHINOPOULOS, C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 991, p. 111-119, 2003.

FRIAS, C. C.; BONIFÁCIO, K. L.; MATSUMOTO, A. K.; HIGACHI, L.; CASAGRANDE, R.; MOREIRA, E. G.; BAARBOSA, D. S. Comparison of the antioxidant potential of antiparkinsonian drugs in different in vitro models. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v.50, n.4, 2014.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GALVAN, A.; DEVERGNAS, A.; WICHMANN, T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. **Frontiers Neuroanatomy**, [s. l.], v. 9, n. 5. Published 2015.

GARCIA, L. P.; CASTRO, A. L.; ANDRADE, R. B.; FUNCHAL, C. Doenças neurodegenerativas. In: FUNCHAL, Cláudia ; DANI, Caroline. (Org.). **Neurociências**: modelos experimentais em animais. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS; Editora Metodista IPA, 2014. p. 182-186.

- GOPALAKRISHNA, A.; ALEXANDER, S. A. Understanding Parkinson Disease: a complex and multifaceted disease. **Journal of Neuroscience Nursing**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 320–326, 2015.
- GORELL J. M.; PETERSON, E. L.; RYBICKI, B. A.; JONNISON, C. C. Multiple risk factors for Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 217, n. 2, P: 169-174, 2004.
- GREENAMYRE, J. T.; CANNON, J. R.; DROLET, R.; MASTROBERARDINO, P. G. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. **Trends Pharmacological Sciences**, [s. l.], v.3, n.04, p.141–142, 2010.
- GORMAZ, G.; VALLS, N.; SOTOMAYOR, C.; TURNER, T.; RODRIGO, R. Potential role of polyphenols in the prevention of cardiovascular diseases: molecular bases. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 115–128, 2016.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v.27, 2006.
- HAAS, S. J.P.; ZHOU, X.; MACHADO, V.; WREE, A.; KRIEGLSTEIN, K.; SPITTAU, B.. Expression of Tgf $\beta$ 1 and Inflammatory Markers in the 6-hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in molecular neuroscience**, [s. l.], v. 9, p. 7, 2016.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 97, p. 1634–1658, 2006.
- HALLIWEL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sci**, [s. l.], v. 32, p. 125-130, 2011.
- HAMM, R. J.; PIKE, B. R.; ODELL, D. M.; LYETH, B. G.; JENKINS, L. W. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. **J. Neurotrauma**, [s. l.], V.11, p.187–196, 1994.
- HANCOCK, D. B.; MARTIN, E. R.; MAYHEW, G. M.; STAJICH, J. M.; JEWETT, R.; STACY, M. A. SCOTT, B.; VANCE, J.; SCOTT, W. K. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: A family-based case-control study. **BMC Neurology**, [s. l.], v. 8, n.6, p.1-12, 2008.
- HAUSER, D; HASTINGS, T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 51, p. 35-42, 2013.
- HASHIMOTO, M.; ROCKENSTEIN, E.; CREWS, L.; MASLIAH, E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Neuromolecular Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 1–2, p. 21–3, 2003.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. Dietary flavonoids: intake, health, effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v.37, n. 9, p. 937-942, 1999.

HORNYKIEWICZ, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v.70, p. 9–15, 2006.

HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson' s Disease. **Experimental Neurobiology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 11–17, 2013.

HUANG, J. H.; HUANG. C. C.; FANG, J. Y.; YANG, C.; CHAN, C. M.; WU, N. L.; KANG, S. W.; HUNG, C. F. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. **Toxicol In Vitro**. [s. l.], v.24, n.1, p.21-28, 2010.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, [s. l.], v.18, p.183-185, 2012.

JAGMAG, S. A.; TRIPATHI, N.; SHUKLA, S. D.; MAITI, S.; KHURANA, S. Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. jan. 2016.

JIA, C.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; YANG, J.; XU, C.; MAO, D. Identification of Glycoside Compounds from Tobacco by High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Linear Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry Coupled with Electrospray Ionization Orbitrap Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 629-640, 2017.

JIMENEZ, M. F. M. **Efecto protector de fraxetol y miricetina frente a la neurotoxicidad inducida por rotenona en células de neuroblastoma**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidad Complutense de Madrid, Espanha, 2004.

JO, M. G.; IKRAM, M.; JO, M. H.; YOO, L.; CHUNG, K. C.; NAH, S. Y.; HWANG, H.; RHIM, H.; KIM, M. O. Gintonin Mitigates MPTP-Induced Loss of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons and Accumulation of  $\alpha$ -Synuclein via the Nrf2/HO-1 Pathway. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, N.1, p. 39–55, 2019.

JOERS, V.; TANSEY, M. G.; MULAS, G.; CARTA, A. R. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 155, p. 57-75, 2016.

KALF, J. G.; SWART, B. J. M.; BLOEM, B. R.; MUNNEKE, M. Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson's disease: A meta-analysis. **Parkinsonism & Related Disorders**, [s. l.], v.18, n.4, p: 311-315, 2012.

KANDA, F.; OISHI, K.; KUGA. A.; KOBESSHO, H.; SHIRAFUJI. T.; HIGUCHI. H.; ISHIHARA, H. Characteristics of depression in Parkinson's disease: Evaluating with Zung's Self-Rating Depression Scale. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 14, p: 19-23, 2008.

KARUPPAGOUNDER, S. S.; MADATHIL, S. K.; PANDEY, M.; HAOBAM, R.; RAJAMMA, U.; MOHANAKUMAR, K. P. Quercetin up-regulates mitochondrial

complex - I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 236, p. 136-148, 2013.

KARUNANAYAKA, P. R.; LEE, E. Y.; LEWIS, M. M.; SEN, S.; ESLINGER, P. J.; YANG, Q, X.; HUANG, X. Default mode network differences between rigidity- and tremor-predominant Parkinson's disease. **Cortex**, [s. l.], v.81, p. 239-250, 2016.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The Molecular and Systems Biology of Memory. **Cell**, [s. l.], v. 157, n. 01, p. 163-186, 2014.

KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, [s. l.], v.2, n. 1, 2012.

KOPPULA, S.; KUMAR, H.; MORE, S. V.; KIM, B. W.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. Recent Advances on the Neuroprotective Potential of Antioxidants in Experimental Models of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 10608–10629, 2012.

KREITZER, A. C. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, p.127-14, 2009.

KUJAWSKA, M.; JADWIGA, J. Review Polyphenols in Parkinson's Disease: A Systematic Review of In Vivo Studies. **Nutrients**, [s. l.], v.10, n.642, p.01-34, 2018.

LANA, R. C. et. al. Percepção da qualidade de vida de indivíduos com doença de Parkinson através do PDQ-39. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. [s. l.], v.11, n.5, p.397-402. 2007.

LANG, A. E.; OBESO, J. A. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 3, p. 309-316, 2004.

LAU, L. M. L. DE; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, [s. l.], v. 5, p. 525–535, 2006.

LE, W.; WU, J.; TANG, Y. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 09, p. 89, 2016.

LEE, J. E.; PARK, J. H.; JANG, S. J.; KOH, H. C. Rosiglitazone inhibits chlorpyrifos-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 278, p.159–171, 2014.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, [s. l.], v.373, n.9680, p: 2055-2066,2009.

LINDGREN, H. S.; DUNNETT, S. B. Cognitive dysfunction and depression in Parkinson's disease: what can be learned from rodent models? **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, p. 1894–1907, 2012.

LIMA, M. M. S.; BRAGA, A. R.; MARQUES, S. Z.; BUENO, H. M.; TUFIK, S.; VITAL, M. A. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain Research**, [s. l.], v.110, n.1, p. 117-125, 2006.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; CARVALHO, S. M.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, L. G. L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v.35, n.4, p.664-671, 2011.

LINARD, C. F. B. M. **Efeito neuroprotetor do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico no modelo experimental animal da doença de parkinson induzido por rotenona.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

LI, J.; O, W.; LI, W.; JIANG, Z. G.; GHANBARI, H. A. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Int J Mol Sci**, [s. l.], v.14, n.12, p.24438-24475, 2013.

LIEN, E. J.; REN, S.; BUI, H. H.; WANG, R. Quantitative structure- activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Rad. Biol. Med**, [s. l.], v.26, n.3, p.285-294, 1999.

LIU, J., LI, T., THOMAS, J. M., PEI, Z., JIANG, H., ENGELENDER, S., ROSS C. A., SMITH, W. W., 2016. Synphilin-1 attenuates mutant LRRK2-induced neurodegeneration in Parkinson's disease models. **Hum Mol Genet**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 672-680, 2016.

MACHADO-FILHO, J. A.; CARREIA, A. O.; MONTENEGRO, A. B. A.; NOBRE, M. E. P.; CERQUEIRA, G. S.; NEVES, K. R. T.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E, A.; BRITO, G. A. C.; VIANA, G. S. B. Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 264, p. 116–125, 2014.

MARCHIORO, M.; DANI, C.; FUNCHAL, C. Efeito dos antioxidantes exógenos em modelos experimentais da doença de Parkinson. **Ciência em Movimento**, [s. l.], n. 36, p.93-107, 2016.

MANDAL, S. D.; MANDAL, S.; PATEL, J. Intranasal mucoadhesivemicroemulsion for neuroprotective effect of curcuminin MPTP induced Parkinson model. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 53, n.02, São Paulo, 2017.

MAPOPE, N; DAKORA, F. D. Role of Flavonoid and Isoflavonoid Molecules in Symbiotic Functioning and Host-Plant Defence in the Leguminosae. **Chemistry for Sustainable Development in Africa**, [s. l.], p. 33-48, 2013.

MARTINS, E. N.; NAIRA, T. C.; PESSANO, L. L.; ROOS, D. H.; FOLMER, V.; PUNTEL, G. O.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M.; ÁVILA, D. S.; PUNTEL, R. B. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative

stress in chronically exposed mice. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 87, p. 74–79, 2012.

MARTINEZ, L. C.; PLATA-RUEDA, A.; COLARES, H. C.; CAMPOS, J. M.; SANTOS, M. H.; FERNANDES, F. L.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Bulletin of Entomological Research**. [s. l.], v.108, n.6, p. 716-725, 2018.

MCKEITH, I.; MOSIMANN, U. P. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, [s. l.], v. 10, n.1, p.15-18.

MEREDITH G. E., SONSALLA P.; CHESSELET, M. F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathol**, [s. l.], v.115. n.4. p. 385–398, 2008.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm Bonaerense**, [s. l.], v. 25, p. 310-304, 2006.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. **Metabolism**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. S40–S46, 2015.

MYTHRI, R. B; VENKATESHAPPA, C.; HARISH, G.; MAHADEVAN, A.; MUTHANE, U. B.; YASHA, T. C.; SRINIVAS BHARATH, M. M.; SHANKAR, S. K. Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains, **Neurochem. Res**, [s. l.], v. 36, p. 1452–1463, 2011.

MOSLEY, R. L.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, B. D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; HENDELMAN, H. E. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, [s. l.], v. 6, p. 261-281, 2006.

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B. E.; MCGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, [s. l.], v.38, n.8, p. 1285-1291, 1988.

NAOI, M.; SHAMOTO-NAGAI, M.; MARUYAMA, W. Neuroprotection of multifunctional phytochemicals as novel therapeutic strategy for neurodegenerative disorders: antiapoptotic and antiamyloidogenic activities by modulation of cellular signal pathways. **Future Neurology**, [s. l.], v. 14, n.01, 2019.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson &Thompson: Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRIGUEZ, M.; LANCIEGO, J. L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in neurosciences**, [s. l.], v. 23, p. S8-S19, 2000.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; GOETZ, C. G.; MARIN, C.; KORDOWER, J. H.; RODRIGUEZ, M.; HIRSCH, E. C.; FARRER, M. F.; SCHAPIRA,

A. H. V.; HALLIDAY, G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature medicine**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010.

OLANOW, C. W. Levodopa: Effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 37–44, 2015.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; SALEMA, B.; KHAIR, A.; HAQUE, E. Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. **Drug Des Devel Ther**, [s. l.], v. 9, p. 5499–5510, 2015.

OUCHI, Y.; YOSHIKAWA, E.; SEKINE, Y.; FUTATSUBASHI, M.; KANNO, T.; OGUSU, T.; TORIZUKA, T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 168–175, 2005.

PARKER, K. L.; LAMICHHANE, D.; CAETONO, M. S.; NARAYANAN, N. S. Executive dysfunction in Parkinson's disease and timing deficits. **Frontiers in integrative neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 75, p. 75, out. 2013.

PEREZ, R. G., WAYMIRE, J. C., LIN, E., LIU, J. J., GUO, F., ZIGMOND, M. J. A role for alfa-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. **The Journal of Neuroscience**. [s. l.], v. 22, n.8, p. 3090-3099, 2002.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, J.; ZALDIVAR-MACHORRO, V. J.; VILLANUEVA-PORRAS, D.; VEGA-ÁVILA, E. CHAVARRÍA, A. A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases: Phytodrugs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 1-19, 2016.

PERIER, C.; BOVÉ, J.; VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. The rotenone model of Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 26, p. 345-346, 2003.

PEPATO, M. T.; FOLGADO, V. B. B.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. Lack of antidiabetic effect of Eugenia jambolana leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Braz J Med Biol Res**, [s. l.], v. 34, p. 389-395, 2001.

PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Nat. Prod**, [s. l.], v.63, p.1035-1042, 2000.

PIO CÔRREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 2. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. 777p.

POLITIS, M.; LOANE, C. Buspirone: What is it all about? **Brain Research**, [s. l.], v. 1461, p: 111-111, 2012.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A. STEEVES, T. D. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.

PROU, D.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. **NeuroRx**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 484–494, 2005.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**. [s. l.], v.82, n.4, p.513-523, 2011.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A. S.; MNNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Neurociências**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A. S.; WHITE, L. E. **Neuroscience**. 3 ed. Sunderland, Massachusetts, 2010.

QIN, X, Y.; ZHANG, S. P.; CAO, C. LO, Y. P.; CHENG. Y. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Neurology**, [s. l.], v.73, n.11, p- 1316-1324, 2016.

QIU, R.; WANGA, J.; PARKINB, K. L. Activity-guided isolation of phase II enzyme inducers from buckwheat flour methanolic extracts. **J Sci Food Agric**, [s. l.], 2018. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.9023.

RANG, H. P.; DALR. M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 508-522.

RAHIMIFARD, M.; MAQBOOL, F.; MOEINI-NODEH, S.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. M.; NABAVI, S. F. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. **Ageing Res Rev**, [s. l.], v.36, p.11-19, 2017.

RAPPOLD, P. M.; TIEU, K. Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 413–423, 2010.

REEVE, A.; SIMCOX, E.; TURNBULL, D. Ageing and Parkinson' s disease: Why is advancing age the biggest risk factor? **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 14, p. 19–30, 2014.

RÊGO, T. J. A. S. **Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão**. São Luís: EDUFMA, 2008.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobot Res Appl**, [s. l.], v.3. p. 25-35, 2005.

RIBEIRO, M. G. Antiparkinsonianos. In: SILVA, P. (Org.). **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 411- 486.

RIBEIRO, R. M.; BORGES, A. C. R.; PINHEIRO NETO, V. F. P.; FREIRE, S. M. F.; SILVA, S. N.; CARTÁGENES, M. S. S. BORGES, M. O. R. **Formulação de composição farmacêutica de liofilizado de extrato e/ou fração ativas de partes aéreas de Syzygium cumini, e seu uso na redução da pressão arterial**. Depositante: Universidade Federal do MaranhãoBrazil. PI1101652-3A2, Depósito: 12 abr. 2011, Concessão: 18 jun. 2013.

RIEDEL, O.; SPOTTKE, A.; FÖRSTL, A.; HEUSER, I.; REICHMANN, H.; TRENKWALDER, C.; WITTCHEN, H. U.; KLOTSCH, J.; DEUSCHL, G.; HENN, F.; OERTEL, W.; RIEDERER, P.; DODEL, R. Frequency of dementia, depression, and other neuropsychiatric symptoms in 1,449 outpatients with Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 257, n. 7, p: 1073–1082, 2010.

RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **CMAJ**, [s. l.], p. 1–9, 2016.

ROCHA, N. P.; DE MIRANDA, A. S.; TEIXEIRA, A. L. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2015, p. 628192, 2015.

RODRÍGUEZ, S.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Striatal TH-immunopositive fibers recover after an intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in golden hamsters treated with prednisolone: Roles of tumor necrosis factor- and inducible nitric oxide synthase in neurodegeneration. **Neuroscience Research**, [s. l.], v.76, p. 83-92, 2013.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉ, R.; AMESSIS-OUCHEMOUKH, N; MADANI, K.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, A. A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from Pistacia lentiscus leaves. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, [s. l.], v. 77, p. 167-174, 2013.

ROMANO, B.; PAGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A. F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 27, p. 1588-1596, 2013.

ROSS, I. A. Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, Traditional and Modern Uses. **Human Press**, [s. l.], Totowa, p. 283-289, 1999

RUAN, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Evaluation of the antioxidant activity of Syzygium cumini leaves. **Molecules**, [s. l.], v. 13, n.10, p. 2545-2556, 2008.

RUTHURUSAMY, E. T.; HAMEED, S. S.; PALANISAMY, S. Anti-cancer and anti-oxidative potential of Syzygium cumini against breast cancer cell lines. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 7, n. 10, p.449-460, 2015.

RZEPECKA-STOJKO, A.; STOJKO, J.; KUREK-GORECKA, A. GÓRECKI, M.; KABALA-DZIK, A.; KUBINA, R.; MÓZDZIERZ, A.; BUSZMAN, E. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 21732– 21749, 2015.

SAGRAWAT, H.; MANN, A. S.; KHARYA, M. D. Pharmacological potential of Eugenia jambolana: a review. **Pharmacogn Mag**, [s. l.], v. 2. p. 96-104, 2006.

SAIJO, K.; WINNER, B.; CARSON, C. T.; COLLIER, J. G.; BOYER, L.; ROSENFELD, M. G.; GAGE, F. H.; GLASS, C. K. A Nurr1/CoREST

transexpression.pathway attenuates neurotoxic inflammation in activated microglia and astrocytes. **Cell**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 47–59, 2009.

SAMPAIO, G.S.A. **Sintomas não-motores na DP: Modelo de lesão intraestriatal por 6-OHDA em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2014. 60 p.

SANTIAGO, J. A.; POTASHKIN, J. A. Network-based metaanalysis identifies HNF4A and PTBP1 as longitudinally dynamic biomarkers for Parkinson's disease. **PNAS**, [s. l.], v. 112, n.7, p: 2257-2262, 2015.

SANCHES, J. R.; FRANÇA, L. M.; CHAGAS, V. T.; GASPAR, R. S.; DANTOS, K. A.; GONÇALVES, L. M.; SLOBODA, D. M.; HOLLOWAY, A. C.; DUTRA, R. P.; CARNEIRO, E. M.; CAPPELLI, A. P. G.; PAES, A. M. A. Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. **Frontiers Pharmacology**. [s. l.], v.10, p. 7-48, 2016.

SANZ, M.; SIMÓN, B. F.; CADAHÍA, E.; ESTERUELAS, E.; MUÑOZ, A. M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; PINTO, E. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 905-918, 2012.

SCHIAR, V. P. P.; DOS SANTOS, D. B.; LÜDTKE, D. S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M. W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, [s. l.] v.21, p. 139–145, 2007.

SCHÖBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v.318, n. 01, p. 215–224, 2004.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 43, n. 2, p.153-166, 2007.

SELVARAJ, S.; SUN, Y.; WATT, J. A.; WANG, S.; LEI, S.; BIRNBAUMER, L.; SINGH, B. B. Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 122. n. 4. p. 1354-1367, 2012.

SHAHPIRI, Z.; BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; FARZAEI, F.; RAHIMI, R. Phytochemicals as future drugs for Parkinson's disease: A comprehensive review. **Reviews in the Neurosciences**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 651–668, 2016.

SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S.; DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol**, [s. l.], v.85, p.201-206, 2003.

SHARMA, B.; VISWANATH, G.; SALUNKE, R.; ROY, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 110, n.3, p: 697-705, 2008.

SHARMA, Y.; MEHROTRA, A.; KUNDU, N.; SRIVASTAVA, N. S. A study of antibacterial, antioxidant and neuroprotective effect of stem of *Syzygium cumini*. **International Journal of Green Pharmacy**, [s. l.], v. 11, n.4, p. 236-243, 2017.

SHERER, T. B; KIM, J. H; BETARBET, R; GREENAMYRE, J. T. Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and  $\alpha$ -Synuclein Aggregation. **Experimental Neurology**, [s. l.], v.179, p. 9–16, 2003.

SHIMADA, A.; KEINO, H.; SATOH, M.; KISHIKAWA, M.; HOSOKAWA, M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: A model of cerebral degeneration. **Synapse**, [s. l.], v. 48, n. 4, p.198-204, 2003.

SILVA, D. P. D. Caracterização de compostos fenólicos por espectrometria de massas e potencial antioxidante das cascas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) do cariri paraibano. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2018.

SILVA, M. R.; FREITAS, L. G.; SOUZA, A. G.; ARAÚJO, R. L. B.; LACERDA, I. C. A.; PEREIRA, H. V.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F. Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using Paper Spray Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1034-1044, 2019.

SILVA, P. S.; CARVALHO, C. R. A. Doença de Parkinson: o tratamento terapêutico ocupacional na perspectiva dos profissionais e idosos. **Caderno Brasileiro de Terapia Ocupacional**, [s. l.], v.27.n.02, p.331-344, 2019.

SIMIRGIOTIS, M. J.; BÓRQUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. **Food chemistry**, [s. l.], v. 139, n. 1-4, p. 289-299, 2013.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 4. ed. 2012.

SOLARI, N.; BONITO-OLIVA, A.; FISONE, G.; BRAMBILLA, R. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. **Learn Mem**, [s. l.], v.18, n.10, p. 592-600, 2013.

SONSALLA, P. K. Fármacos Usados em Distúrbios Neurodegenerativos. In: CRAIG, C. R.; STITZET, R. E. **Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 341-349.

SPENCER, K. A.; ROGERS, M. A. Speech motor programming in hypokinetic and ataxic dysarthria. **Brain and Language**, [s. l.], v. 94, p. 347–366, 2005.

STAYTE, S.; VISSSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1–29, 2014.

SUBRAMANIAM, S. R.; ELLIS, E. M. Neuroprotective Effects of Umbelliferone and Esculetin in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 91, p. 453-461, 2013.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, [s. l.], v.106-107, p. 17-32, 2013.

SUTACHAN, J. J.; CASAS, Z.; ALBARRACIN, S.L.; STAB, B.R.N.D.; SAMUDIO, I.; GONZALEZ, J.; MORALES, L.; BARRETO, G. Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease. **Nutr Neurosci**, [s. l.], V.15, p.120-126, 2012.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of Syzygium cumini: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 93, n. 9, p. 2084–2093, 2013.

TAKAHASHI, K.; KAMIDE, N.; SUZUKI, M.; FUKUDA, M. Quality of life in people with Parkinson's disease: the relevance of social relationships and communication. **Journal of physical therapy science**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 541–6, 2016.

TAGLIAFERRO, P.; BURKE, R. E. Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–15, 2016.

TIEVE, H. A. G; MENESES, M. S. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

TITOVA, N.; PADMAKUMA, C.; LEWIS, S. J. G.; CHAUDHUR, K. R. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v.124, n.8, p: 907–99, 2017.

THE GLOBAL IMPACT OF DEMENTIA: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London: Alzheimer's Disease International, 2015.

TORBEEY, E.; PACHANA, N. A.; DISSANAYAKA, N. N. W. Depression rating scales in Parkinson's disease: A critical review updating recent literature. *Journal of Affective Disorders*, [s. l.], v. 184, p: 216-224, 2015.

TRUSHINA, E.; MCMURRAY, C. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **J. Neurosci**, [s. l.], v. 145 n. 4, p. 1233-1248, 2007.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 65–74, 2009.

UC, E. Y.; FOLLET, K. A. Deep Brain Stimulation in Movement Disorders. **Seminars in Neurology**, [s. l.], v.27, n.02, p.170-182,2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VARDHAN, N.; KUMAR, S.S.; RAGHAVAN, V.R. Neuro vigilance of Syzygium Cuminiplant phytochemicals. **Int. J. Res. Pharm. Sci**, [s. l.], v.9, n. 3, p.806-815, 2018.

VITROCELL, Embriolife. Disponível em: [http://www.vitrocell.com.br/vitrocell\\_dmemb.html](http://www.vitrocell.com.br/vitrocell_dmemb.html), 2018. Acesso:13 Janeiro 2018.

WALSH, B.; SMITH, A. Basic Parameters of Articulatory Movements and Acoustics in Individuals with Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 27, n. 7, 2012

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational neurodegeneration**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 19, 2015.

WEI, Z.; XIAOWAN, L.; XIXI, L.; QINGSHAN, L.; YONG, C. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v.11, n. 236, p. 01-07, 2018.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H. O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, [s. l.], v. 26, p:51-58, 2011.

WU, Y. N.; JOHNSON, S. W. Dopamine oxidation facilitates rotenone-dependent potentiation of N-methyl-d-aspartate currents in rat substantia nigra dopamine neurons. **Neuroscience**, [s. l.], v.195, p.138-144, 2011.

WU, T.; WANG, J.; WANG, C.; HALLET, M.; ZANG, Y.; WU, X.; CHAN, P. Basal ganglia circuits changes in Parkinson's disease patients. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 524, n. 1, p. 55–59, 2012.

YANG, Z. G.; SUN, H. X.; FANG, W. H. Haemolytic activities and adjuvant effect of Astragalus membranaceus saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine**, [s. l.], v.23, p.5196-5203, 2005.

YANG, C.; LIM, W.; BAZER, F. W.; SONG, G. Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. **Cancer Lett**, [s. l.], v 28, n.399, p.10-19, 2017.

YANG, Y.; CHENG, X.; LI, W.; LIU, M.; WANG, Y.; GUAN-HUA, D. Kaempferol Attenuates LPS-Induced Striatum Injury in Mice Involving Anti-Neuroinflammation, Maintaining BBB Integrity, and Down-Regulating the HMGB1/TLR4 Pathway.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. Mitochondria and

Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders: **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v.1147, p. 93–104, 2008.

WAKABAYASHI, K., TANJI, K., ODAGIRI, S. et. al. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 47, n.02, p.495-508, 2013.

WOJDA, U.; SALINSKA, E.; KUZNICKI, J. Calcium ions in neuronal degeneration **IUBMB Life**, [s. l.], v.60, p.575-590, 2008.

ZHANG, L.; HAO, J.; ZHENG, Y.; SU, R.; LIAO, Y.; GONG, X.; LIU, L.; WANG, X. Fucoidan protects dopaminergic neurons by enhancing the mitochondrial function in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease. **Aging and Disease**, [s. l.], v.9, n.4, p.590-04, 2018.

ZAVARIZ, R. C.; LIMEIRA, D. M. Possíveis Etiologias Para a Doença de Parkinson: Uma Breve Revisão Bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2012.

**APENDICE A - Pedido de patente depositado**

23/01/2019 870190007360  
16:25  
  
29409161812661800

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 001370 2

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 06279103000119

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65080-805

**País:** Brasil

**Telefone:** (98) 32728710

**Fax:**

**Email:** nit-dapi@ufma.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/01/2019 às 16:25, Petição 870190007360

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ORAIS À BASE DE SYZYGIUM JAMBOLANUM

**Resumo:** A presente invenção trata-se de composições farmacêuticas a base de extrato liofilizado de Syzygium jambolanum e seu uso no auxílio do tratamento de doenças neurodegenerativas, como alternativa de origem natural eficiente sem a complexidade das formulações e os significativos efeitos adversos apresentados pelos tratamentos convencionais antioxidante e neuroprotetor.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/01/2019 às 16:25, Petição 870190007360

**Dados do Inventor (72)**

---

Inventor 1 de 5

Nome: NAIME DIANE SAUAIA HOLANDA SILVA

CPF: 91391091353

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: RUA CUMÃ LT 08 RESIDENCIAL MARIA AMÁLIA APTO 904  
JARDIM RENASCENÇA II

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65075-700

País: BRASIL

Telefone: (98) 999 948224

Fax:

Email: naimediane@yahoo.com.br

Inventor 2 de 5

Nome: DÉBORA LUANA RIBEIRO PESSOA

CPF: 64662519349

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: RUA 20, QUADRA 09, CASA 14, CENTRAL PARK-ARAÇAGY

Cidade: São José de Ribamar

Estado: MA

CEP: 65110-000

País: BRASIL

Telefone: (98) 988 535829

Fax:

Email: debbyeluna2@yahoo.com.br

Inventor 3 de 5

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/01/2019 às  
16:25, Petição 870190007360

Nome: MARILENE OLIVEIRA DA ROCHA BORGES

CPF: 22729860215

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: RUA OSIRES, 6. EDIFÍCIO EL GRECO, APTO. 602, JARDIM  
RENASCENÇA

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65975-775

País: BRASIL

Telefone: (98) 992 224445

Fax:

Email: rocha.marilene@ufma.br

Inventor 4 de 5

Nome: BRUNO ARAÚJO SERRA PINTO

CPF: 95487158304

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: RUA DA MATA 18 OLHO DAGUA

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65067-540

País: BRASIL

Telefone: (98) 999 692506

Fax:

Email: bruno\_iznougood@yahoo.com.br

Inventor 5 de 5

Nome: ANTONIO CARLOS ROMÃO BORGES

CPF: 23718331349

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: RUA OSIRES, 6. EDIFÍCIO EL GRECO, APTO. 602, JARDIM  
RENASCENÇA

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65075-775

País: BRASIL

Telefone: (98) 992 084446

Fax:

Email: romao.antonio@ufma.br

#### Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	DEPÓSITO 2-merged.pdf

#### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A8081FA

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 18/01/2019

#### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/01/2019 às 16:25, Petição 870190007380

**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ORAIS À BASE DE  
*SYZYGIUM JAMBOLANUM***

**Campo da invenção**

[001] A presente invenção trata de composições farmacêuticas por via oral a base de *Syzygium jambolanum* com aplicações antioxidante e neuroprotetora.

**Fundamentos da invenção**

[002] Doenças neurodegenerativas são desordens progressivas do sistema nervoso que afetam a função e manutenção de populações neuronais específicas. A maioria destas doenças partilha várias características comuns, tais como: ausência de sintomas durante os primeiros estágios da doença e rápida progressão com o envelhecimento; perdas cognitivas (principalmente aprendizado e memória); transtornos afetivos, de humor e de comportamento; desordens motoras; surgimento de depósitos proteicos anormais (proteínas mal enoveladas) e perda progressiva neuronal e/ou glial. A doença de Alzheimer e a doença de Parkinson são as doenças neurodegenerativas com maior importância epidemiológica no mundo.

[003] O estresse oxidativo e a inflamação estão entre os principais mecanismos envolvidos na neurodegeneração dopaminérgica característica da Doença de Parkinson (DP),

exercendo um papel importante na fisiopatologia desta doença. Nos últimos anos, os modelos animais de DP têm se mostrado úteis para estudar o papel do estresse oxidativo e da inflamação na fisiopatologia da DP, bem como têm indicado que a terapia com compostos antioxidantes e anti-inflamatórios pode ser uma alternativa para a prevenção ou tratamento da DP.

[004]. As doenças neurodegenerativas continuam a ser umas das principais causas de deficiência neurológica e sua prevalência ocorre em todo o mundo, em todos os grupos raciais e étnicos, o que justifica os esforços destinados a melhorar o seu tratamento. Entretanto, até o momento não foi encontrada uma terapêutica definitiva que cure ou impeça, de forma efetiva, a progressão dessas doenças, sendo que, as drogas utilizadas atualmente no tratamento são apenas sintomáticas, uma vez que nenhuma delas faz desaparecer a degeneração neuronal. Desta forma, substâncias naturais e de baixo custo que possam atuar protegendo as células do estresse oxidativo, minimizando as alterações mitocondriais, da inflamação e apoptose, são fortes candidatas ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da cura e da prevenção.

[005] Nenhum dos tratamentos disponíveis é capaz de prevenir a progressão ou restaurar o dano neuronal característico da DP. Portanto, o tratamento dos pacientes com DP é apenas

sintomático. A terapia de reposição dopaminérgica através do uso da L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) permanece a opção de primeira escolha para o tratamento dos sintomas motores da DP. Contudo, a eficácia da terapia com L-DOPA declina ao longo do tempo e complicações motoras, tais como discinesias e flutuações motoras, têm sido associadas ao seu uso prolongado.

[006] A deficiência de terapias neuroprotetoras para a DP e as complicações associadas às mesmas têm incentivado o desenvolvimento de estudos com o objetivo de desvendar os mecanismos fisiopatológicos desta doença, bem como formular estratégias terapêuticas capazes de prevenir a neurodegeneração

[007] Em função da complexidade dos tratamentos, bem como os significativos efeitos adversos, tem-se buscado a utilização de produtos vegetais com atividade antioxidante e neuroprotetora, com o objetivo de minimizar a evolução das doenças neurodegenerativas. Neste contexto, destaca-se a utilização de *Syzygium jambolanum*.

[008] No estado do Maranhão a espécie vegetal *Syzygium jambolanum* é amplamente utilizada pela população. Estudos científicos vêm sendo desenvolvidos no Estado, e patentes indicando produtos e processos já foram depositados como PI 1101652-3, de Sônia Maria de Farias Freire e colaboradores, que trata de composição farmacêutica de liofilizado de extrato e/ou

frações ativas de partes aéreas de *Syzygium cumini*, e seu uso na redução arterial. Estudos de avaliação da atividade neuroprotetora foram realizados utilizando o referido extrato, com resultados satisfatórios em concentrações de 5 a 500 mg/Kg.

[009] De acordo com Sharma, B; Balomajumder, C.; Roy, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2008 Jul;46(7):2376-83 (com modificações), o extrato de *Syzygium jambolanum* rico em polifenóis (ERP), pode ser obtido com o desenvolvimento das seguintes etapas: as folhas pulverizadas secas (150g) foram submetidas à extração por maceração com etanol: água (70: 30 v/v) sob agitação constante por 24 horas a 25°C (hidromódulo 1:6 m/v). O macerado foi filtrado com papel filtro e o pó residual submetido pelo mesmo processo por mais duas vezes, totalizando três extrações. Os extratos foram reunidos, centrifugados a 3500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi concentrado (38°C) em rotaevaporador para obtenção do extrato hidroalcólico bruto (EHB). O EHB foi submetido à partição com clorofórmio (1:1 v/v), por 3 minutos e a fase orgânica foi lavada com acetato de etila (1:1 v/v), por 3 minutos. A fração do acetato de etila foi concentrada a (38°C) e liofilizada, rendendo o extrato rico em polifenóis (ERP).

[010] É sabido que tradicionalmente os fármacos disponíveis no tratamento da Doença de Parkinson (DP) não apresentam eficácia na prevenção da progressão da doença, bem como expõe o paciente a efeitos adversos motores.

**Objetivo da invenção:**

[011] Com o intuito de solucionar ou minimizar tais problemas desenvolveu-se a presente invenção, que tem como objetivo a obtenção de composições farmacêuticas utilizando extrato de *Syzygium jambolanum* em sua constituição ou fórmula de forma a obter um produto farmacêutico de origem natural e com uso terapêutico como antioxidante e neuroprotetor, mais especificamente na Doença de Parkinson (DP), sendo alternativa mais econômica e que não apresenta os efeitos adversos das terapias convencionais.

**Breve descrição da invenção**

[012] A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas por via oral à base do extrato rico em polifenóis (ERP) e liofilizado de *Syzygium jambolanum* com atividade e uso terapêutico antioxidante e neuroprotetor. As partes aéreas “in natura” foram pulverizadas e maceradas com etanol 70%, em seguida particionado e liofilizado. O extrato liofilizado foi utilizado em metodologias de atividade antioxidante e de neuroproteção, com maior atividade neuroprotetora em

comparação com os ratos que utilizaram apenas solução salina (0,1 mL/100g).

#### **Descrição detalhada da invenção**

[013] As composições farmacêuticas são obtidas do extrato rico em polifenóis (ERP) liofilizado, na forma de cápsulas, xarope e solução oral, apresentando os seguintes parâmetros e especificações: coloração marrom esverdeada, sem odor, tendo como objetivo auxiliar como antioxidante e neuroprotetor, conforme segue:

[014] Processos farmacotécnicos de preparação das cápsulas contendo liofilizado obtido do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolanum*.

[015] Preparar as cápsulas gelatinosas de acordo com as técnicas farmacotécnicas clássicas, de tal forma que cada cápsula tenha a seguinte composição:

- Liofilizado do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolanum*.. 10 – 250mg
- Excipiente q.s.p  
.....1 cápsula

[016] Processos farmacotécnicos da preparação de xarope contendo liofilizado obtido do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolanum*

7/6

[017] Preparar o xarope de acordo com as técnicas farmacotécnicas clássicas, de tal forma que cada 2 mL tenha a seguinte composição:

- Liofilizado do extrato rico em polifenóis (ERP).. de *Syzygium jambolanum*..... 25 – 100 mg
- Excipiente (isento de açúcar) q.s.p..... 2 mL

[018] Processos farmacotécnicos da preparação de solução oral – gotas contendo liofilizado obtido do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolanum*

[019] Preparar uma solução oral – gotas de acordo com as técnicas farmacotécnicas clássicas, de tal forma que cada 2 mL tenha a seguinte composição:

- Liofilizado do extrato rico em polifenóis (ERP) ... de *Syzygium jambolanum*..... 10 – 50 mg
- Excipiente (isento de açúcar) q.s.p..... 2 mL

#### **Descrição detalhada do excipiente**

[020] O excipiente sugerido no nas composições pode ser um veículo suspensor estruturado livre de açúcar ou um veículo para solução oral isento de açúcar, dependendo da formulação final, recomendando-se as seguintes composições para os excipientes em água purificada q.s.p 100 mL:

8/6

1. Agentes flavorizantes (corretivos de sabor):
    - a. Aroma de uva: 0,07%
    - b. Vanilina: 0,025%
    - c. Maltol: 0,030%
    - d. Xilitol: 0,10 – 0,40g
  2. Agentes umectantes (dispersantes):
    - a. Glicerina bidestilada: 1- 15%
    - b. Propilenoglicol: 2 – 10%
    - c. Sorbitol 70%: 10 – 40 mL
    - d. Sorbitol em pó: 1 – 8g
  3. Agente suspensor
    - a. Goma xantana: 0,3 – 1,5%
  4. Estabilizante microbiológico
    - a. Metilparabeno: 0,01 – 4%
    - b. Sorbato de potássio: 0,2 – 0,6%
  5. Ajuste de pH entre 4,8 e 6,0
  6. Banho-maria com temperatura controlada entre 40 e 55°C.
- [021] Outras formas de apresentação poderão futuramente ser utilizadas e produzidas a partir da formulação básica, sem que com isso se fuja do escopo da proteção pretendida.

## REIVINDICAÇÕES

1. **Composições farmacêuticas orais**, caracterizado por serem constituídas de liofilizado obtido do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolamum* nas concentrações de 10 a 250 mg nas seguintes composições: cápsulas, xarope e solução oral (gotas).

2. **Composições farmacêuticas orais**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as cápsulas conterem, cada uma, a seguinte composição:

Liofilizado do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolamum*..... 10 – 250mg  
Excipiente q.s.p.....1 cápsula

3. **Composições farmacêuticas orais**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por xarope ser preparado de tal forma que cada 2 mL tenha a seguinte composição:

Liofilizado do extrato rico em polifenóis (ERP) de *Syzygium jambolamum*..... 25 – 100 mg  
Excipiente (isento de açúcar) q.s.p.....2mL

4. **Composições farmacêuticas orais**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a solução oral (gotas) ser preparada de tal forma que cada 2 mL tenha a seguinte composição:

Liofilizado do extrato rico em polifenóis (ERP) de  
*Syzygium jambolamum*..... 10 – 50 mg  
Excipiente (isento de açúcar) q.s.p.....2 mL

**5. Composições farmacêuticas orais**, de acordo com as reivindicações de 2 a 4, caracterizado por o excipiente sugerido nas composições poder ser um veículo suspensor estruturado livre de açúcar ou um veículo para solução oral isento de açúcar, dependendo da formulação final, sendo, preferencialmente as seguintes composições para os excipientes em água purificada q.s.p 100 mL:

Agentes flavorizantes (corretivos de sabor):

- a. Aroma de uva: 0,07%
- b. Vanilina: 0,025%
- c. Maltol: 0,030%
- d. Xilitol: 0,10 – 0,40g

Agentes umectantes (dispersantes):

- a. Glicerina bidestilada: 1- 15%
- b. Propilenoglicol: 2 – 10%
- c. Sorbitol 70%: 10 – 40 mL
- d. Sorbitol em pó: 1 – 8g

Agente suspensor

- a. Goma xantana: 0,3 – 1,5%

Estabilizante microbiológico

- a. Metilparabeno: 0,01 – 4%
- b. Sorbato de potássio: 0,2 – 0,6%

1/1

**RESUMO****COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ORAIS À BASE DE  
*SYZYGIUM JAMBOLANUM***

A presente invenção trata-se de composições farmacêuticas a base de extrato liofilizado de *Syzygium jambolanum* e seu uso no auxílio do tratamento de doenças neurodegenerativas, como alternativa de origem natural eficiente sem a complexidade das formulações e os significativos efeitos adversos apresentados pelos tratamentos convencionais antioxidante e neuroprotetor.

[bb.com.br] - Boleto gerado pelo sistema MPAG. 30/11/2018 10:32:36

**INSTRUÇÕES:**

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

**Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.**

**Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.**

BANCO DO BRASIL		001-9	00190.00009 02940.916188 12661.800172 9 77530000007000				Recibo do Pagador
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço							
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO CPF/CNPJ: 06279103000119							
CIDADE UNIVERSITÁRIA DOM DELGADO AV DOS PORTUGUESES 1966 VILA BACANGA, SAO LUIS -MA CEP:65080805							
Sacador/Avalista							
Nosso-Número	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(-) Valor Pago			
29409161812661800	29409161812661800	29/12/2018	70,00				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço							
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37							
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910							
Agência/Código do Beneficiário			Autenticação Mecânica				
2234-9 / 333028-1							

BANCO DO BRASIL		001-9	00190.00009 02940.916188 12661.800172 9 77530000007000			
Local de Pagamento						Data de Vencimento
<b>PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO</b>						29/12/2018
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ						Agência/Código do Beneficiário
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37						2234-9 / 333028-1
Data do Documento	Nr. Documento	Espécie DOC	Acelte	Data do Processamento	Nosso-Número	
30/11/2018	29409161812661800	DS	N	30/11/2018	29409161812661800	
Uso do Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	vValor	(-) Valor do Documento	
29409161812661800	17	R\$		70,00		
Informações de Responsabilidade do Beneficiário						(-) Desconto/Abatimento
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.						
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.						
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n						(-) Juros/Multa
o campo Número de Referência na emissão do pagamento.						
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de						(-) Valor Cobrado
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT						
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço						Código de Baixa
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO CPF/CNPJ: 06279103000119						
CIDADE UNIVERSITÁRIA DOM DELGADO AV DOS PORTUGUESES 1966 VILA BACANGA ,						
SAO LUIS-MA CEP:65080805						
Sacador/Avalista						Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação



SIAFI2018-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO  
 05/12/18 17:23 USUARIO : PATRYCYA  
 DATA EMISSAO : 05Dez18 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2018GR800109  
 UG/GESTAO EMITENTE : 154041 / 15258 - FUNDACAO UNIVERSIDADE DO MARANHAO  
 UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU  
 RECOLHEDOR : 154041 GESTAO : 15258  
 CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: NOV18 VENCIMENTO: 14Dez18  
 DOC. ORIGEM: 154041 / 15258 / 2018NP002161 PROCESSO : 23115.042623/2018  
 RECURSO : 1  
 (-) VALOR DOCUMENTO : 70,00  
 (-) DESCONTO/ABATIMENTO :  
 (-) OUTRAS DEDUÇÕES :  
 (+) MORA/MULTA :  
 (+) JUROS/ENCARGOS :  
 (+) OUTROS ACRESCIMOS :  
 (-) VALOR TOTAL : 70,00  
 NCSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161812661800  
 CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4  
 OBSERVACAO  
 PROC. 044202/2018-17 - PAGAMENTO DE TAXA DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE A SE  
 R SUBMETIDO PELA UFMA JUNTO AO INPI, CONFORME O EXPOSTO E DELIBERADO NO PROCES  
 LANÇADO POR : 15346471120 - AVELINO UG : 154041 05Dez2018 15:55  
 PF1-AJUDA PF3-SAI PF2-DADOS CRC/FIN PF4-ESPELHO PF12-RETORNA

**ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal  
- CEUA/UFMA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA**

**CIAEP:01.0341.2014**

**CERTIFICADO**

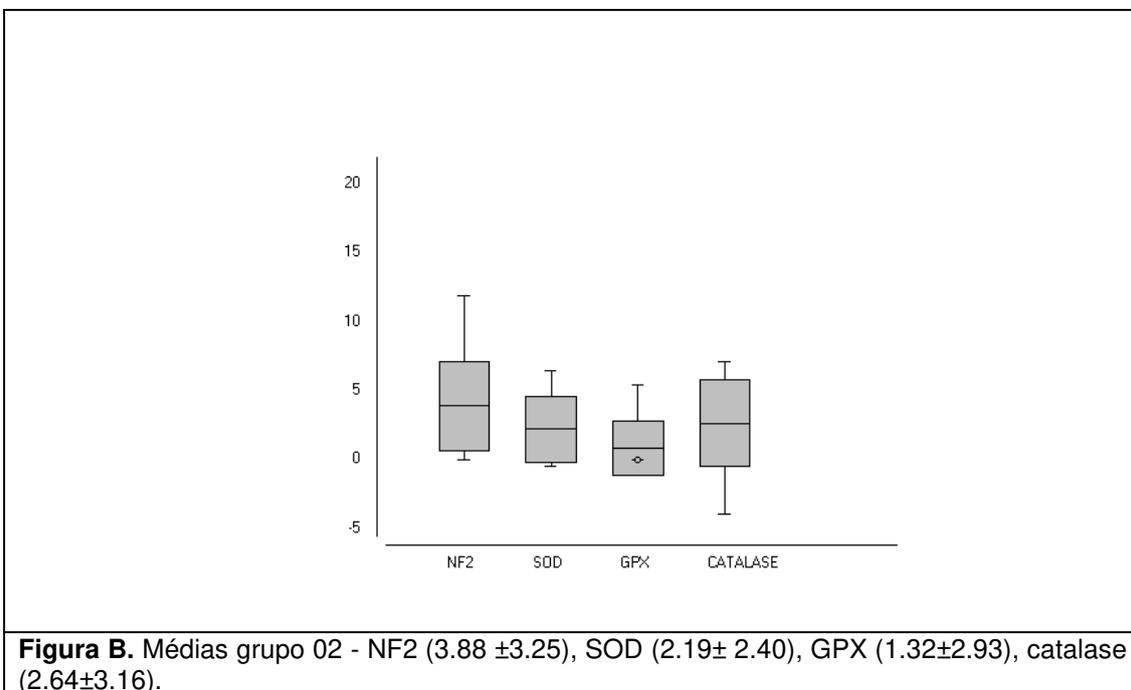
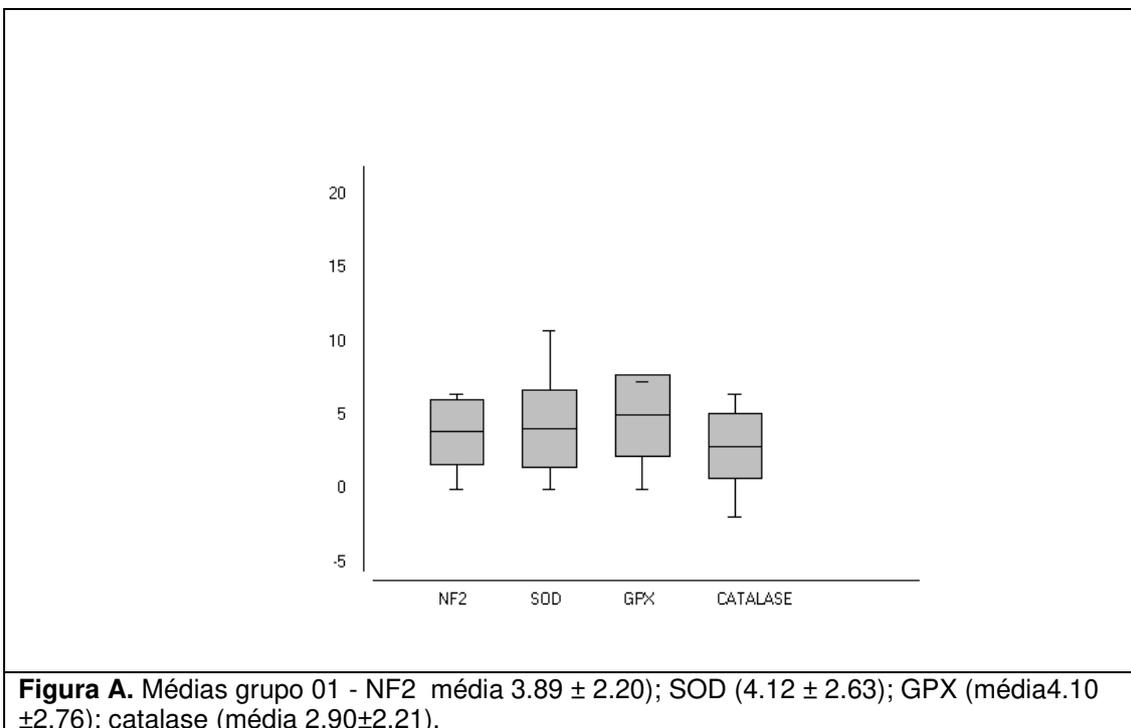
Certificamos que a proposta intitulada “**Bioprospecção das atividades antioxidante e antiparkinsoniana de formulações de extratos das folhas de Syzygium cumini (L) Skeels, aplicável no controle de doenças neurodegenerativas.**” registrada com o nº 23115.007993/2017-13, sob a responsabilidade de **Antonio Carlos Romao Borges**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

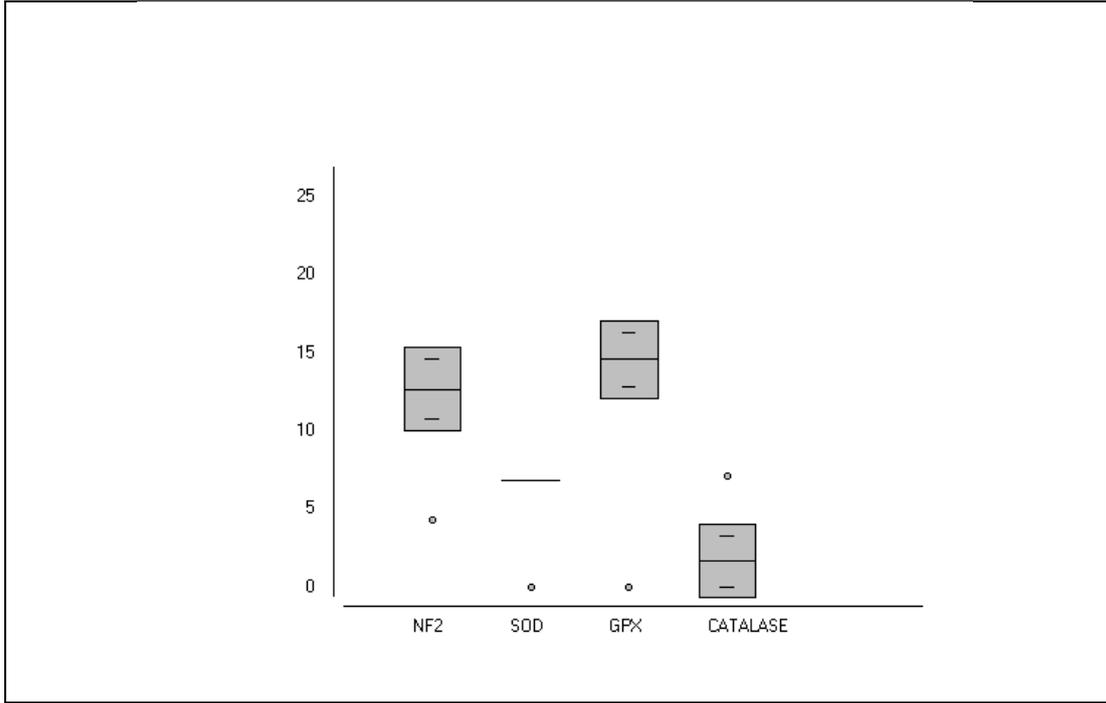
FINALIDADE	( ) ENSINO (X) PESQUISA ( ) EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/09/2017 à 01/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos/Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> )
Nº de animais	20
Peso/Idade	400g/90 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMA

*Lucilene Amorim Silva*

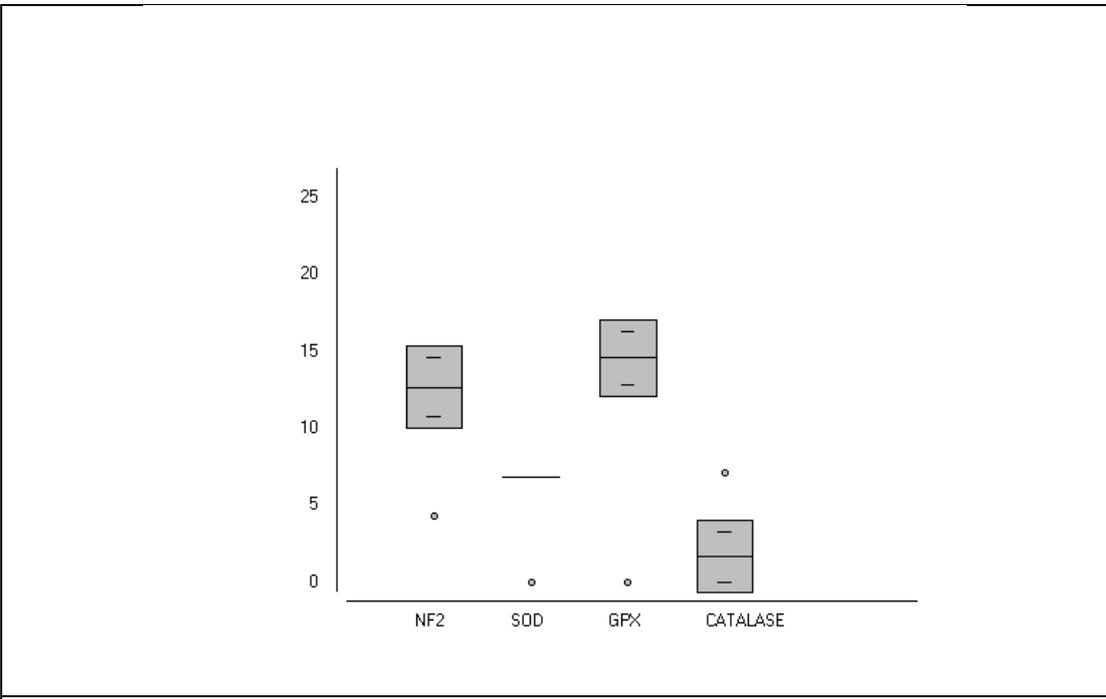
Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva  
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA  
UFMA

**ANEXO B - Resultados da expressão gênica em PCR - real time dos genes das enzimas oxidativas nos grupos experimentais**

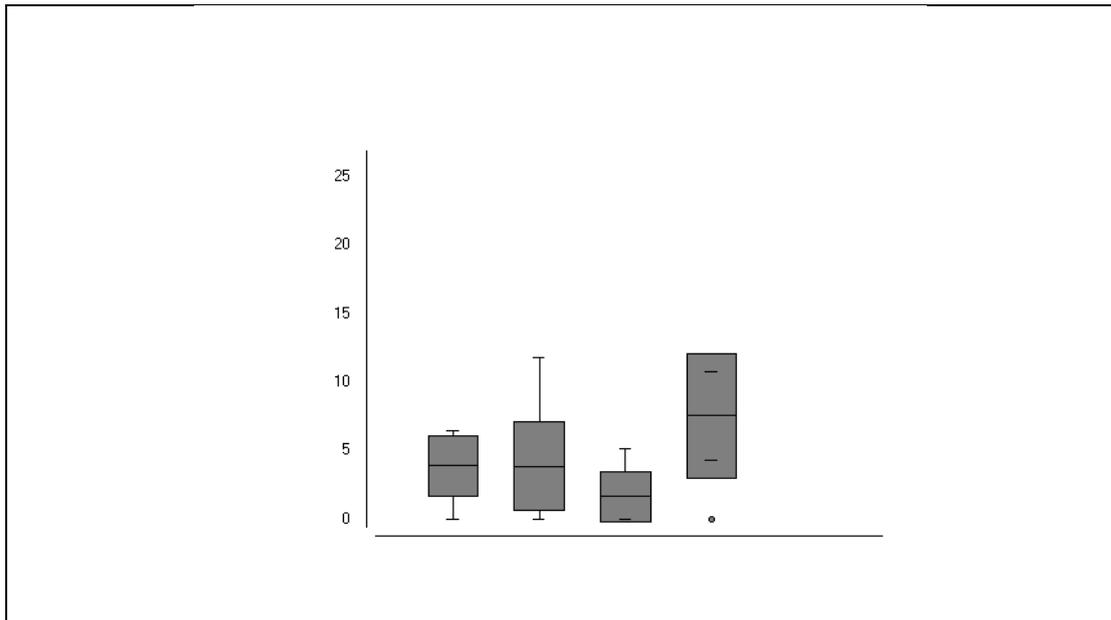




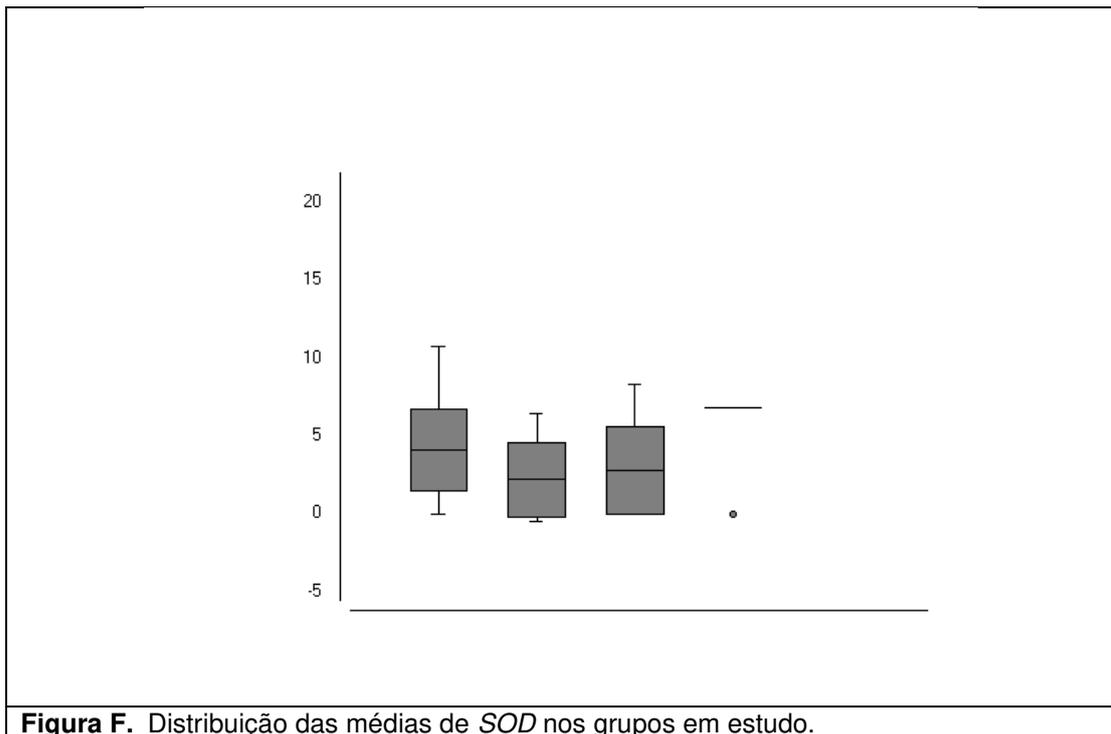
**Figura C.** Médias grupo 03 - NF2 ( $1.6440 \pm 1.8628$ ), SOD( $2.78 \pm 2.83$ ), GPX( $1.46 \pm 3.08$ ), CATALASE ( $4.6833 \pm 2.82$ )



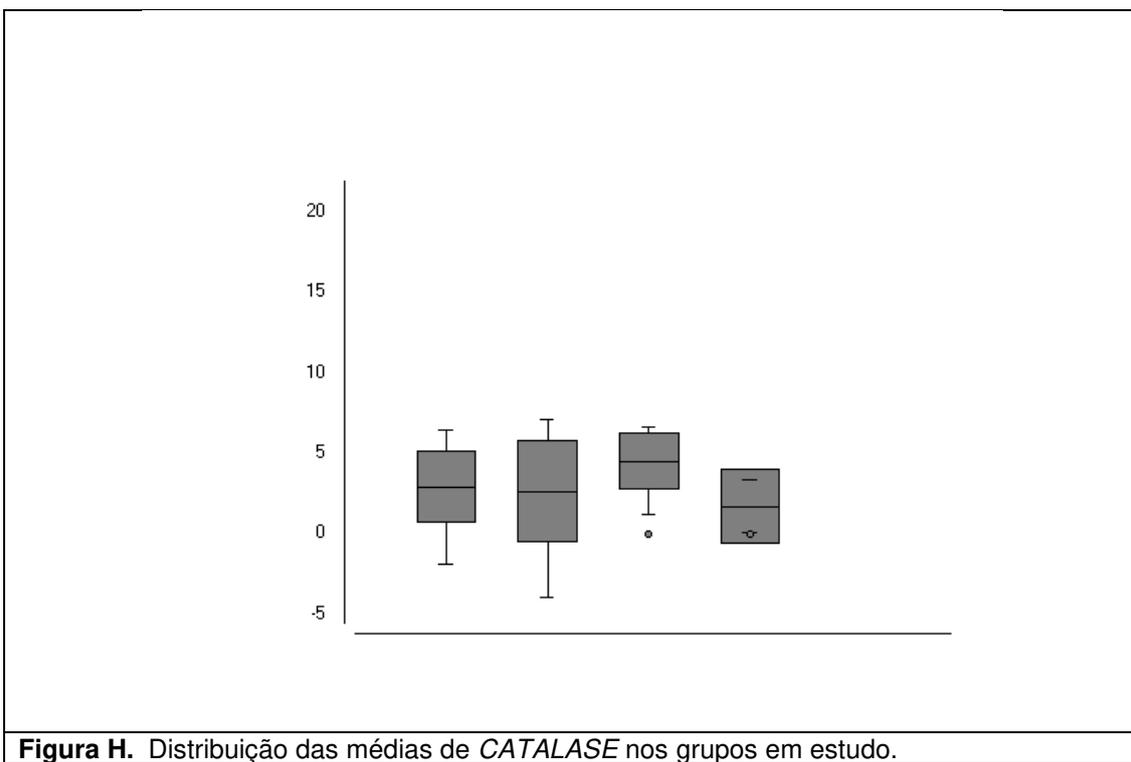
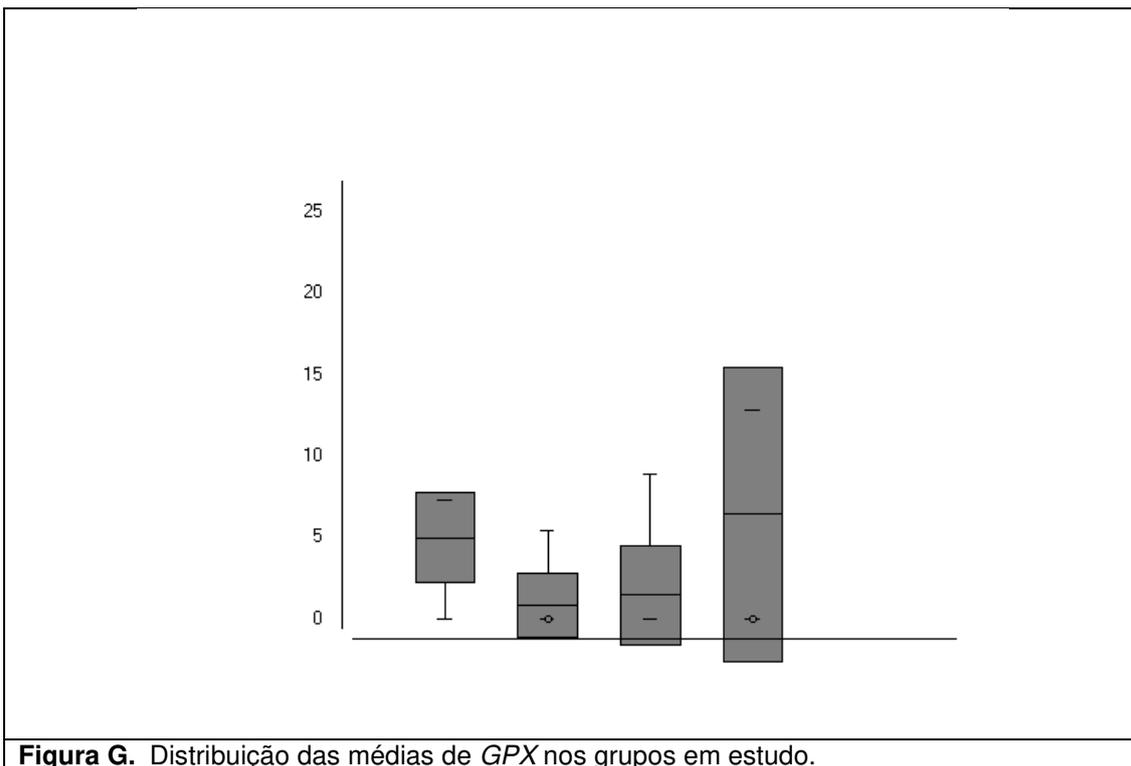
**Figura D.** Médias grupo 04 - NF2 ( $6.99 \pm 5.18$ ), SOD ( $9.92 \pm 7.07$ ), GPX ( $9.73 \pm 8.61$ ), Catalase ( $3.51 \pm 3.57$ ).



**Figura E.** Distribuição das médias de *Nrf2* nos grupos em estudo.



**Figura F.** Distribuição das médias de *SOD* nos grupos em estudo.



		NF2	SOD	GPX	CATALASE	p-valor
<b>Grupo 1</b>	Média(DP)	3.90 (± 2.20)	4.12 (±2.63)	5.00(±2.76)	2.91 (±2.21)	0.029*
<b>Grupo 2</b>	Média(DP)	3.88 (±3.25)	2.19 (± 2.40)	1.32(±2.93)	2.64 (±3.16)	0.061
<b>Grupo 3</b>	Média(DP)	1.64 (±1.86)	2.78 (±2.83)	1.46 (±3.08)	4.68 (±2.82)	0.007*
<b>Grupo 4</b>	Média(DP)	6.99 (±5.18)	9.92 (±7.07)	9.73 (±8.61)	3.51 (±3.57)	0.653
<b>p-valor</b>		0.007*	0.140*	0.009*	0.231	
<b>p- valor geral =0.0002*</b>						

**Tabela A.** Análise comparativa das enzimas antioxidantes entre os grupos. Teste Kruskal-wallis seguido por Dunn. \* Diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ). Grupo 1= Controle Negativo (óleo de girassol +salina); Grupo 2= Rotenona 2,5mg; Grupo 3 = Rotenona 2,5 +Miricetina 10mg; Grupo 4 = Rotenona 2,5+ *S. cumini*(EHA) mg.