



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E GESTÃO DE RECURSOS
NATURAIS**

Área de Concentração: Engenharia de Recursos Naturais

Linha de pesquisa: Engenharia Bioquímica

IARA BEZERRA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIAS
DOS EXTRATOS DE *Turnera subulata* (CHANANA) COMPARADO A
Harpagophytum procumbens (GARRA DO DIABO)**

**CAMPINA GRANDE- PB
2022**

IARA BEZERRA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIAS
DOS EXTRATOS DE *Turnera subulata* (CHANANA) COMPARADO A
Harpagophytum procumbens (GARRA DO DIABO)**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação e Engenharia e Gestão de Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande, pertencente à linha de pesquisa em Engenharia Bioquímica e área de concentração Engenharia de Recursos Naturais, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Engenharia e Gestão de Recursos Naturais.

Orientador: Matheus Augusto de Bitterncurt Pasquali

**CAMPINA GRANDE- PB
2022**

O48p

Oliveira, Iara Bezerra de.

Potencial das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos extratos de *Turneasubulata* (chanana) comprado a *Harpagophytumprocumbens* (garra do diabo) / Iara Bezerra de Oliveira. - Campina Grande, 2022.

104 f. il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia e Gestão de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, 2022.

"Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali."

Referências.

1. Plantas Medicinais. 2. Radicais Livres. 3. Cianobactérias. 4. Toxicidade. I. Pasquali, Matheus Augusto de Bittencourt. II. Título.

CDU 633.88(043)

CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECÁRIA ITAPUANA SOARES DIAS GONÇALVES CRB-15/93



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM RECURSOS NATURAIS
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina
Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

IARA BEZERRA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-
INFLAMATÓRIAS DO EXTRATO DE TURNERA SUBULATA
(CHANANA) COMPARADO COM A HARPAGOPHYTUM
PROCUMBENS (GARRA DO DIABO)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Gestão de Recursos Naturais como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Recursos Naturais.

Aprovada em:
26/05/2022

Prof.(a.) Dr.(a) **Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali/UFCG** (OrientadorPPGEGRN).

Prof.(a.) Dr.(a.) **Mario Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti-Mata/UFCG**(Examinador Interno).

Prof.(a.) Dr.(a.) **Viviane Farias Silva/UFCG** (Examinador Interno).

Prof.(a.) Dr.(a) **Gilmar Trindade Araújo/UFCG** (Examinador Externo).

Prof.(a.) Dr.(a) **Vania Lúcia dos Santos/UEPB** (Examinador Externo).



Documento assinado eletronicamente por **MATHEUS AUGUSTO DE BITTENCOURT PASQUALI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/05/2022, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **VIVIANE FARIAS SILVA, VICE-COORDENADOR**, em 10/06/2022, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanda Lucia dos Santos, Usuário Externo**, em 17/06/2022, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIO EDUARDO RANGELMOREIRA CAVALCANTI MATA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/06/2022, às 18:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **GILMAR TRINDADE DE ARAUJO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 28/06/2022, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **2420152** e o código CRC **16CD4D87**.

Dedico

Ao meu filho, Gabriel (um anjo enviado dos céus para mim)
à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) por todo amor e
incentivo para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre guiar os meus passos nas escolhas realizadas e por toda a evolução conquistada nos caminhos trilhados. Agradeço a minha mãe Marlene e meu pai Sebastião (*in memoriam*) por sempre me incentivarem a trilhar o caminho dos estudos, apesar das dificuldades. Agradeço à Daniel pelo apoio e companheirismo de sempre. Agradeço à meu amado filho Gabriel Leandro, pelo amor que, sem dúvidas, é minha motivação diária.

Agradeço ao meu orientador Matheus Pasquali pelo suporte e ensinamentos durante essa jornada.

Agradeço à Handson, um amigo que o doutorado me trouxe, pessoa de coração grandioso que me apoiou, incentivou e dividiu os fardos durante esses quatro anos. Uma pessoa que quero levar para vida.

Agradeço as técnicas. Leila, pelo suporte nas atividades laboratoriais. Renata pelas conversas e amizade.

Agradeço as meninas da limpeza, Socorro e Betânia pelo carinho e cuidado.

Agradeço em especial ao professor Gilmar por ter aberto as portas do LABFREN para que eu pudesse realizar minhas análises. Agradeço em especial à seu aluno, Douglas pela disponibilidade de sempre.

Agradeço as meninas, Thais e Fabrícia, pela companhia e conversas no laboratório.

Agradeço à Manoel, Jacó e Anastásia pela disponibilidade nos momentos de necessidade.

Agradeço ao professor Mário Eduardo pelo a receptividade no programa como coordenador de curso e disponibilidade de sempre como professor. A professora Maria de Fátima Martins, atual coordenadora, pela atenção e disponibilidade.

Agradeço aos secretários do programa, em especial a Val, por estarem sempre prontamente a nos atender.

Agradeço à todos os professores que tive a satisfação de ser aluna durante as disciplinas.

Agradeço aos colegas de turma, especialmente a Gilbran, Suelma, Jessyka e Kamila.

E por fim, agradeço aos amigos e familiares que apesar de não fazerem parte da universidade foram meus maiores incentivadores e apoiadores.

Obrigada à todos!!

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi desenvolvida ao longo de 4 anos de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Gestão de Recursos Naturais (PPGEGRN), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), como parte das exigências para obtenção do título de doutora na área de concentração Engenharia de Recursos Naturais.

Sou natural de Campina Grande, conclui a graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) na UEPB (2008-2011), e posteriormente fiz o mestrado na mesma instituição em Ecologia e Conservação (2012-2014).

Na graduação trabalhei desde o segundo período de curso de graduação em laboratório de pesquisa em ecologia aquática continental, trabalhando com qualidade de água, e com ênfase no estudo das cianobactérias, com cultivo, onde defendi o TCC intitulado: “Relações dos fatores abióticos com a densidade e dominância de cianobactérias em reservatórios do semi-árido paraibano”.

Ao longo do mestrado aprofundei meus estudos no entendimento das relações ecológicas das cianobactérias e o bacterioplâncton, onde desenvolvi a Dissertação intitulada: “Controle da dinâmica *Bottom-up* e *Top-down* do bacterioplâncton em reservatórios de região semiárida”.

Ainda trabalhando com cianobactérias, no doutorado a tese foi desenvolvida levando em consideração a linha de pesquisa engenharia bioquímica, onde buscou-se tratar da toxicidade e estresse oxidativo celular ocasionado pelas cianotoxinas, bem como as potenciais propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias de extratos de plantas.

RESUMO

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e o sistema biológico na sua capacidade de desintoxicar prontamente os intermediários reativos do oxigênio/nitrogênio ou reparar o dano resultante, podendo causar efeitos tóxicos através da produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes da célula, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Cada célula é caracterizada por uma concentração particular de elétrons armazenados em muitos constituintes celulares e o estado redox de uma célula determina o funcionamento celular. Distúrbios no estado redox normais dos tecidos podem causar efeitos tóxicos através da produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes da célula, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Desse modo, o estresse oxidativo é uma consequência inevitável da vida em meio rico em oxigênio. Cianobactérias são organismos microscópicos amplamente distribuídos em todo planeta, bem como apresentando relevantes densidades em corpos aquáticos continentais destinados a atividades humanas. Tais microrganismos são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos ao homem e a demais animais. São as cianotoxinas. Em se tratando de cianotoxinas, podemos destacar as mais comuns com maior potencial tóxico, é o caso das microcistinas. Vários estudos relatam sua capacidade de causar estresse oxidativo celular em vertebrados aquáticos após exposições a florações de espécies de cianobactérias tóxicas, além de inflamação desencadeando vários tipos de patologias. De fato, estudos demonstram que as cianobactérias tóxicas elevam sistematicamente os níveis de lipoperoxidação, o que indica o importante papel do dano oxidativo e na toxicidade por cianobactérias. Os extratos vegetais como das plantas *Turnera subulata* e *Harpagophytum procumbens* são aplicados amplamente na medicina popular, o extrato das folhas de *Turnera subulata*, planta nativa do nordeste brasileiro, por exemplo, é aplicado como alternativa no tratamento de diversas doenças que possuem em comum o estresse oxidativo e ativação do sistema inflamatório. Entretanto, apesar do seu amplo uso, os efeitos desse composto ainda não estão bem descritos. No entanto, os efeitos de *Harpagophytum procumbens* nesses processos já estão mais claramente elucidados. O presente estudo teve como objetivo avaliar os teores de fenólicos, flavonoides e antocianinas a fim de verificar a capacidade antioxidante e a atividade anti-inflamatória (*in vitro*) das amostras de plantas de *T. subulata* comparando com o *H. procumbens*. Desse modo, buscamos avaliar a capacidade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos das folhas de *T. subulata* e raízes de *Harpagophytum procumbens*, em um modelo de inflamação (*in vitro*), através da desnaturação da albumina, a capacidade antioxidante total foi avaliada segundo o método de fosfomolibdato. Os extratos foram produzidos utilizando as técnicas de Soxhlet, Ultrassom e Evaporador rotativo com solvente aquoso. Os resultados obtidos revelaram que o teor de fenólicos totais dos extratos aquosos de *T. subulata* nas diferentes técnicas (soxhlet = $135,7 \pm 0,1$; ultrassom = $123,8 \pm 2,5$ e evaporador rotativo = $131,0 \pm 0,1$ mg/g) foram sugestivamente superiores aos extratos de *H. procumbens* com valor mais significativo no evaporador rotativo evaporador rotativo ($127,0 \pm 1,1$ mg/g), apenas. Os resultados também mostraram uma forte propriedade antioxidante foi observada para os extratos de *T. subulata* em evaporador rotativo ($92,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$). A capacidade antioxidante total obteve uma correlação positiva com o teor de antocianinas para *T. subulata* ($R^2=0,9541$, $p=0,0000$). O estudo de atividade anti-inflamatória

foi observado em extratos para ensaio de desnaturação de proteínas (*in vitro*) os extratos exibiram um melhor potencial antidesnaturante para *T. subulata* (Soxhlet=66,2±0,1; Ultrassom= 65,9±0,9 rotaevaporador=53,6±1,5 µg/ml.). Os resultados justificaram que os extratos aquosos de *T. subulata* apresentam um importante potencial antioxidante e anti-inflamatório. Desse modo, extratos de *T. subulata* poderiam ser candidatos promissores para o desenvolvimento produtos potentes e de baixo custo.

PALAVRAS-CHAVES: Radicais livres, Cianobactérias, Toxicidade, Plantas medicinais.

ABSTRACT

Oxidative stress represents an imbalance between the production of reactive species and the biological system in its ability to readily detoxify reactive oxygen/nitrogen intermediates or repair the resulting damage. the components of the cell, including proteins, lipids and DNA. Each cell is characterized by a particular concentration of electrons stored in many cellular constituents, and the redox state of a cell determines cellular functioning. Disturbances in the normal redox state of tissues can cause toxic effects through the production of peroxides and free radicals that damage all components of the cell, including proteins, lipids and DNA. Thus, oxidative stress is an inevitable consequence of life in an oxygen-rich environment. Cyanobacteria are microscopic organisms widely distributed throughout the planet, as well as presenting relevant densities in continental water bodies destined for human activities. Such microorganisms are capable of producing secondary metabolites toxic to humans and other animals. It's cyanotoxins. When it comes to cyanotoxins, we can highlight the most common ones with the greatest toxic potential, which is the case of microcystins. Several studies report its ability to cause cellular oxidative stress in aquatic vertebrates after exposure to blooms of toxic cyanobacterial species, in addition to inflammation triggering various types of pathologies. In fact, studies demonstrate that toxic cyanobacteria systematically increase lipid peroxidation levels, which indicates the important role of oxidative damage and cyanobacterial toxicity. Plant extracts such as the plants *Turnera subulata* and *Harpagophytum procumbens* are widely applied in folk medicine, the extract from the leaves of *Turnera subulata*, a plant native to northeastern Brazil, for example, is applied as an alternative in the treatment of several diseases that have stress in common. oxidative stress and activation of the inflammatory system. However, despite its wide use, the effects of this compound are still not well described. However, the effects of *Harpagophytum procumbens* on these processes are now more clearly elucidated. The present study aimed to evaluate the levels of phenolics, flavonoids and anthocyanins to verify the antioxidant capacity and anti-inflammatory activity (*in vitro*) of *Turnera subulata* plant samples compared to *Harpagophytum procumbens*. Thus, we sought to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory capacity of extracts from the leaves of *Turnera subulata* and roots of *Harpagophytum procumbens*, in an inflammation model (*in vitro*), through albumin denaturation, the total antioxidant capacity was evaluated according to the phosphomolybdate method. The extracts were produced using Soxhlet, ultrasound and rotary evaporator with aqueous solvent techniques. The results obtained revealed that the total phenolic content of the aqueous extracts of *Turnera subulata* in the different techniques (soxhlet = 135.7 ±0.1; ultrasound = 123.8 ±2.5 and rotary evaporator = 131.0 ±0, 1 mg/g) were

suggestively superior to the extracts of *Harpagophytum procumbens* with a more significant value in the rotary evaporator rotary evaporator (127.0 ± 1.1 mg/g), only. The results also showed that a strong antioxidant property was observed for extracts of *Turnera subulata* in rotary evaporator (92.9 ± 0.1 μ g/ml). Total antioxidant capacity was positively correlated with anthocyanin content for *Turnera subulata* ($R^2=0.9541$, $p=0.0000$). The study of anti-inflammatory activity was observed in extracts for protein denaturation assay (in vitro) the extracts showed a better antidenaturing potential for *Turnera subulata* (Soxhlet= 66.2 ± 0.1 ; Ultrasound= 65.9 ± 0.9 rotaevaporator= 53.6 ± 1.5 μ g/ml.). The results justified that the aqueous extracts of *Turnera subulata* have an important antioxidant and anti-inflammatory potential. Thus, extracts of *Turnera subulata* could be promising candidates for the development of potent and low-cost products.

KEYWORDS: Free radicals, Cyanobacteria, Toxicity, Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Etapas da lipoperoxidação.....	27
Figura 2. Formação das espécies ativas de oxigênio e nitrogênio e inflamação.....	31
Figura 3. Microcistinas (MCs) no ambiente aquático.....	32
Figura 4. A estrutura da microcistina-LR.....	36

TABELAS

Tabela 1: Relação das cianotoxinas, organismos produtores e sintomatologias.....	35
Tabela 2. Principais compostos dos extratos do gênero <i>Turnera</i> descritos na literatura.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - Catalase

ERO - Espécies Reativas do Oxigênio

GSH - Glutathiona Redutase

GPx- Glutathiona Peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

LPS - Lipopolissacarídeo

• **NO** - Óxido Nítrico

O₂^{•-} - Superóxido

• **OH**- Radical hidroxila

ONOO – Peroxinitrito

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

MC – Microcistina

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

IFN γ – Interferon Gama

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

IL – Interleucina

ATP – Trifosfato de Adenosina

GSSG – Glutathiona oxidada

SOD – Superoxido dismutase

TBARS – Ácido Tiobarbitúrico

ONOO – Peroxinitrito

iNOS – Óxido Nitrico Sintase Induzível

LO[•] - Alcoxila

LO₂[•] - Peroxil

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Contextualização do problema.....	14
1.2 Justificativa.....	18
1.3 Objetivos.....	23
1.4 Estruturação da tese.....	24
2. REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO	25
<i>Radicais Livres</i>	25
<i>Sistema de Defesa Oxidante</i>	27
<i>Inflamação</i>	29
2.2 CIANOBACTÉRIAS	31
<i>Cianotoxinas</i>	33
<i>Microcistinas</i>	35
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E AS MICROCISTINAS	36
2.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DOS EXTRATOS VEGETAIS	40
<i>Turnera subulata</i>	42
<i>Harpagophytum procumbens</i>	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
3. CAPÍTULO I: Cellular oxidative stress stimulated by microcystin: review	52
Abstract.....	52
Resumo.....	52
Resumen.....	53
1. Introduction.....	53
2. Methodology.....	54
3. Cyanobacteria	55
Cyanotoxins.....	55
Hepatotoxins.....	55
Neurotoxins.....	58

4. Cyanotoxins And Health.....	59
5. Microcystin And Oxidative Stress.....	62
6. Conclusion.....	66
References.....	66

4. CAPÍTULO II: Avaliação da capacidade antioxidante total e da atividade anti-inflamatória de *Turnera subulata* (chanana) e *Harpagophytum procumbens* (garra do diabo) no combate ao estresse oxidativo75

Resumo.....	75
Abstract.....	75
1. Introdução.....	76
2. Metodologia.....	80
2.1 Amostragem	80
2.2 Extração de Bioativos.....	81
2.2.1 Soxhlet.....	82
2.2.2 Ultrassom.....	82
2.2.3 Evaporador rotativo.....	83
2.3 Determinação de Fenólicos Totais	83
2.4 Determinação de Flavonoides e Antocianinas.....	83
2.5 Capacidade Antioxidante Total.....	84
2.6 Atividade Anti-inflamatória in vitro.....	84
2.7 Estatística.....	85
3. Resultados e Discussão.....	85
3.1 Teor de Compostos Fenólicos.....	86
3.2 Teor de Flavonoides.....	87
3.3 Teor de Antocianinas.....	89
3.4 Capacidade Antioxidante Total.....	90
3.5 Atividade Anti-inflamatória (<i>in vitro</i>).....	92
4. Conclusão.....	95
Referências.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização do problema

O conceito de estresse oxidativo foi definido como a falta de equilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio / nitrogênio (EROs / ERNs) e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelo efeito antioxidante em sistemas de proteção. Estresse oxidativo emerge de uma geração aprimorada de EROs/ERNs ou a partir de um decaimento da capacidade de proteção antioxidante, sendo caracterizada pela capacidade reduzida dos sistemas endógenos em lutar contra o ataque oxidativo direcionado às biomoléculas alvo.

O dano induzido por radicais livres no estresse oxidativo tem sido confirmado como um contribuinte para a patogênese e patofisiologia de muitos problemas crônicos de saúde, como doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica) enfisema, doenças cardiovasculares e inflamatórias, cataratas e câncer. O papel do estresse oxidativo já foi correlacionado com mais de 100 doenças, seja como fonte ou resultado (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Foi primeiramente caracterizado por Sies (1993) como “um distúrbio pró-oxidante para o equilíbrio antioxidante em favor das espécies oxidantes, levando a potenciais danos ” (p. 215).

Espécies radicais contendo nitrogênio também foram distinguidas, chamadas de espécies reativas de nitrogênio, ERNs, derivadas do radical óxido nítrico (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Além disso, ERO ou ERN são vistos não apenas como espécies capazes de gerar danos às biomoléculas. Afirmar-se que os sistemas enzimáticos sintetizam espécies reativas não apenas para defesa química ou desintoxicação, mas também para sinalização celular e reações biossintéticas (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006). A geração de espécies reativas de oxigênio acima da capacidade antioxidante de qualquer sistema celular poderá levar ao estresse oxidativo em diversos tipos celulares e em diversos ambientes.

Cianobactérias e cianotoxinas ocorrem em muitos ambientes aquáticos e terrestres, com distribuição mundial. As cianotoxinas são produtos secundários derivados do metabolismo de cianobactérias. Existem diferentes estudos descrevendo intoxicações agudas e subagudas de animais e humanos devido a essas toxinas, como elas ocorrem principalmente em água doce usada para atividades recreativas ou água potável. No entanto, a ingestão de toxinas através da dieta também é preocupante, uma vez que as toxinas podem se acumular ao longo da cadeia alimentar afetando os seres humanos (DE FIGUEREDO et al.,2004).

Os riscos dessas intoxicações dependem principalmente da estrutura e do modo de ação das cianotoxinas envolvidas. A maioria dos relatos de toxicidade na literatura é causada principalmente pelas microcistinas (MCs) (LEAL E SOARES, 2004).

Microcistinas são um grupo amplo de toxinas produzidos por várias espécies de cianobactérias de diferentes gêneros, como *Microcystis*, *Anabena*, *Plankthotrix*, *Nostoc*, etc. Elas consistem em heptapeptídeos cíclicos contendo L-e D-aminoácidos e um D-aminoácido hidrofóbico conhecido como ADDA. Entre essas toxinas, as mais amplamente estudadas são MC-LR, MC-RR e MC-YR, sendo a primeira a mais tóxica (LEAL E SOARES, 2004).

Em geral, essas cianotoxinas são classificadas como hepatotóxicas. Uma vez que entram no organismo, se acumulam no fígado, de modo que a toxicidade está associada à inibição específica da proteína fosfatase 1 e 2A (PP1 e PP2A), levando ao aumento da fosforilação das principais proteínas envolvidas na transdução de sinal. A desorganização do citoesqueleto da membrana celular é induzida por fosforilação / desfosforilação de proteínas, levando a interrupção da integridade celular. Além disso, as MCs produzem estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo*. Verificou-se também que as MCs podem atuar como promotores tumorais, sendo classificados dentro do grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2019).

O estresse oxidativo devido ao excesso de EROs causadas por MC-LR é considerado um mecanismo importante de hepatotoxicidade MC-LR (DING et al., 2000; LI et al., 2003). Estudos laboratoriais mostraram que concentrações baixas e crônicas de exposição à MC-LR promovem aumento da sobrevivência celular e estimulação da proliferação celular (ZHANG et al., 2011). Além disso, estudos epidemiológicos sugeriram que as fontes de água potável contaminados por MCs são um dos fatores de risco para a alta incidência de câncer hepático primário (UENO et al., 1996).

MC-LR poderia ligar-se ao regulador citosólico, proteína Keap1, para liberar Nrf2 e consequentemente, regular os genes a jusante HO-1 e NQO1, que podem desempenhar importante papel vantajoso no crescimento de células de câncer de fígado. Além disso, o MC-LR poderia promover a proliferação de células HL7702 pela ativação da via Akt / S6K1, sugerindo que o mecanismo toxicológico da MC-LR estava associado às múltiplas vias de sinalização (MA et al. 2018).

Quando células endoteliais estão constantemente expostas a MC-LR, o risco de doença vascular pode aumentar. Em um estudo Shi et al. (2015), descobriram que altas concentrações de MC-LR induziam apoptose de células endoteliais da veia umbilical humana

via estresse oxidativo. No mesmo estudo, eles sugeriram que a MC-LR era prejudicial no processo inflamatório vascular e seu mecanismo preciso requeria mais estudos (SHI et al., 2015).

Mais de 90 variantes de MCs foram detectadas, entre as quais a microcistina-LR (MC-LR) é a mais onipresente e tóxica (GUPTA et al., 2003). MC-LR tornou-se uma ameaça global à saúde para seres humanos e animais aquáticos e terrestres (RASTOGI et al., 2014). Pois pode causar intoxicação aguda em humanos (JOCHIMSEN et al., 1998; AZEVEDO et al., 2002) e também tem efeitos carcinogênicos na saúde humana após exposição em dose baixa (UENO et al., 1996).

Assim, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a MC-LR como possível carcinógeno humano (Grupo 2B), e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou diretrizes provisórias sobre água potável impondo um limite de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ MC-LR para consumo humano diário (WHO, 1998).

Diante do exposto, é sabido que os produtos naturais de plantas medicinais são significativas fontes de novos compostos dinâmicos eficazes para novas preparações medicinais (EDZIRI et al., 2018). Vários estudos especificaram que os efeitos protetores de espécies medicinais contra patógenos e/ou substâncias específicas são devidos a seus constituintes químicos, como os polifenóis, flavonoides e compostos antioxidantes (MOHAJER et al., 2016).

O valor terapêutico de uma planta medicinal depende da associação entre as estruturas químicas e as atividades farmacológicas dos fitocompostos ativos (ALEXA et al., 2018). A família *Turneraceae* é uma das mais apreciadas, que detém 135 espécies atualmente reconhecidas. Quase todas as espécies são amplamente utilizadas para tratar várias doenças na medicina popular tradicional. Nas práticas tradicionais, essas plantas são usadas para tratar problemas gastrointestinais, tumores, bronquite, tosse, alívio da dor, doenças pulmonares e respiratórias (SZEWCZYK; ZIDORN, 2014).

O gênero mais significativo das *Turneraceae* é o *Turnera*, que compreende mais de 100 espécies classificadas em 9 séries. A *T. subulata* é um subarbusto, nativo da América do Sul e Central. É uma erva perene que cresce frequentemente com raízes centrais fortes e densas e caule cilíndrico lenhoso com a base de 30–80 cm de altura. *T. subulata* é usado na região nordeste do Brasil para o tratamento de amenorréia e dismenorréia (AGRA et al., 2007). Também é usado para tratar tumores, influenza, cortes, doenças gastrintestinais e respiratórias. Embora a *T. subulata* seja amplamente utilizado na medicina tradicional há séculos, poucas informações estão disponíveis sobre suas propriedades farmacológicas e atividade biológica.

Mas de modo geral, a *T. subulata* possui ricas propriedades antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2009)

Óleos essenciais presentes em *T. subulata* apresentam atividade antibacteriana muito efetiva contra as várias cepas de *Staphylococcus aureus*. Apenas alguns esteróides, flavonóides e compostos de feofitina foram isolados de *T. subulata* (BRITO FILHO et al., 2014). Portanto, vale a pena investigar e caracterizar os fitofosfatos bioativos presentes em vários extratos de *T. subulata* (SARAVANAN et al., 2018).

Harpagophytum procumbens é uma planta herbácea perene originária do deserto de Kalahri, das estepes da Namíbia, Botswana e África do Sul, não sendo, portanto, uma planta nativa do Brasil. Além disso, não são encontrados relatos de ocorrência da espécie no Brasil (GRANT, et al., 2007, ANAUATE, 2007).

No Brasil, a espécie *H. procumbens* é conhecida popularmente como “garra-do-diabo” e/ou “unha-do-diabo”, nomes dados em função do aspecto ramoso e lenhoso do fruto, provido de barbas semelhantes a garras (GRANT, et al., 20007; MNCWANGI et al., 2012). A raiz da espécie é comumente comercializada sob o nome farmacêutico de Harpagophyti radix (STEWART e COLE; 2005). Vários estudos farmacológicos, tantos clínicos quanto não-clínicos, são encontrados na literatura para a espécie *H. procumbens*. Já é bastante difundida a sua eficácia em condições inflamatórias, de modo que a grande maioria dos estudos está relacionada à atividade anti-inflamatória e/ou analgésica.

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo compreender o estresse oxidativo estimulado pela cianotoxina microcistina LR, e por fim investigar e caracterizar as propriedade dos fitofosfatos bioativos presentes em extratos brutos de *T. Subulata e Harpagophytum procumbens* capazes de proporcionar uma respostas anti-inflamatória e antioxidante.

1.2 Justificativa

A água é considerada uma substância indispensável à vida, mas devido ao crescimento das atividades antrópicas tem-se produzido diversos tipos de efluentes que sem o tratamento

adequado, alcançam os corpos aquáticos. Desse modo, os diversos dejetos nas águas propiciam uma variedade de contaminantes e nutrientes, contribuindo para a intensificação do processo de eutrofização, que por sua vez favorece o desenvolvimento de microorganismos fotossintetizantes capazes de aumentar consideravelmente sua população (ocasionando os “*blooms*” ou florações), a exemplo das cianobactérias (DE FIGUEIREDO et al., 2004).

Florações de cianobactérias se tornaram comuns atualmente e são reportadas no mundo todo. Tais florações conferem cor, odor e sabor diferenciado à água, acarretando uma série de problemas para o abastecimento público. Entretanto, um aspecto bastante relevante das florações é que elas representam potencial risco para os animais, inclusive os seres humanos, pelo fato desses organismos produzirem compostos tóxicos, conhecidas como cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1998). Cianotoxinas são alguns dos produtos do metabolismo secundário das cianobactérias, e podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em: hepatotóxicas (que compreendem as microcistinas e nodularinas), neurotóxicas, citotóxicas e dermatotóxicas. (VAN APELDOORN et al., 2007).

A exposição humana e possível intoxicação por cianotoxinas são maiores quanto maior for a proliferação e lise dessas células. E pode ocorrer por diferentes vias: ao beber a água contaminada; durante o uso recreacional, principalmente na presença de floração, através do contato da pele, e também ao beber a água não intencionalmente; pela inalação de partículas em aerossol, potencialmente possível durante o banho de duchas, ao praticar esportes aquáticos, como esqui ou semelhante; pelo consumo de alimentos expostos à uma floração de cianobactérias, sejam peixes, frutos do mar ou semelhante e; por hemodiálise, se a água não for propriamente tratada (CHORUS; BARTRAM, 1998).

As toxinas, produzidas pelas cianobactérias, podem provocar alterações no sabor e odor da água e causar toxicidade na biota aquática, podendo levar animais à morte por insuficiência hepática e o desenvolvimento de tumores cancerígenos, podem, ainda, se acumular nos tecidos dos peixes destinados ao consumo humano. Além disso, os efeitos, em longo prazo, de cianotoxinas em seres humanos ainda não foram confirmados (CARMICHAEL, 2004).

Nas últimas décadas essas moléculas têm sido alvo de muitos estudos, pelo fato das cianotoxinas serem hidrossolúveis e passarem pelo sistema de tratamento convencional de água (CARVALHO et al., 2013). Portanto, a principal preocupação referente às cianotoxinas está em relação a presença dessas toxinas em reservatórios destinados ao abastecimento público. Segundo a legislação, a água utilizada no abastecimento público deve estar isenta de algas e cianobactérias, e para tal deve-se proceder ao tratamento. Nas Estações de Tratamento de Água

(ETA's), os tratamentos habituais (floculação, decantação, filtração e coloração) não são eficazes na remoção de toxinas, nem muitas vezes, das algas e cianobactérias (BRANDÃO et al., 2006).

Na literatura é possível encontrar casos de intoxicação por cianotoxinas que ocorreram pelo contato da toxina por via oral, através do consumo de alimentos contaminados, água oriunda de tratamento ineficiente na remoção da toxina ou consumo de peixes com capacidade de bioacumulação e transferência das toxinas via cadeia alimentar (IBELINGS; CHORUS 2007; ZHANG et al., 2009). Há também casos relacionados às exposições de origem recreativa, quando as pessoas entram em contato direto com as cianotoxinas ao se banharem em águas com altas concentrações de cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1998).

O primeiro relato de intoxicação de animais por cianobactérias data de 1878, no sul da Austrália no lago Alexandrina. Onde se observou a formação incomum de uma espuma em todo o reservatório, o que causou a morte de ovelhas, cavalos, porcos, patos e cães (FRANCIS, 1878).

No Brasil, o primeiro caso relatado à presença de cianobactérias na água utilizada para consumo humano, aconteceu em 1988 na represa de Itaparica, região de Paulo Afonso na Bahia. Cerca de 2000 casos de gastroenterite foram relatados e resultaram na morte de 88 pessoas num período de 42 dias (TEIXEIRA et al., 1993).

No Nordeste, em fevereiro de 1996, em Caruaru, no Estado de Pernambuco, 110 pacientes apresentaram sintomas de intoxicação por hepatotoxinas após tratamento de hemodiálise de rotina. Subsequentemente 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda e 76 deles morreram. Em outubro de 1997, 53 destas mortes foram atribuídas a "Síndrome de Caruaru", conforme ficou conhecida a tragédia. As vítimas foram intoxicadas pela água oriunda de um reservatório contaminada por microcistinas (JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998).

A média do valor da concentração de microcistinas encontrada no tecido hepático de 39 das vítimas que entraram em óbito entre fevereiro e dezembro era 233 ng/g. A concentração estimada de microcistina na água de origem foi de 19,5 µg/l, levando-se em consideração os 120 litros de água necessários para realizar um tratamento de hemodiálise padrão e também, assumindo-se que 100% da toxina passa intacta através do sistema de filtração (CARMICHAEL et al., 2001).

Os sinais e sintomas observados nos pacientes intoxicados foram distúrbios visuais (90% dos pacientes afetados), náusea e vômito (73%), dores de cabeça (65%), fraqueza

muscular (54%), dor epigástrica (46%) confusão (30%), sangramento nasal e do trato gastrointestinal (27%). Este foi o primeiro relato de um episódio de epidemia fatal de exposição à microcistina (FALCONER; HUMPAGE, 2005).

Frente a este cenário e à potencialidade tóxica das cianobactérias, o Ministério da Saúde brasileiro lançou a portaria número 2.914 em 12 de dezembro de 2011. Esta portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e padrão de potabilidade e em especial sobre os valores máximos de cel./ml de cianobactérias (BRASIL, 2011).

Sabendo que os fatores físicos e químicos são determinantes para o crescimento da população de cianobactérias potencialmente tóxicas em ecossistemas aquáticos continentais, que apresenta uma relação direta com os nutrientes, a exemplo do fósforo e nitrogênio, assim como a temperatura que também pode se apresentar como um fator limitante.

O semiárido brasileiro possui uma gama de características climáticas e geomorfológicas que tornam esta área distinta de outras regiões áridas e semiáridas nos trópicos. Estas características incluem a elevada variação espacial e temporal da precipitação, a baixa amplitude térmica com temperaturas superiores a 25 °C durante todo o ano, o alto potencial de evapotranspiração, levando a um déficit no balanço hídrico durante, pelo menos, nove meses do ano (BARBOSA et al., 2012).

Todos esses fatores são importantes para o aumento da concentração de nutrientes e o surgimento das cianobactérias em quantidades significativas, caracterizando o *Bloom* de cianobactérias. *Blooms* de cianobactérias causam alterações nos ecossistemas que levam a severas perdas, principalmente, na qualidade da água. O contato direto com a água, a ingestão de água e de animais aquáticos que tenham se alimentado de cianobactérias tóxicas podem afetar a saúde humana.

De maneira complementar as evidências na participação de EROs na toxicidade atribuída às microcistinas, diversos estudos vêm relatando alterações no sistema de defesa antioxidante de organismos aquáticos expostos às MCs. Em peixes, esse tipo de resposta tem sido observado em diversos órgãos como fígado, brânquias, coração, rins, entre outros (PRIETO et al., 2007).

Sabe-se que vários processos celulares passam a ocorrer dentro do macrófago, tais como produção de enzimas de degradação (para degradação do elemento fagocitado), aumento na produção de EROs e produção de óxido nítrico (NO). A associação desses processos induz um

efeito tóxico para o elemento invasivo, prejudicando assim o seu desenvolvimento e o levando à degradação (Filippin et al., 2007).

Nos macrófagos o aumento na produção de EROs é mediado principalmente pela enzima NADPH oxidase, sendo esse efeito resultado de um aumento no consumo de oxigênio que é característico desse tipo celular para a realização do processo da fagocitose. Após a ativação dos macrófagos, os elevados níveis de diferentes citocinas como interferon gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) aumentam a atividade da enzima NADPH oxidase e subsequentemente a produção de EROs, sendo o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o principal produto da NADPH oxidase. A produção de $O_2^{\cdot-}$ pode levar a produção espontânea ou enzimática de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção enzimática de H_2O_2 é mediada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), a qual é responsável pela transformação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . A presença de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ leva também à formação de outras EROs tais como o radical hidroxil ($OH\cdot$), hipoclorito (OCl^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). A produção de $ONOO^-$ é favorecida devido ao fato dos macrófagos ativados passarem a expressar a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual é responsável pela síntese de NO. Todos esses mecanismos de produção de EROs pelos macrófagos tem como objetivo levar a eliminação do elemento hospedeiro. (BARBOSA et al. 2010).

Referindo-se as atividades biológicas da microcistina LR, observou-se que esta toxina induz uma significativa liberação de prostaglandina F2a, prostaglandina E2 e tromboxano B2, por macrófagos alveolares (NASEEM et al., 1989). Além disso, a microcistina-LR induz a necrose tumoral dessas células para o meio. Há também evidências de que a administração de extrato celular tóxico bruto de *Microcistis aeruginosa* para camundongos pode produzir fator de necrose tumoral e produzir distúrbios fisiológicos graves (NAKANO et al. 1991). Também foi observado que o fator de necrose tumoral-a está envolvido na promoção tumoral induzida por microcistina-LR no fígado de rato (FUJIKI; SUGANUMA, 1994). Estes achados sugerem que algumas das atividades biológicas de microcistina-LR podem depender da estimulação em células imune, especialmente os macrófagos.

Sabendo que, as plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas em todo o mundo por milhares de anos. A crescente procura por medicamentos à base de plantas requer o desenvolvimento de metodologias de extração específicas e de controle de qualidade, a fim de garantir a eficácia e a segurança dos produtos derivados dessas plantas (GARZA-JUÁREZ et al., 2011). Os compostos vegetais adquiridos por meio da ingestão de chá, suco, frutas e derivados vegetais proporcionam uma diversidade de benefícios para a saúde das populações

(DAUCHET et al., 2006) e representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de muitos fármacos. Esses produtos apresentam uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (PINTO et al., 2002).

Estudos acerca da eficácia desses extratos ganharam grande destaque nas pesquisas, sendo abordados em diferentes aspectos. De fato, a composição biológica dessas bebidas e alimentos tem sido considerada um fator importante para reduzir o risco de doenças crônicas (COOKE et al., 2004).

Encontrados naturalmente em plantas, os compostos fenólicos, também conhecidos como antioxidantes de polifenóis, que incluem flavonoides, ácidos fenólicos e ligninas, possuem nas plantas dentre outras a função de proteção contra patógenos e predadores. De modo que, em outros organismos estes compostos fenólicos podem inibir a peroxidação lipídica, assim como eliminar radicais livres, quelar os íons ferro e cobre, protegendo o colesterol lipoproteico da oxidação e estimulando as enzimas envolvidas na desintoxicação de substâncias cancerígenas (SORIANO-MELGAR et al., 2012).

Conhecidos por atuarem de forma direta ou indireta no organismo, os compostos vegetais podem inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros); agindo sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como guanosina monofosfato cíclica (GMPc), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteínas quinases (PKs), etc.), na expressão de fatores de transcrição como proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B), e proto-oncogenes (cjun, c-fos e c-myc); inibindo ou ativando a expressão de células pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenases (COX), citocinas (interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (FIRMO et al., 2011).

Dentre as plantas produtoras de flavonoides destaca-se o gênero *Turnera* pertencente à família Turneraceae constituído de espécies que são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, em especial a espécie *Turnera subulata*, alvo desse estudo é facilmente encontrada no Nordeste do Brasil (BITU et al., 2015). Utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diferentes doenças, como diabetes, hipertensão, dor crônica e inflamação (BRITO et al., 2012). Já foi descrito na literatura que algumas moléculas biológicas, como os compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides e taninos, que podem ser responsáveis pelas

atividades biológicas relacionadas ao gênero, demonstrado efeitos antioxidantes (ESTRADA-REYES et al., 2013; GARZA-JUÁREZ et al., 2011).

Trabalhos demonstram a diminuição da secreção de citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6 observadas em tratamentos com espécies do gênero *Turnera*, utilizadas em diferentes modelos de inflamação “*in vitro*”, demonstrando efeitos benéficos dessas espécies (BRITO et al., 2012; ESTRADA-REYES et al., 2013).

Portanto, justifica-se a importância da presente pesquisa, em virtude da necessidade de estudos relacionados ao estresse oxidativo, ocasionado pela microcistina LR, bem como a aplicabilidade da espécie de *Turnera subulata* e *Harpagophytum procumbens* em processos anti-inflamatórios e antioxidantes, ocasionados por esses microorganismos.

1.3 Objetivos

O objetivo geral desse estudo foi compreender o estresse oxidativo ocasionado pela microcistina LR e verificar a capacidade antioxidante e a atividade anti-inflamatória dos extratos de *Turnera subulata* (Chanana) comparado a *Harpagophytum procumbens* (Garra do diabo).

Quanto aos objetivos específicos, tem-se:

- Coletar e resumir dados detalhados e disponíveis sobre a ocorrência de cianotoxinas em todo o mundo, as intoxicações humanas e animais a elas associadas, buscando fornecer um aprofundamento sobre seu potencial tóxico, além de proporcionar uma discussão sobre sua atividade relacionada com a geração de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente geração de dano oxidativo celular, a fim de compreender os riscos à saúde humana causados pelas microcistinas;
- Quantificar os principais compostos bioativos presentes em *Turnera subulata* e *Harpagophytum procumbens*;
- Estimar a capacidade antioxidante total dos extratos de *Turnera subulata* (chanana) e *Harpagophytum procumbens* (Garra do diabo);
- Determinar a atividade anti-inflamatória (*in vitro*) dos extratos de *Turnera subulata* (Chanana) e *Harpagophytum procumbens* (Garra do diabo).

1.4 Estruturação da tese

Essa tese foi estruturada a partir de 2 capítulos, a saber:

CAPÍTULO I:

CELLULAR OXIDATIVE STRESS STIMULATED BY MICROCYSTIN: REVIEW

Publicado na revista: Research, Society and Development (2021)

Qualis: A3

CAPÍTULO II:

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Turnera subulata* (CHANANA) COMPARADO AO *Harpagohytum procumbens* (GARRA DO DIABO) NO COMBATE AO ESTRESSE OXIDATIVO.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais Livres

Existe um grande interesse no estudo das potenciais substâncias causadores do estresse oxidativo, especialmente no entendimento da dinâmica de produção de radicais livres no organismo humano (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (BARBOSA et al, 2012).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culmina no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. (BARBOSA et al, 2012).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres. Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Na mitocôndria, o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas

de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (LEHNINGER, 2000).

No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres. Em face da redução univalente do O_2 são gerados os radicais superóxido ($O_2 \bullet$), hidroxila ($OH \bullet$) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (LEHNINGER, 2000).

Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de $OH \bullet$ tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxicos para as células (LEHNINGER, 2000).

Além da capacidade do $O_2 \bullet$ em participar de reações de geração de $OH \bullet$, pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico ($NO \bullet$), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito ($ONOO$), também potencialmente reativa (LEHNINGER, 2000).

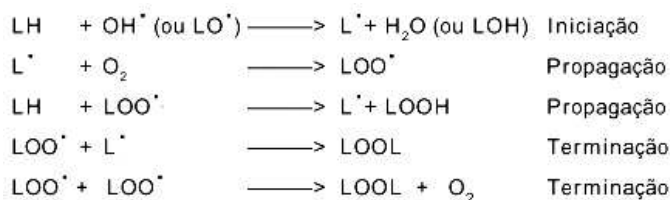
Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A primeira diz respeito à geração de radical $OH \bullet$, por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical $O_2 \bullet$, a fim de gerar, da mesma forma, o radical $OH \bullet$. A ligação do ferro e cobre às proteínas específicas: transferrina, ferritina e ceruloplasmina, por meio da quais estes são transportados, utilizados e estocados, previne e/ou minimiza as reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais. No citoplasma de células hepáticas, o ferro livre (não ligado à ferritina) é facilmente dissociado na forma de íon, o que o torna cataliticamente ativo e apto para participar de reações de óxido-redução e, conseqüentemente, de geração de radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que essas sejam potentes geradoras de radicais livres, alcoxila ($LO \bullet$) e peroxila ($LO_2 \bullet$), por meio

da lipoperoxidação. Tal processo constitui-se de reações em cadeia, representadas pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (FERREIRA E MATSUBARA, 1997) (Figura 1).

FIGURA 1: ETAPAS DA LIPOPEROXIDAÇÃO.



Fonte: Ferreira e Matsubara (1997, p.63).

O radical OH[•], por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador de tal processo. Entretanto, a participação do ferro também é considerada fator determinante, ressaltando-se a importância da relação equimolar entre Fe³⁺/Fe²⁺, para possibilitar a iniciação desse processo. Os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais LO[•] e LO₂[•], que, por serem potencialmente reativos, iniciam uma nova cadeia de reações, as quais podem ser rápidas ou lentas, de acordo com a valência do ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*). Essas se referem a proteínas transmembrana que têm, por excelência, a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o acceptor de elétrons é o oxigênio e, dessa forma, em decorrência desse processo, gera-se o radical O₂[•]. Tais enzimas existem em pelo menos seis isoformas, diferindo quanto ao local de expressão e co-fatores necessários para a sua ativação. (BARBOSA et al., 2010).

Sistema De Defesa Antioxidante

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). (BARBOSA et al. 2010).

Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, sejam capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-reativas, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (BARBOSA et al. 2010).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-reativas, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical $\text{OH}\cdot$, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

O referido radical ($\text{OH}\cdot$) vem sendo indicado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10^{-9} segundos). Essas características os capacitam como o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (BARBOSA et al., 2010).

Considerando a potencialidade do radical $\text{OH}\cdot$ e o fato da não existência de defesa enzimática especializada, é de extrema importância a manutenção do perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, com o propósito de promover a manutenção da integridade celular. Assim, a GPx merece atenção especial, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (BARBOSA et al., 2010).

A atividade das enzimas em questão muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem externa. Tais cofatores podem diferir de

acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como co-fator (SOD-Mn). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

O Estresse Oxidativo e a Inflamação

O termo "estresse oxidativo" é frequentemente usado para se referir ao aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, 1994). As EROs podem ser geradas de diversas maneiras, encontrando-se associadas em sua maior parte à função mitocondrial e a respiração celular (LIU E LENARDO, 2007). Geralmente, as EROs são formadas como subproduto da transferência de elétrons para o oxigênio molecular (O_2) pelos complexos I e III dentro da cadeia transportadora de elétrons, bem como por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e enzimas, que são fortemente associadas às mitocôndrias (D'AUTREAU, 2007; VERNON E TANG, 2013).

O papel que as EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) desempenham em mecanismos que levam a patologias são amplamente estudados. Sabe-se que as EROs/ERNs estão envolvidas em vias de sinalização e processos metabólicos normais. As EROs, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH\cdot$) e o óxido nítrico (NO) podem desencadear a proliferação, diferenciação, apoptose e morte celular. Em baixos níveis, as EROs participam em vias de sinalização celular essenciais, atuando como segundos mensageiros em vários processos celulares por oxidação de resíduos de cisteína ou moléculas alvo, incluindo cinases e fosfatases, fatores de transcrição que são sensíveis às modificações pelas EROs, reguladores do ciclo celular e lipídios de membrana (AZAD et al., 2009).

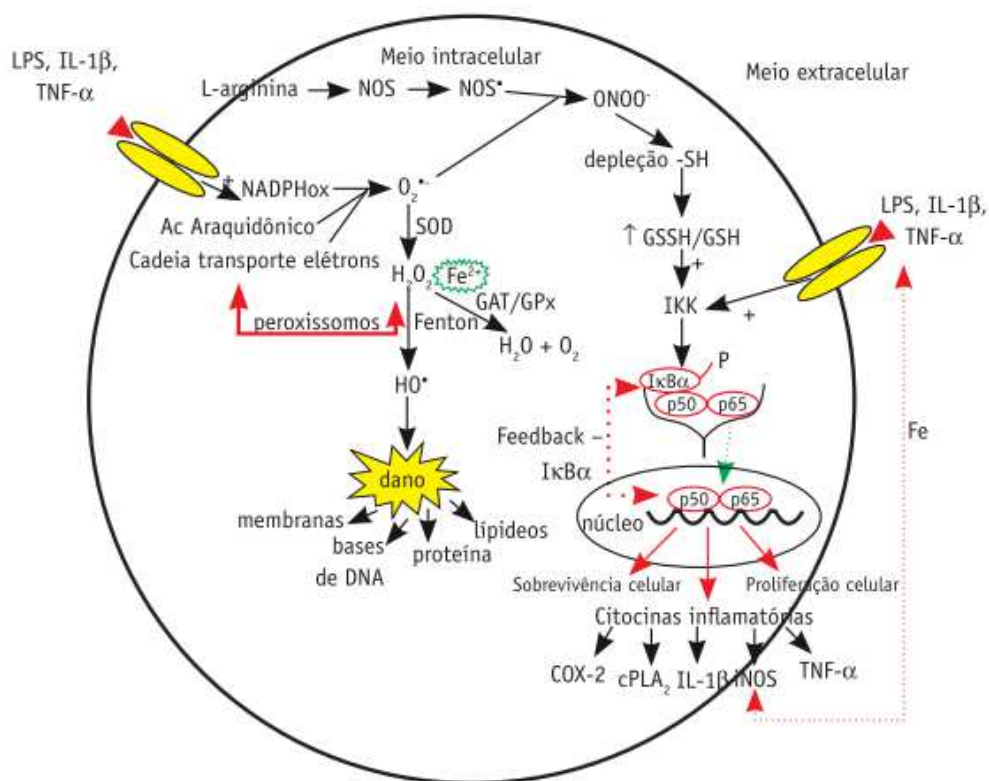
Contudo, em altos níveis, as EROs podem causar alterações oxidativas irreversíveis, danos aos lipídios, proteínas e DNA, interferindo nas suas funções. Por isso, complexos mecanismos antioxidantes evoluíram para proteger as células das lesões oxidativas, incluindo mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Nos mecanismos enzimáticos temos, por exemplo, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e peroxirredoxina III (PrxIII). Já o sistema não enzimático inclui vitaminas C, E e B2, coenzima Q10, glutatona e β -caroteno. Estes sistemas de eliminação de EROs são necessários para manter o balanço redox celular (AZAD et al., 2009).

No entanto, um desequilíbrio ou desregulação no organismo entre a produção de EROs/ERNs e as defesas antioxidantes pode levar a uma condição conhecida como estresse oxidativo (HALLIWELL, 1994). Na maioria dos casos, as EROs são consideradas como sendo danosas para as células, provocando uma resposta de estresse que pode levar a consequências como dano a proteínas celulares ou a organelas e possível morte celular. Algumas doenças como câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes e doenças cardiovasculares são condições patológicas que apresentam estresse oxidativo em sua etiologia (MITTAL et al., 2014). Adicionalmente, as EROs/ERNs cumprem um papel central na ativação e progressão das vias inflamatórias, desencadeando uma variedade de respostas a estímulos, tais como atividades pró-inflamatórias (com a modulação de fatores como TNF- α), inibição da função mitocondrial por interferências na cadeia transportadora de elétrons e respostas celulares à má nutrição (LIU E LENARDO, 2007).

As espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical hidroxil (HO^{\bullet}) e outros, podem ter origem endógena e exógena. As principais fontes endógenas de geração de EROs são peroxissomos, NADPH oxidase, xantina oxidase, mitocôndria e citocromo P-450. Como vias exógenas, podem ser citadas radiação- γ , cigarro e solventes orgânicos. A excessiva formação endógena de radicais livres pode ser causada por: (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas; e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes. Entretanto, torna-se difícil determinar se na doença humana os radicais livres são a causa ou potencializam o dano patológico (FILIPPIN et al., 2008).

Por outro lado, as espécies reativas de oxigênio são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune. Sabe-se que células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições oxidativas. Essa ativação é mediada pelo sistema da NADPH oxidase que resulta um marcado incremento no consumo de oxigênio e consequente produção de ânion superóxido. A ativação da NADPH oxidase pode ser induzida por lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e citocinas, como interferon-gama (IFN- γ), interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Figura 2).

FIGURA 2 – FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO, ALVOS DESSAS ESPÉCIES REATIVAS, RELAÇÃO DAS EROs COM A ATIVAÇÃO DO NF-KB E TRANSCRIÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIA.



Fonte: Filippin et al. (2008, p. 18)

2.2 CIANOBACTÉRIAS

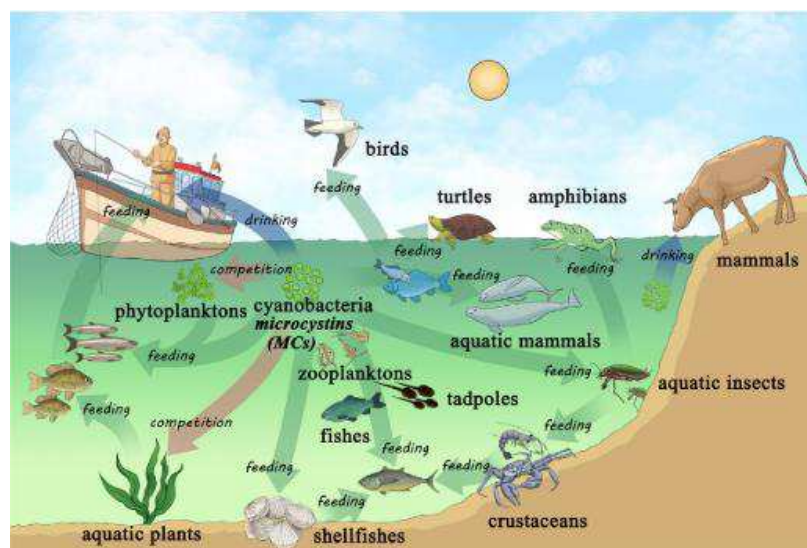
A água é considerada uma substância indispensável à vida, mas devido ao crescimento das atividades antrópicas tem-se produzido diversos tipos de efluentes que sem o tratamento adequado, alcançam os corpos aquáticos e podem provocar diversas alterações que comprometem a saúde de diversos animais (DE FIGUEIREDO et al., 2004) (Figura 3). Desse modo, os diversos dejetos nas águas propicia uma variedade de contaminantes e nutrientes, contribuindo para a intensificação dos processos de eutrofização. A disponibilidade de nutrientes, a exemplo do fósforo e nitrogênio propicia o crescimento da população de produtores primários (fotossintetizantes). Estes, que possuem mecanismos de utilização dessas substâncias e desse modo, aumentam consideravelmente, iniciando-se, portanto um desequilíbrio no ecossistema, com o aumento exacerbado de organismos fitoplanctônicos (FERRÃO-FILHO et al., 2009).

Dentre as espécies fitoplanctônicas que formam a estrutura das comunidades nos sistemas aquáticos, as cianobactérias ganham destaque quanto a sua adaptação às condições de enriquecimento de nutrientes na água. Esses que são microorganismos procariotos, fotossintetizantes presentes na maioria dos ecossistemas do nosso planeta (AZEVEDO et al., 2002).

Cianobactérias são bactérias gram-negativas com uma longa história evolutiva no planeta, são organismos procariontes, fotossintéticos, unicelulares ou coloniais que povoam diversos habitats (DIAS et al., 2009). Possuem distribuição cosmopolita, sendo encontrados em ambientes de água doce, mares, desertos, geleiras, entre outros (RESENDE, 2011). Em condições ambientais favoráveis pode ocorrer a proliferação exorbitante das cianobactérias, evento conhecido como floração, e que fez com que elas se destacassem no cenário de saúde pública mundial. As florescências cianobacterianas resultam da versatilidade metabólica e fisiológica desses organismos (FONSECA, 2014).

Dentre os aproximadamente 150 gêneros escritos, 40 estão relacionados com a produção de algum tipo de metabolito tóxico. (BRASIL, 2011). Uma das grandes preocupações, no que concerne a esses organismos, está justamente na sua capacidade de biossintetizar e liberar alguns metabólitos secundários, conhecidos como cianotoxinas, essas que são substâncias capazes de causar danos à saúde (RESENDE, 2011).

FIGURA 3: MICROCISTINAS (MCS) NO AMBIENTE AQUÁTICO.



Fonte: Chen et al. (2016, p. 382).

Cianotoxinas

Vários gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações produzem toxinas. As toxinas de cianobactérias, que são conhecidas como cianotoxinas, constituem uma grande fonte de produtos naturais tóxicos produzidos por esses microorganismos (CARMICHAEL,1994).

As cianotoxinas são armazenadas nas células das bactérias e são liberadas para a água quando as células se rompem ou morrem. Muitas vezes, a liberação das toxinas ocorre no final do ciclo de vida natural, assim, as toxinas podem ainda estar presentes na água e representar um risco para a saúde do homem e animais (ROSLYN WOOD, 2016).

A exposição humana e possível intoxicação por cianotoxinas são maiores quanto maior for a proliferação e lise das células de cianobactérias. A intoxicação pode ocorrer por diferentes vias: ao beber a água contaminada; durante o uso recreacional da água, principalmente na presença de floração, através do contato da pele e também ao beber a água não intencionalmente; pela inalação de partículas em aerossol, potencialmente possível durante duchas, ao praticar esportes aquáticos, como esqui ou semelhante; pelo consumo de alimentos expostos à uma floração de cianobactérias, sejam peixes, frutos do mar ou semelhante e; por hemodiálise, se a água não for propriamente tratada (CHORUS E BARTRAM, 1998).

Algumas dessas toxinas, que são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição, têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos (AZEVEDO, 1998).

As toxinas podem ter um efeito tóxico para o homem e outros animais, mesmo em pequenas concentrações. Entre os tipos de toxinas produzidas elas podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em: hepatotóxicas, que são as microcistina e nodularinas; neurotóxicas, representadas pela anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s) e um grande grupo chamado saxitoxinas; citotóxica, a cilindrospermopsina; e as dermatotoxinas que são as toxinas lipopolissacarídicas, comuns a várias espécies de cianobactérias. (CHORUS E BARTRAM, 1998; VAN APELDOORN et al., 2007). Existem ainda outras toxinas: aplysiatoxina, debromoaplysiatoxina e a lyngbiatoxina-a, com ações distintas, tal como dermatotóxicos, promotores de tumor e irritantes gástricos, porém ainda não totalmente elucidados (MSAGATI et al., 2006; VAN APELDOORN et al., 2007). O tipo de toxina

produzida varia de acordo com a espécie e a sintomatologia de acordo com o tipo de toxina. (CHORUS E BARTRAM, 1998).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias está relacionado à presença de hepatotoxinas em corpos d'água. As hepatotoxinas atuam principalmente sobre células hepáticas, onde desorganizam microfilamentos de actina do citoesqueleto, resultando na destruição das células hepáticas por falta de suporte, levando todo o tecido à necrose e hemorragia intra-hepática, o que acarreta morte do animal em poucas horas em doses agudas. Além de atuarem no fígado, as hepatotoxinas podem se acumular em outros órgãos como rins, estômago, pulmão, cérebro, gônadas e coração (CODD E METCALF, 2005).

As hepatotoxinas são as mais comuns em casos de intoxicação humana envolvendo cianobactérias, estas apresentam uma ação mais lenta, causando a morte entre poucas horas e poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. Os sinais observados após ingestão dessas hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia (BEASLEY et al., 1989).

As espécies já identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1992) (Tabela 1).

Tabela 1: Relação das cianotoxinas, organismos produtores e sintomatologias.

Toxina	Organismos Produtores	Sintomatologia a exposição aguda
Microcistinas	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Hapalosiphon, Synechocystis, Aphanocapsa, Oscillatoria</i>	Prostração ao, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Nodularinas	<i>Nodularia</i>	Prostração, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Saxitoxinas (PSPs)	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i> e também algumas espécies de dinoflagelados	Paralisia progressiva dos músculos, diminuição dos movimentos, exagerada respiração abdominal, cianose, convulsão, parada respiratória e morte.
Anatoxina-a	<i>Anabaena, Oscillatoria, Cylindrospermum, Aphanizomenon, Microcystis</i>	Paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão, morte por asfixia.
Anatoxina-a (S)	<i>Anabaena</i>	Paralisia progressiva, fraqueza muscular, diminuição da frequência respiratória e convulsões. Salivação intensa. Morte ocorre por falência respiratória.
Cilindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis raciborskii, Umezakia, Aphanizomenon, Raphidiopsis, Anabaena</i>	Desestruturação e necrose do fígado, danos em células renais, cardíacas, pulmonares e também da mucosa gástrica.
Dermatotoxinas	Cianobactérias em geral	Dermatites em geral e prurido. Irritação nos olhos, pele, febre tontura, fadiga e gastroenterite.
Lyngbyatoxina	<i>Lyngbya majuscula</i>	Aumento da secreção gástrica, promove a inflamação, edema pulmonar, irritação gastrointestinal e promoção de tumor dérmico.
Aplysiatoxina	<i>Stylocheilus longicauda, Lyngbya majuscula</i>	Irritação gastrointestinal.
Debromoaplysiatoxina	<i>Schizotrix calcicola</i> e <i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Irritação gastrointestinal

Microcistinas

A microcistina é uma hepatotoxina composta por um heptapeptídeo cíclico com mais de 100 isoformas com toxicidades diferentes (PUDDICK et al, 2014), sendo produzida por vários gêneros de cianobactérias, entre eles, *Microcystis* e *Anabaena* (SANT'ANNA et al., 2008). É considerada uma cianotoxina bastante potente e amplamente distribuída, ocorrendo em todo o planeta. Esta cianotoxina, assim como a nodularia, é um potente inibidor de proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2 A (PP2A) (CARMICHAEL, 1994) e se destaca por sua capacidade de causar

somente a fase I ou somente a fase II. Vale ressaltar que a metabolização de moléculas pode gerar moléculas mais reativas (mais tóxicas) que o composto parental devido à sua bioativação durante a fase I. Na fase I ocorrem as reações de oxidação, redução e hidrólise por enzimas monooxigenases microsomais (MO). Nesta fase, destacam-se as isoenzimas CYPs 1, 2 e 3 do citocromo P450 para os processos de biotransformação de xenobióticos (compostos químicos exógenos ao organismo) (VAN DER OOST et al., 2003).

O metabolismo normal de moléculas de oxigênio molecular (O_2) nos organismos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais compreendem: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO) (PISOSCHI E POP, 2015). Estas moléculas podem ser prejudiciais às células, especialmente o radical hidroxila, que é um potente agente oxidante, podendo inativar enzimas, causar danos em lipídios e em DNA e, por consequência, levar à morte celular (VAN DER OOST et al., 2003).

Contudo, para garantir a homeostase celular, os organismos desenvolveram o sistema antioxidante, que reduz as EROs, previnem e reparam dando em lipídeos oxidados e mantém o status redox de moléculas importantes para a redução de EROs, como a glutathiona reduzida (GSH) (VAN DER OOST et al., 2003; PISOSCHI E POP, 2015).

A exposição a agentes químicos pode acarretar em estresse oxidativo, aumentando os níveis de EROs nas células e causando desequilíbrio redox. Este estresse ocorre quando o sistema antioxidante não consegue compensar os níveis de EROs geradas, ocorrendo desequilíbrios no sistema. Desta forma, enzimas e outras moléculas do sistema de defesa antioxidante têm sido utilizadas como biomarcadores para a avaliação de estresse oxidativo. As principais enzimas do sistema antioxidante compreendem: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX). Além delas, compostos não enzimáticos, como a glutathiona reduzida (GSH), proteínas como ferritinas, transferinas, albuminas e moléculas como ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico participam do sistema (PISOSCHI E POP, 2015).

A SOD é uma metaloenzima que degrada o ânion superóxido (O_2^-) através da reação de dismutação, formando oxigênio e peróxido de hidrogênio, H_2O_2 . Este peróxido, por sua vez, embora pouco reativo, tem a capacidade de atravessar membranas biológicas, podendo ser convertido em radical hidroxila e, portanto, mais reativo, através da reação de Fenton (WINTERBOURN, 1990). A quebra do peróxido é realizada pela CAT dentro dos peroxissomos, formando oxigênio e água. Por outro lado, a GPx degrada H_2O_2 e outros tipos de peróxidos na presença de GSH e de forma extra-peroxissomal (VAN DER OOST et al., 2003).

Dentre os danos causados a biomoléculas devido à ocorrência de estresse oxidativo, tem-se, por exemplo, a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO).

A lipoperoxidação é um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo. Neste caso, as EROs reagem com os fosfolipídios das membranas celulares, sequestrando elétrons e desestruturando as membranas, causando aumento de permeabilidade. De um modo mais intenso, a lipoperoxidação pode ocasionar a ruptura da membrana com consequente morte celular (GUTTERIDGE HALLIWELL 2007; VAN DER OOST et al, 2003; PISOSCHI; POP, 2015).

A carbonilação de proteínas compreende danos sobre cadeias laterais de proteínas. A carbonilação pode ser decorrente de oxidação proteica pela reação de grupamentos cetonas e aldeídos provenientes de reações com EROs. Este processo pode levar a mudanças conformacionais de proteínas, além da perda da função de algumas enzimas (ATENCIO et al., 2008).

Amado e Monserrat, em sua revisão de 2010, hipotetizaram uma sequência de eventos que poderiam ocorrer no organismo animal após a exposição à microcistina, culminando em estresse oxidativo: a toxina entraria na célula via transportadores de membrana, chamados OATPs (polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos) que utilizam o GSH como trocador (microcistina entraria na célula e o GSH sairia). Com isso, ocorreria uma redução da concentração de GSH intracelular, reduzindo também as defesas antioxidantes (AMADO E MONSERRAT, 2010).

A microcistina ainda inibiria a enzima ATPsintase (que produz ATP) e causaria a hiperfosforilação de proteínas (de forma indireta) ao se ligar a proteínas fosfatases e impedir o seu funcionamento. Juntos, a hiperfosforilação e o estado pro-oxidativo da célula promoveriam a transcrição de genes de resposta antioxidante (GST – glutathione s-transferase, GPx – glutathione peroxidase e GCL- glutamato cisteína-ligase, importante na síntese de GSH). Contudo, a depleção de ATP aliada ao estado fosforilado das proteínas inibiriam GCL. A fosforilação ativaria a GST e GPx, mas os baixos níveis de GSH continuariam impedindo a biotransformação da microcistina (via sua conjugação com GSH, através da enzima GST) (AMADO E MONSERRAT, 2010).

Dessa forma, a microcistina se acumularia no organismo e o processo de quebra de H_2O_2 por GPx continuaria comprometido. Ao final, a capacidade antioxidante da célula seria ainda mais inibida pela fosforilação (ao inibir outra família de proteínas de peroxidases, a Peroxidina

1, Prx). Todos estes eventos em conjunto acabariam alterando o estado redox das mitocôndrias celulares, que poderiam levar à liberação de citocromo c, responsável pela ativação da cascata de apoptose (morte celular programada) (AMADO E MONSERRAT, 2010).

Li et al., (2009) também descobriram que os MCs afetam as atividades transcricionais de algumas enzimas antioxidantes nos testículos de ratos Wistar machos, sugerindo uma resposta adaptativa para combater o dano oxidativo induzido por MCs. GSTs desempenham papéis importantes na desintoxicação de MCs e a supressão de muitas isoformas de GST no testículo pode ser um modo chave de toxicidade MC. Após a exposição ao MC-RR, os níveis de malondialdeído (MDA) e H₂O₂ aumentaram notavelmente nos testículos de peixe-zebra, enquanto os sistemas de defesa antioxidante, como atividades de SOD, CAT, GST e GPX também foram aumentados (LI et al., 2009).

Shi et al. (2015) observaram elevada produção de EROs em testículos de ratos expostos a MC-LR. No ovário de zebrafish injetado com MC-LR, os aumentos nos teores de MDA, bem como as atividades enzimáticas e os níveis transcricionais de antioxidantes CAT, SOD e GPX também mostraram a ocorrência de estresse oxidativo. A diminuição significativa do conteúdo de GSH no ovário de peixe-zebra sugeriu a importância da desintoxicação de MC-LR pela GST via GSH. A recuperação final da histo- estrutura e dos índices antioxidativos indicou que o eficiente sistema de defesa antioxidante ovariano pode ser um importante mecanismo para o zebrafish contrabalançar a MC-LR (PASKEROVÁ, HILSCHEOVÁ E BLÁHA, 2012).

MC-LR pode aumentar a peroxidação lipídica, diminuir a atividade da SOD em células de Leydig de ratos, células de Sertoli e aumentar a produção de EROs em células de ovário e espermatogônia de rato e células de Sertoli de rã (PASKEROVÁ, HILSCHEOVÁ E BLÁHA, 2012).

Shi et al. (2017) demonstraram que a pré-administração de antioxidantes (antocianina e taurina) diminuiu significativamente a o nível de estresse oxidativo induzido por MC-LR em testículos de camundongos e proporcionou uma proteção contra a toxicidade reprodutiva. N-acetilcisteína (NAC), um precursor da GSH e intracelular EROs scavenger, também foi mostrado para proteger as células contra lesão oxidativa e apoptose induzida por MC-LR (SHI et al., 2017).

Além disso, outro estudo, foi demonstrado que os MCs se ligam à GSH, formando conjugados (MC-GSH) via glutathione S-transferase (GST), como o primeiro passo no processo de desintoxicação, seguido pela degradação dos conjugados de cisteína (MC-Cys). Como o

GSH é a primeira linha de defesa contra os EROs, seu efluxo celular deve aumentar a geração de EROs. Além disso, as mitocôndrias não possuem o pool enzimático associado à síntese de GSH e dependem da GSH citoplasmática, de modo que a depleção de GSH no citosol poderia refletir uma diminuição na concentração de GSH dentro das mitocôndrias, situação que favorece a produção de EROs e a ruptura da cadeia de transporte de elétrons.

As MCs podem também se ligar à subunidade beta da ATP-sintase, o que poderia perturbar o sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) reduzir a síntese de ATP e contribuir para a intensificação da despolarização da membrana mitocondrial e geração de EROs. A ruptura mitocondrial leva a um comprometimento da produção de ATP, afetando todos os processos celulares que dependem do ATP, incluindo a síntese de GSH o que contribuirá ainda mais para a redução do GSH dentro da célula e elevará o nível de estresse oxidativo. Algumas evidências também sugerem uma estreita conexão entre o estado de hiperfosforilação celular e a geração de estresse oxidativo induzida pela exposição às MCs.

2.4 POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIOS DE EXTRATOS VEGETAIS

Nos últimos anos, o uso de plantas medicinais ganhou importância nas necessidades de atenção primária à saúde em todo o mundo. As plantas medicinais são a espinha dorsal da prática médica tradicional, pois a maioria dos medicamentos modernos e seus derivados são produzidos a partir dessas plantas (DJERIDANE et al., 2006). Antioxidantes à base de plantas, como os polifenóis, ganharam atenção substancial devido aos seus potenciais benefícios medicinais. Antioxidantes naturais à base de plantas, seja na forma de extrato bruto ou fitocompostos individuais e seus derivados, são muito eficientes na prevenção de processos de dano celular causados pelo estresse oxidativo. A propriedade antioxidante dos compostos polifenólicos deve-se principalmente ao seu potencial redox, o que lhes permite atuar como inibidores de oxigênio singlete, quelantes de metais, agentes redutores e doadores de hidrogênio (LIU E HENKEL, 2002).

Os polifenóis vegetais auxiliam na absorção e neutralização de radicais livres, induzindo a expressão de peróxidos, extinção de oxigênio singlete e tripleto. O corpo humano possui um mecanismo antioxidante natural, que auxilia em diversas funções biológicas, como respostas antienvhecimento, propriedades antimutagênicas e anticancerígenas (DAR et al 2017). Qualquer alteração ou defeito no mecanismo antioxidante resulta em estresse oxidativo, que leva ao desenvolvimento de diversas doenças contagiosas. As drogas antioxidantes

sintéticas comercialmente disponíveis podem causar vários efeitos colaterais (SUBEDI et al., 2014).

Desse modo, as plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas em todo o mundo por milhares de anos. A crescente procura por medicamentos à base de plantas requer o desenvolvimento de metodologias de extração específicas e de controle de qualidade, a fim de garantir a eficácia e a segurança dos produtos derivados dessas plantas (GARZA-JUÁREZ et al., 2011). Os compostos vegetais adquiridos por meio da ingestão de chá, suco, frutas e derivados vegetais proporcionam uma diversidade de benefícios para a saúde das populações (DAUCHET et al., 2006) e representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de muitos fármacos (PINTO et al., 2002). Esses produtos apresentam uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

Estudos acerca da eficácia desses extratos ganharam grande destaque nas pesquisas, sendo abordados em diferentes aspectos. De fato, a composição biológica dessas bebidas e alimentos tem sido considerada um fator importante para reduzir o risco de doenças crônicas (COOKE et al., 2004), surgindo assim, como uma forte alternativa aos produtos sintéticos, não apenas na medicina tradicional, mas também na variedade de produtos alimentares e suas propriedades farmacêuticas, nutricionais e bioatividade (BESSADA et al., 2017). Encontrados naturalmente em plantas, os compostos fenólicos, também conhecidos como antioxidantes de polifenóis, que incluem flavonoides, ácidos fenólicos e ligninas, possuem nas plantas dentre outras a função de proteção contra patógenos e predadores. De modo que, em outros organismos estes compostos fenólicos podem inibir a peroxidação lipídica, assim como eliminar radicais livres, quelar os íons ferro e cobre, protegendo o colesterol lipoproteico da oxidação e estimulando as enzimas envolvidas na desintoxicação de substâncias cancerígenas (SORIANO-MELGAR et al., 2012).

Conhecidos por atuarem de forma direta ou indireta no organismo, estes compostos podem inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros); agindo sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como guanosina monofosfato cíclica (GMPc), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteínas quinases (PKs), etc.), na expressão de fatores de transcrição como proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B), e proto-oncogenes (cjun, c-fos e c-myc); inibindo ou ativando a expressão de células pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico

(NOS), ciclooxigenases (COX), citocinas (interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO, 2005; FIRMO et al., 2011). Conseqüentemente, com o desenvolvimento de novas tecnologias para produzir alimentos industrializados, o interesse pelo consumo de compostos naturais que se revelam benéficos para a saúde humana tem aumentado nos últimos anos (BESSADA et al., 2017).

Entretanto, apesar de contar com uma vasta biodiversidade, quase a totalidade das plantas medicinais estudadas hoje e usadas na preparação de medicamentos não pertence à flora brasileira, e isto acontece devido à falta de estudos científicos que comprovem suas ações.

Em geral, os produtos naturais de plantas medicinais são fontes significativas de novos compostos dinâmicos eficazes para novas preparações medicinais. O valor terapêutico de uma planta medicinal depende da associação entre as estruturas químicas e as atividades farmacológicas dos fitocompostos ativos (Saravanan, 2018).

Turnera subulata

Turneraceae é uma das famílias de plantas com flores eudicotiledôneas altamente apreciadas, que possui meia dúzia de 135 espécies atualmente reconhecidas. Quase todas as espécies foram amplamente utilizadas para tratar várias doenças na medicina popular tradicional. Nas práticas tradicionais, essas plantas eram usadas para tratar problemas gastrointestinais, tumores, bronquite, tosse, alívio da dor, doenças pulmonares e respiratórias (SZEWCZYK E ZIDORN, 2014). O gênero mais significativo de Turneraceae é *Turnera*, que compreende mais de 100 espécies classificadas em 9 séries. Os subarbustosestão distribuídos principalmente em zonas tropicais quentes e subtropicais quentes dos Estados Unidos da América (SOLÍS NEFFA E FERNÁNDEZ, 2000). Também é bem conhecido em outros países como Indonésia, Malásia, Flórida e várias outras ilhas do Pacífico; geralmente cultivada como flor de jardim e jardim ornamental. Os fitoquímicos presentes nas plantas são responsáveis pelas propriedades organolépticas e pela cor da planta.

Garantir a segurança, identidade e qualidade da preparação tradicional à base de plantas é uma preocupação crescente e vital para os mecanismos de tratamento cada vez mais complicados e desconhecidos (EASMIN et al., 2017). Em preparações de ervas, vários fitocompostos ativos podem estar presentes em quantidades escassas e não podem ser facilmente isolados. Além disso, os métodos tradicionais de separação e isolamento são caros, trabalhosos e demorados; portanto, há necessidade de praticar o uso de extratos brutos para

estudos iniciais (VAN BEEK et al., 2009). As propriedades antimicrobianas de compostos derivados de plantas estão associadas a danos estruturais e funcionais das células-alvo. Durante as últimas décadas, as atividades antimicrobianas de ambos os óleos essenciais e extratos de plantas foram extensivamente estudados (ANASTASAKI et al., 2017). Vários estudos especificaram que os efeitos protetores de espécies medicinais contra patógenos específicos são devidos aos seus constituintes químicos viz. polifenóis, flavonóides e compostos antioxidantes (MOHAJER et al., 2016).

T. subulata é um subarbusto, comumente conhecido como botão de ouro branco e amieiro branco, é enfranchisado no subcontinente indiano apesar de ser nativo da América do Sul e Central. *T. subulata* é uma erva perene que cresce frequentemente com raízes fortes e densas e caule cilíndrico lenhoso com a base de 30 a 80 cm de altura. *T. subulata* é utilizada na região nordeste do Brasil para o tratamento de amenorreia e dismenorreia (AGRA et al., 2007 ; DE ARAÚJO BARBOSA et al., 2007). Também é usado para tratar tumores, gripes, cortes, doenças gastrointestinais e respiratórias (DE ARAÚJO BARBOSA et al., 2007 ; ROQUE et al., 2010). Embora *T. subulata* seja amplamente utilizada na medicina tradicional há séculos, apenas muito menos informação está disponível sobre suas propriedades farmacológicas e atividade biológica. Embora existam vários tipos de técnicas espectroscópicas para análise de impressões digitais da erva, aqui foram empregadas as técnicas de FT-IR, GC-MS e LC-MS/MS. Fitocompostos bioativos presentes em diversos extratos de *T. subulata* foram analisados por meio de triagem fitoquímica preliminar, análises FT-IR, GC-MS e LC-MS/MS ainda não foram amplamente relatadas na literatura. *T. subulata* apresentou ricas propriedades antioxidantes (CHAI E WONG, 2012). Óleos essenciais presentes em *T. subulata* exibiram atividade antibacteriana muito eficaz contra as várias cepas de *Staphylococcus aureus* (FERNANDES et al., 2014). Apenas alguns esteróides, flavonóides e compostos de feofitina foram isolados de *T. subulata* (BRITO FILHO et al., 2014). Portanto, vale a pena investigar e caracterizar os fitocompostos bioativos presentes em diversos extratos de *T. subulata*. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar e caracterizar os fitocompostos bioativos presentes em diversos extratos brutos de *T. subulata*.

O gênero *Turnera* pertencente à família Turneraceae é constituído de espécies que são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, em especial a espécie *Turnera subulata*, alvo desse estudo e encontrada principalmente no Nordeste do Brasil (BITU et al., 2015). Utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diferentes doenças, como diabetes, hipertensão, dor crônica e inflamação (BRITO et al., 2012). Já foi descrito na literatura

que o extrato de plantas do gênero *Turnera* possuem algumas moléculas biológicas, como os compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides e taninos, que podem ser responsáveis pelas atividades biológicas relacionadas ao gênero (Tabela 2) (KUMAR et al., 2005), demonstrado efeitos antioxidantes (ESTRADA-REYES et al., 2013; GARZA-JUÁREZ et al., 2011).

Tabela 2. Principais compostos dos extratos de *Turnera* descritos na literatura.

Classe bioquímica	Constituintes químicos
Fenólicos	Arbutina
Flavonoides	Luteolina
Flavonoides	Quercetina
Flavonoides	Apigenina
Flavonoides	Pinocembrina
Flavonoides	Siringetina

Fonte: Autora (2022)

De fato, a diminuição da secreção de citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6 observadas em tratamentos com *Turnera diffusa* e *Turnera ulmifolia*, utilizadas em diferentes modelos de inflamação *in vivo*, demonstraram efeitos benéficos dessas espécies (BRITO et al., 2012; ESTRADA-REYES et al., 2013; GALVEZ et al., 2006; SZEWCZYK e ZIDORN, 2014). De forma adicional, estudos recentes têm associado efeitos positivos atribuídos ao gênero *Turnera* com maiores concentrações de arbutina, um composto biológico encontrado em diferentes partes da planta (TAKEBAYASHI et al., 2010). Essas propriedades antioxidantes associados aos extratos foram confirmadas por meio da diminuição da lipoperoxidação e modulação de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no fígado de ratos tratados (TAKEBAYASHI et al., 2010; ZHAO et al., 2008).

Harpagohytum procumbens

No Brasil, a espécie *H. procumbens* é conhecida popularmente como “garra-do-diabo” e/ou “unha-do-diabo”, nomes dados em função do aspecto ramoso e lenhoso do fruto, provido de barbas semelhantes a garras. A raiz da espécie é comumente comercializada sob o nome farmacêutico de *Harpagophyti radix*.

H. procumbens é uma planta herbácea perene originária do deserto de Kalahri, das estepes da Namíbia, Botswana e África do Sul, não sendo, portanto, uma planta nativa do Brasil. Além disso, não são encontrados relatos de ocorrência da espécie no Brasil. A espécie ocorre

entre as latitudes 15 e 30° em Namibia, Botswana, África do Sul, Angola e, em menor proporção, em Zambia, Zimbabwe e Moçambique. A planta cresce tipicamente em áreas de baixa precipitação anual (150-500 mm/ano) tais como solos arenosos vermelhos do Deserto de Kalahari. A abundância e a visibilidade da planta dependem fortemente da precipitação. A espécie é mais abundante em áreas abertas e desgastadas, já que não compete bem com gramíneas e tem uma distribuição agregada.

Harpagophytum procumbens tem sido usado há muito tempo para tratar uma variedade de condições inflamatórias, incluindo artrite reumatóide degenerativa, osteoartrite e tendinite. Trabalhos anteriores sugerem sua capacidade de atenuar vários componentes da cascata inflamatória, incluindo a via NF- κ B, que promove a sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) (Huang et al. 2006; Kaszkin et al. 2004), importantes mediadores de citocinas (IL-1 β), IL-6 e TNF- α) e enzimas para a síntese de prostaglandinas, como ciclooxigenase-1/2 (COX-1/2) (FIEBICH et al. 2012). Harpagoside, harpagide, 8- p-cumaroilharpagida e metabólitos relacionados, bem como glicosídeos fenilpropanóides foram implicados como efetores antiinflamatórios primários (ABDELOUAHAB E HEARD 2008; ZHANG et al. 2011; MNCWANGI et al. 2012; GEORGIEV et al. 2013).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H., 1984. Catalase in vitro. In: Packer, L. (Ed.), **Methods in Enzymology**, vol. 105. Academic Press, Orlando, p. 121

AGRA MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 111: 383-395. 2007.

ALEXA, E., Danciu, C., Radulov, I., Obistioiu, D., Sumalan, R.M., Morar, A., Dehelean, C.A., 2018. Phytochemical screening and biological activity of *Mentha × piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. extracts. **Anal. Cell. Pathol.** 2018.

AMADO, L. L.; MONSERRAT, J. M. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. **Environment International**, v. 36, n. 2, p. 226–235, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.010>>.

ATENCIO, L. et al. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. **Toxicol.**, v. 52, n. 1, p. 1–12, 2008.

AVELINO-FLORES MDC, Cruz-Lo´pez M. del C, Jime´nez-Montejo FE, Reyes-Leyva J: Cytotoxic activity of the methanolic extract of *Turnera diffusa* Willd on breast cancer cells. **J Med Food**, 18:299–305, 2015.

AZAD MB, Chen Y, Gibson SB: Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): Implications for cancer progression and treatment. **Antioxid Redox Signal**, 11:777–790, 2009.

AZEVEDO S.M., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R. Human intoxication by microcystin-LR during renal dialysis in Caruaru-Brazil. **Toxicology** 181, 441–446. 2002.

AZEVEDO SMFO. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. **Medicina On Line**, v. 1, ano 1, n. 3, 1998.

BARBOSA, J. E. L. et al. Aquatic systems in semi-arid Brazil: limnology and management. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 24: 103-118p. 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A. & VALENTINE, W. M. Intoxication in livestock and water fowl. *Clinical Toxicology – Veterinary Clinics of North America*. **Food Animal Practice**, 5:345-361. 1989.

BITU, V. C. N.; BITU, V. C. N.; MATIAS, E. F. F.; LIMA, W. P.; PORTELO, A. C.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal. Ethnopharmacology**, v. 172, p. 265-272, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRITO, N. J. N. et al. Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4340–4347, 1 dez. 2012.

BRITO FILHO, S.G.d., Fernandes, M.G., Chaves, O.S., Chaves, M.C.d.O., Araruna, F.B., Eiras, C., Leite, J.R.d.S.d.A., Agra, M.d.F., Braz-Filho, R., de Souza, M.d.F.V. Chemical constituents isolated from *Turnera subulata* Sm. and electrochemical characterization of phaeophytin b. **Quím. Nova** 37, 603–609. 2014.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 78- 86, 1994.

CHEN, L. et al. A review of reproductive toxicity of microcystins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 381–399, 15 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389415300339?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 jul. 2019.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3. ed. Geneva: WHO - World Health Organization, 1998.

CODD GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicol Appl Pharmacol** 203:264–272, 2005.

COOKE, L. J.; WARDLE, J.; GIBSON, EL.; SAPOCHNIK, M.; SHEIHAM, A.; LAWSON, M. Demographic, familial and trait predictors of fruit and vegetable consumption by pre-school children. **Public Health Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 295-302, 2004.

DAUCHET, L.; AMOUYEL, P.; HERCBERG, S; DALLONGEVILLE, J. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. **The Journal of Nutrition**, v.136, p. 2588-93, 2006.

DE FIGUEIREDO, D. R. et al. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 2, p. 151–163, out. 2004.

DIAS, E. et al. Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. **Toxicon**, p. 487– 495, 2009.

DIAS, I. C. L.; NETO-SANTOS, M.; OLEA, R. S. G. Historical context, popular use and scientific conception on medicinal plants. **Caderno de Pesquisa**, v. 18, 2011.

DING, et al. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. **Environ. Health Persp.** v. 106, p. 409–413, 2000.

DING, W.X.; ONG, C.N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 220, p. 1–7, 2003.

DRAPER HH, et al.: A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, 15:353–363. 1993.

EDZIRI, H., Marzouk, B., Mabrouk, H., Garreb, M., Douki, W., Mahjoub, A., Verschaeve, L., Najjar, F., Mastouri, M. Phytochemical screening, butyrylcholinesterase inhibitory activity and anti-inflammatory effect of some Tunisian medicinal plants. **S. Afr. J. Bot.** 114, 84–88, 2018.

ESTRADA-REYES, R.; CARRO-JUÁREZ, M.; MARTÍNEZ-MOTA, L. Pro-sexual effects of *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) in male rats involves the nitric oxide pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 164–72, 2013.

FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43-50, Apr. 2005.

FERRÃO - FILHO, A. da S. Bioacumulação De Cianotoxinas E Seus Efeitos Em Organismos Aquáticos. **Oecol. Bras.**, v. 13, n. 2, p. 272–312, 2009.

FERREIRA. A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres : conceito , doen~cas realcionas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, p. 61–68, 1997.

FILIPPIN, L. I. et al. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n.1, p. 17-24, jan/fev, 2008.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; FONSECA, A. M. **Cianobactérias e cianotoxinas em Áreas Recreacionais do Reservatório de Salto Grande, Americana – SP**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2014.

FUJIKI, H. & M. SUGANUMA: Tumor necrosis factor-alpha, a new tumor promoter, engendered by biochemical studies of okadaic acid. **J. Biochem.** 1994.

GARZA-JUÁREZ, A.; SALAZAR-CAVAZOS, M. D. L. L.; SALAZAR-ARANDA, R.; PÉREZ-MESEGUER, J.; TORRES, N. W. Correlation between chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (Damiana). **Planta Medica**, v. 77, p. 958–963, 2011.

GUPTA, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Lakshmana Rao, P.V. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology**, v. 188, 285–296, 2003.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D. et al. Cytotoxic and morphological effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin, and their combinations on the human hepatic cell line HepG2. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 240–251, 2019.

HALLIWEL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. **Free. Rad. Res.**, v. 25, p. 25-57, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. UK: Oxford University Press. p. 936, 2007.

MITTAL, M. Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB: Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**. 20:1126–1167, 2014.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. D.; DE MELO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

KIST, L.W., Rosemberg, D.B., Pereira, T.C., de Azevedo, M.B., Richetti, S.K., de Castro Leao, J., Yunes, J.S., Bonan, C.D., Bogo, M.R., 2012. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** n. 155, 247 e 252, 2012.

KUMAR, S.; TANEJA, R.; SHARMA, A. The genus *Tunera*: A review update. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 5, p. 383-391, 2005.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LEAL, A. de C.; SOARES, M. do C. P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. suppl 2, p. 84–89, 2004.

LI XY, Liu YD, Song LR, Liu HT. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. **Toxicol** 42:85–89, 2003.

LIU Z, Lenardo MJ: Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. **Dev Cell**,12:484–485, 2007.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120, p. 43-49, 1998.

MA, J. et al. Chronic exposure of nanomolar MC-LR caused oxidative stress and inflammatory responses in HepG2 cells. **Chemosphere**, v. 192, p. 305–317, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517317435>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

MACKINTOSH, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Lett.** 264, 187 e 192, 1990.

MALBROUCK, C., Kestemont, P. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (1), 72–86, 2006.

MCCORD, J.M., Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 244, 6049–6055, 1969.

MOHAJER, S. et al. Phytochemical constituents and radical scavenging properties of *Borago officinalis* and *Malva sylvestris*. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 673–681, 30 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016306252>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

MSAGATI, T.A., Siame, B.A., Shushu, D.D., 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.* 78, 382–397.

NAKANO, Y., M. SHIRAI, N. MORI & M. NAKANO: Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. **Appl. Environ. Microbiol.** 1991, 57, 327–330.

NASEEM, S. M., H. B. HINES & D. A. Creasia: Effect of toxins on arachidonic acid metabolism in rat cultured pulmonary alveolar macrophages. **Biochem. Int.**, 19, 583–592. 1989.

PASKEROVÁ, H.; HILSCHEROVÁ, K.; BLÁHA, L. Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. **Environmental Science and Pollution Research**, jul. 2012.

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>>.

PRIETO, A.I. et al. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 337-345, 2007.

PUDDICK J., M.R. Prinsep, S.A. Wood, S.A.F. Kaufononga, S.C. Cary, D.P. Hamilton, High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners, **Mar. Drugs**, 12, 5372–5395. 2014.

RASTOGI R.P., R.P. Sinha, A. Incharoensakdi, The cyanotoxin-microcystins: current overview, **Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.** 13, 215–249. 2014.

RESENDE, R. M. S. **Produção e caracterização de carvão ativado obtido a partir da borracha de pneu e avaliação da eficiência de remoção de saxitoxinas.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto. 2011.

ROSLYN WOOD, Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. **Environment International.** vol: 91 pp: 276-28, 2016.

SANT'ANNA, C.L. Sant'Anna, M.T.P. Azevedo, V.R. Werner, C.R. Dogo, F.R. Rios, L.R. Carvalho Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil Algal. **Stud.**, 126 (2008), pp. 251-265.

SARAVANAN, M. et al. Phytochemical and pharmacological profiling of *Turnera subulata* Sm., a vital medicinal herb. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 822–833, 15 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018307647>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

SHI, J., Zhou, J., Zhang, M., 2015. Microcystins induces vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells via activation of NF-kappaB. **Mediat. Inflamm.** 2015, 942159

SHI, J. et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates microcystin-LR induced oxidative stress and inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Chemosphere**, v. 168, p. 25–31, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.037>>.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SORIANO-MELGAR, L. A. A.; ALCARAZ-MELÉNDEZ, L.; RODRÍGUES-MÉNDEZ, L.C.; PUENTE, M. E.; RIVERA-CABRERA, F.; ZENTENO-SAVÍN, T. Antioxidant and trace element content of damiana (*Turnera diffusa* Willd) under wild and cultivated conditions in semi-arid zones. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 321–327, 2012.

SZEWCZYK K, Zidorn C: Ethnobotany, phytochemistry, and bio- activity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. **J. Ethnopharmacol**, 152:424–443. 2014.

TAKEBAYASHI, J.; ISHII, R.; CHEN, J.; MATSUMOTO, T.; ISHIMI, Y.; TAI, A. Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. **Free Radical Research**, v.44, n. 4, p. 473–478, 2010.

UENO, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H., Chen, G.C., Chen, G., Yu, S. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis** 17, 1317–1321.1996.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J.; BAKKER, G. J. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology** , v. 13, p. 57-149. 2003.

WHO Guidelines for Drinking-Water Quality - Second Edition - Volume 2 - Health Criteria and Other Supporting Information - Addendum, **World Health Organization**, Geneva (1998).

LI, H. et al. In vivo study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins. **Toxicol**, v. 53, n. 1, p. 169–175, 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010108005758>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

ZHANG X, Ji W, Zhang H, Zhang W, Xie P. Studies on the toxic effects of microcystin-LR on the zebrafish (*Danio rerio*) under different temperatures. **J Appl Toxicol** 31:561–567. 2011.

ZHAO, Y., Xie, P., Tang, R., Zhang, X., Li, L., Li, D. In vivo studies on the toxic effects of microcystins on mitochondrial electron transport chain and ion regulation in liver and heart of rabbit. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 148, 204–210. 2008.

Stewart KM, Cole D. The commercial harvest of devil's claw (*Harpagophytum* spp.) in southern Africa: the devil's in the details. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005;100(3):225- 36.

Grant L, McBean DE, Fyfe L, Warnock AM. A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*. **Phytotherapy Research**. 2007;21:199-209.

Mncwangi N, Chen W, Vermaak I, Viljoen AM, Gericke N. Devil's Claw - a review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. **Journal of Ethnopharmacology**. 2012;143(3):755-71.

Anauate MCC. Efeito dos extratos de *Harpagophytum procumbens* (garra do diabo) e suas frações na atividade da COX-1 e COX-2 e na produção de NO em sangue total [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

Cellular oxidative stress stimulated by microcystin: review

Estresse oxidativo celular estimulado por microcistina:
revisão Estrés oxidativo celular estimulado por
microcistina: revisión

Received: 08/23/2021 | Reviewed: 08/29/2021 | Accept: 09/03/2021 | Published: 09/05/2021

Iara Bezerra de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1382-7296> Federal University of Campina Grande, Brazil

E-mail: iara_bio@yahoo.com.br

Hanndson Araújo Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8914-9589> Federal University of Campina Grande, Brazil

E-mail: hanndson@gmail.com

Abstract

Introduction: Cyanobacteria are organisms capable of producing a high number of bioactive molecules, known as cyanotoxins. Among the cyanotoxins, microcystins stand out, compounds with hepatotoxic potential. Studies claim that the most common and most toxic isoform among microcystins is microcystin-LR. One of the most frequently detected properties of microcystins is their ability to generate cellular oxidative stress. Thus, the present study is a bibliographic research about the biochemical mechanism of free radical generation caused by Microcystin LR. Methodology: for the preparation of this review, a survey was carried out in the national and international literature. The inclusion criteria for the construction of this work were original and review articles that addressed the ability of microcystin LR to generate oxidative damage. Results: Once they enter the body, microcystins accumulate in the liver, so that toxicity is associated with specific inhibition of protein phosphatase 1 and 2A (PP1 and PP2A), leading to disruption of cell integrity. Studies prove that MCs produce oxidative stress in vitro and in vivo and that they can act as tumor promoters. Conclusion: there is a possible relationship between cellular oxidative stress caused by microcystin. Thus, cyanobacterial blooms represent a threat to the health of several animals, including man, however, further studies on the topic addressed are needed.

Keywords: Free radicals; Cyanotoxins; Toxicity.

Resumo

Introdução: Cianobactérias são organismo capazes de produzir um alto número de moléculas bioativas, conhecidas como cianotoxinas. Dentre as cianotoxinas destaca-se as microcistinas, compostos com potencial hepatotóxico. Estudos afirmam que a isoforma mais comum e mais tóxica entre as microcistinas é a microcistina-LR. Uma das propriedades das microcistinas mais frequentemente detectadas é a sua capacidade de gerar estresse oxidativo celular. Desse modo, o presente estudo trata-se de uma pesquisa bibliográfica acerca do mecanismo bioquímico de geração de radicais livres

ocasionado pela Microcistina LR. Metodologia: para a elaboração desta revisão foi realizado um levantamento na literatura nacional e internacional. Os critérios de inclusão para construção desse trabalho foram artigos originais e de revisão que abordavam a capacidade da microcistina LR gerar o dano oxidativo. Resultados: As microcistinas, uma vez que entram no organismo, se acumulam no fígado, de modo que a toxicidade está associada à inibição específica da proteína fosfatase 1 e 2A (PP1 e PP2A), levando a interrupção da integridade celular. Estudos comprovam que as MCs produzem estresse oxidativo in vitro e in vivo e que podem atuar como promotores tumorais. Conclusão: existe uma possível relação entre o estresse oxidativo celular ocasionados pela microcistina. Assim, as florações de cianobactérias representam uma ameaça à saúde de diversos animais, inclusive o homem, no entanto, se faz necessário mais estudos acerca do tema abordado.

Palavras-chave: Radicais livres; Cianotoxinas; Toxicidade.

Resumen

Introducción: Las cianobacterias son organismos capaces de producir un elevado número de moléculas bioactivas, conocidas como cianotoxinas. Entre las cianotoxinas destacan las microcistinas, compuestos con potencial hepatotóxico. Los estudios afirman que la isoforma más común y más tóxica entre las microcistinas es la microcistina-LR. Una de las propiedades de las microcistinas detectadas con mayor frecuencia es su capacidad para generar estrés oxidativo celular. Así, el presente estudio es una investigación bibliográfica sobre el mecanismo bioquímico de generación de radicales libres causado por Microcystin LR. Metodología: para la elaboración de esta revisión se realizó un relevamiento en la literatura nacional e internacional. Los criterios de inclusión para la construcción de este trabajo fueron artículos originales y de revisión que abordaron la capacidad de la microcistina LR para generar daño oxidativo. Resultados: una vez que ingresan al cuerpo, las microcistinas se acumulan en el hígado, por lo que la toxicidad se asocia con la inhibición específica de la proteína fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A), lo que conduce a la alteración de la integridad celular. Los estudios demuestran que los MC producen estrés oxidativo in vitro e in vivo y que pueden actuar como promotores de tumores. Conclusión: existe una posible relación entre el estrés oxidativo celular causado por microcistina. Por lo tanto, las floraciones de cianobacterias representan una amenaza para la salud de varios animales, incluido el hombre, sin embargo, se necesitan más estudios sobre el tema abordado.

Palabras clave: Radicales libres; Cianotoxinas; Toxicidad.

1. Introduction

Climate change is transforming ecosystems and their composition across the planet. In recent years, studies have indicated eutrophication, increased CO₂ levels and global warming as responsible for the frequency, intensity and duration of cyanobacterial proliferation in different ecosystems worldwide (Rastogi, et al, 2014).

Eutrophication is considered one of the main events that affect water bodies and, consequently, water parameters. The eutrophication process interferes with the physical and chemical characteristics of the water and can mediate profound changes in the qualitative and quantitative conditions of aquatic communities. In this way, several problems are induced, such as the proliferation of toxic algae, known as cyanobacteria (Carpenter, 2005; Dhanam, et al, 2016).

Cyanobacteria are prokaryotic and photosynthetic microorganisms present in the most diverse terrestrial environments. Planktonic representatives are of special interest, as a result of ecological success and competitive strategies, they are among the pioneer organisms of terrestrial life and present themselves to the present day, producing a range of secondary metabolites that increasingly arouse scientific interest (Carmichael, 1994; Carmichael & Boyer, 2016). Cyanobacteria were pioneering organisms on primitive Earth, and the oxygen produced through photosynthesis for the cyanobacteria contributed to the formation of the ozone layer. However, these microorganisms are currently known for their potentially toxic flowering, causing problems for

water treatment and being of potential risk to human health (Szlaga, et al, 2015).

Known as cyanotoxins, the metabolites produced by cyanobacteria in natural concentrations are toxic to plants, invertebrates and vertebrates, including humans. Those, in turn, comprise several classes, with different mechanisms of action and their own characteristics (Chorus, 2000).

The accelerated growth of cyanobacteria and the formation of blooms lead to a potential increase in the concentration of toxins in the water, which represents a serious risk to public health. Toxins, produced by cyanobacteria, can cause changes in the taste, odor of water, and cause toxicity in aquatic biota, which can lead animals to death from liver failure and the development of cancerous tumors. They can also accumulate in the tissues of fish intended for human consumption. In addition, the long-term effects of cyanotoxins in humans are still unclear (Carmichael & Boyer, 2016; Janssen, 2019; Metcalf & Codd, 2020).

In the case of cyanotoxins, liver toxins, such as microcystins (MCs), are the most abundant and widely studied natural toxins (Teneva, et al., 2016). More than 90 variants of CM have been detected (Pearson, et al, 2010), among which microcystin-LR (MC-LR) is the most widely distributed and toxic (Gupta, et al., 2003; Rastogi, et al., 2014). It is known that MC-LR is a hepatotoxin that acts in the intense inhibition of intracellular serine / threonine phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A) (MacKintosh, et., 1995). Because of this inhibition, an imbalance of cell phosphorylation occurs, culminating in a cell signaling disorder (Humpage & Falconer, 2003; Sotton, et al., 2012). In addition, it can cause oxidative stress due to the intracellular excess of reactive oxygen species (ROS) considered, therefore, another important mechanism of hepatotoxicity MC-LR (Ma, et al., 2017). Studies reveal that apoptosis induced by MC-LR is possibly mediated by the mitochondrial pathway where ROS and transcription factor such as NF- κ B and p53 may be involved (Fu, et al., 2005; Feng, et al., 2011; Ji, et., 2011).

In these terms, the present study aimed to collect and summarize detailed and available data on the occurrence of cyanotoxins worldwide and the human and animal intoxications associated with cyanotoxins. Seeking to provide an in-depth analysis, which this information providers of its toxic potential, as well as providing a discussion of its toxicity in the activity related to the generation of reactive oxygen species and consequently generation of cellular oxidative damage, in order to understand the risks to human health caused by MCs.results.

2. Methodology

This research can be considered of the conceptual-theoretical type because it focuses on conducting a systematic literature review, followed by a structured analysis of the contents published on the subject. An inductive analysis method is adopted because, based on the information collected in the publications, their analysis and classification, the logical structure on the topics that involve the theme presented follows an inference criterion. Systematic literature review is a reliable research approach due to its comprehensiveness and explicit presentation of the means and results obtained. Compared to the traditional review, it includes a clear statement of the purpose of the review, a thorough search for publications, a critical evaluation of the main publications and the possibility of replicating the research method. (Pai, et al., 2004).

In the present study, was carried out with a search for articles in the Pubmed, Science Direct, SciELO databases, between the months of April 2020 and June 2021, using the descriptors according to the theme. Thus, the research of articles was divided into 2 parts, of which the objective would be to list the information more

precisely for each survey, with the keywords: 1) “Oxidative Stress”; “Cyanotoxin” and “Microcystin”: to conduct a literature survey that addressed the biochemical mechanisms of cellular oxidative stress and the toxicology of cyanotoxins. 2) “Cyanotoxin and Oxidative Stress” and “Microcystin and Oxidative Stress”: to obtain studies that addressed the relationship of cyanotoxins with cellular oxidative stress.

The articles were selected after reading the title and abstract, and the inclusion criteria were: articles published any year dealing with cyanotoxins and oxidative stress, and from 2010 to 2021 on the relationship of oxidative stress and microcystins, available in full and that dealt with the theme.

3. Cyanobacteria

Cyanotoxins

Cyanotoxins are toxins produced by some species of cyanobacteria in fresh or salt water. These toxic substances can be stored in the cell's cytosol and are released if cell lysis occurs, they are classified as hepatotoxins (microcystin and nodularin), neurotoxins (anatoxin-a, homoanatoxin-a and saxitoxin), cytotoxins (cylinderspermopsin) and dermatotoxins (lingbiatoxin) (Carmichael & Boyer, 2016) (See Table 1). Some of the most important roles that cyanotoxins can play for the algae that produce them are to prevent the herbivore, as they can function as allopathic substances and even as signaling molecules between species and individuals (Carmichael, 1994; Svirčev, et al., 2017). Some of these toxins, which are characterized by their rapid action, causing death by respiratory arrest after a few minutes of exposure, have been identified as neurotoxic alkaloids or organophosphates. Others act less quickly and are identified as hepatotoxic peptides or alkaloids. These are the two main groups of cyanotoxins that can be classified as: neurotoxins and hepatotoxins (Azevedo, 1998; Andrinolo, et al., 1998).

Table 1: Classification as to the pharmacological action and chemical structure of the main cyanotoxins.

ACTION	STRUCTURE	TYPE
Hepatotoxins	Cyclic Peptides	<i>Microcystin</i> <i>Nodularin</i>
	Alkaloid	<i>Cylinderspermopsin</i>
Dermatotoxins	Lipid and Carbohydrate	<i>Lipopolisacaride</i>
Neurotoxins	Alkaloid	<i>Saxitoxin</i> <i>Anatoxin-a</i> <i>Homoanatoxin-a</i> <i>Anatoxin-a (S)</i>

Source: Authors.

Hepatotoxins

The main hepatotoxins characterized so far are cyclic heptapeptides known as microcystins and pentapeptides designated as nodularins. The general structure of microcystins is D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, where X and Z are the two variable L amino acids, D-MeAsp is D-erythro methylaspartic acid and Mdha is N-methyl -hydroalanine (See Figure 1 - A) (Carmichael, 1994; Meriluoto, et al., 2016; Bouaïcha, et al., 2019).

Nodularins (NODs) are cyclic pentapeptide hepatotoxins with the overall cyclic structure (-d - erythro

-β-methylAsp (iso-bond)-1-Z-Adda-d-Glu (iso-bond)-2-(methylamino)-2-Acid (Z)-dehydrobutyric (See Figure 1 - B) (Meriluoto, et al., 2016). NODs share many structural and functional properties with MCs, the primary without two aminoalkanoic acid residues and showing a substitution of the N-methyl-hydroalanine residue with N-methyl-hydrobutyrine. The second aminoalkanoic acid residue (Z) is L-Arg within the frequently occurring nodularin-R (also referred to as “nodularin” without suffix) (Meriluoto, et al., 2016).

The qualitative variations observed in the two L amino acids in microcystins are used to designate their different variants, for example, microcystin-LR (leucine-arginine); -RR (arginine-arginine); -YA (tyrosine-alanine). Adda, is 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-deca-4,6-dienoic acid, which is also present in nodularins and has been determined to be responsible for the biological activity of these hepatotoxins (Meriluoto, et al., 2016; Bouaïcha, et al., 2019).

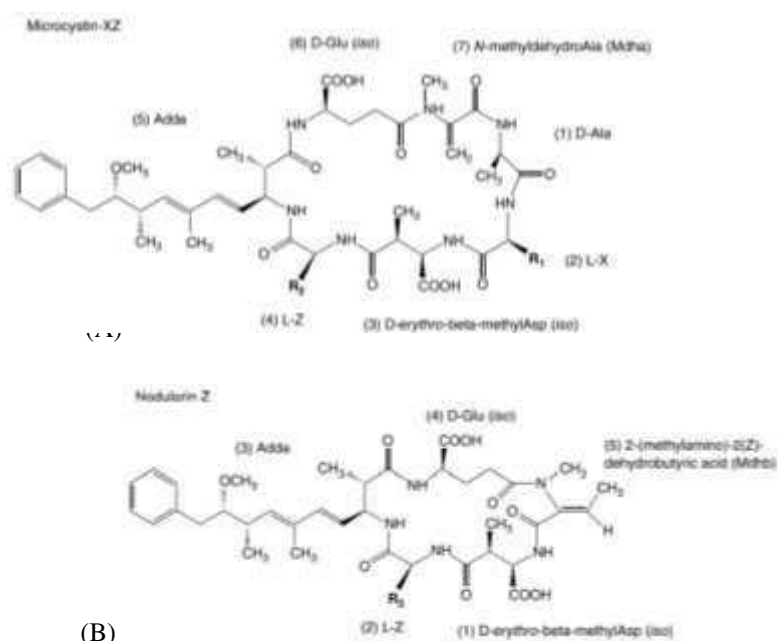
Hepatotoxins reach hepatocytes through bile acid receptors and promote a disorganization of the intermediate filaments and actin filaments, which are polymers of proteins that are part of the cytoskeleton (Yan, et al., 2020). This disorganization leads to a retraction of the hepatocytes, causing loss of contact between them and the cells that form the sinusoidal capillaries. Consequently, the liver loses its architecture and develops serious internal injuries. The loss of contact between the cells creates internal spaces that are filled by the blood that begins to flow from capillaries to these locations (Carmichael, 1994; Yan, et al., 2020).

Through the study of the mechanisms of action of these hepatotoxins, it was demonstrated that several microcystins and nodularins are potent inhibitors of type 1 and 2A eukaryotic cell protein phosphatases. These toxins are recognized as potent liver tumor promoters (Yan, et al., 2020; Takai, et al., 2018).

Nodularins have stronger tumor initiation and promotion activities compared to MCs. this will stem from its smaller ring structure, allowing easier ingestion by hepatocytes (Carmichael, et al., 1994).

Like MCs, NODs also induce the assembly of reactive intracellular oxygen species, causing peroxidation of lipids, proteins and DNA (Žegura, et al., 2011).

Figure 1: Structural formula of hepatotoxins, A - Microcystin and B - Nodularine.



Source: Meriluoto, et al. (2017).

Cylindrospermopsins (CYNs) also are considered hepatotoxins, but they're guanidine alkaloids, produced by a series of cyanobacterial genera (Li, 2012). Currently, five CYN analogs are known, namely, CYN, 7 - epi - CYN and seven - deoxy - CYN (See Figure 2) and therefore the two recently characterized congeners, 7 - deoxidesulfo - CYN and seven - deoxidesulfo -12 - acetyl - CYN (Wimmer, et al., 2014). The structures of CYN and 7-epi- CYN have repeatedly undergone name changes, with each at some point being called CYN. at the present, 7- (S) -CYN is considered the most toxin produced by *Cylindrospermopsis raciborskii*. supported the reassessment of absolutely the C-7 configuration of the isolated CYN, revised synthesis, and asymmetric synthesis, absolutely the configuration of all asymmetric CYN centers, 7 - epi - CYN and seven - deoxy - CYN were established. it had been concluded that the names remain an equivalent as they were assigned (Meriluoto, et al., 2016).

CYN is a strong inhibitor of protein synthesis. The liver is its main target, with four successive stages of pathological alterations in: inhibition of protein synthesis, membrane proliferation, accumulation of fat droplets and cell death (Moreira, et al., 2013).

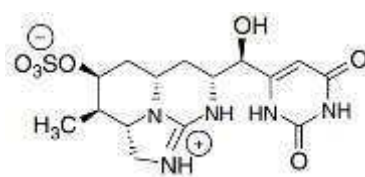
Studies show that exposure to CYN led to a decrease in the decreased glutathione (GSH) content in rat hepatocytes.

This reduction has been attributed to the inhibition of GSH synthesis (Moreira, et al., 2013; Runnegar, et al. 2002).

Norris et al., 2002, suggested that the activation of CYN by cytochrome P450 is of fundamental importance in its mechanism of action. Initiation of CYN by cyt-p450 results in increased toxicity; therefore, it is regarded as a pro-genotoxic substance (Kinnear, 2010). In addition, oxidative stress can play a significant role in CYN toxicity in vitro (Gutiérrez-Praena, et al., 2011a), and in vivo Gutiérrez-Praena, et al., 2011b).

In general, CYN appears as a toxic molecule with wide reach. It disturbs various organs and metabolic pathways, both directly and after some metabolic alteration. The absence of a particular objective for CYN hinders further efforts to comprehend its potent toxicity and classify appropriate exposure limits (Meriluoto, et al., 2016).

Figure 2: Structural formula of cylindropemopsin.



Source: Meriluoto (2007).

Among all cyanotoxins, the most common type of poisoning involving cyanobacteria is related to the presence of hepatotoxins in water bodies. Hepatotoxins act mainly on liver cells, where, by different mechanisms, they mediate the destruction of liver cells, leading all tissues to necrosis and intrahepatic hemorrhage, which results in the animal's death in a few hours in acute doses. In addition to acting on the liver, hepatotoxins can accumulate in other organs, such as kidneys, stomach, lung, brain, gonads and heart (Mohamed, et al., 2020).

Neurotoxins

Neurotoxins belong to three chemically distinct families, anatoxin-a and homoanatoxin-a, which mimics the effect of acetylcholine; anatoxin-a (s), which is an anticholinesterase, and saxitoxins, which block the sodium channels of nerve cells (Andrinolo, et al., 2008). Neurotoxins are produced by species and lineages included in the genera: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* and *Cylindrospermopsis* (Buratti, et al., 2017; Svirčev, et al., 2017).

Anatoxin-a (ANTX) and homoanatoxin-a (HANTX) are effective neurotoxins, created by several of cyanobacterial species. ANTXs contaminate the lakes and rivers and have been linked to several animal deaths. ANTX is characterized by a very fast death factor for animals that have consumed toxic cyanobacteria.

More ANTX derivatives have additionally been identified in samples at different concentrations. ANTX and HANTX undergo quick chemical decay in nature; the main degradation products constitute dihydro and epoxy analogs (Stevens & Krieger, 1991).

Anatoxin-a was the first cyanobacterial toxin to be chemically and functionally defined, it is a low molecular weight secondary amine, (1 - [(1R, 6R) -9-azabicyclo [4.2.1] non-4- en-5-yl] ethanone) (See Figure 3 - A). This neurotoxic alkaloid is a potent postsynaptic neuromuscular blocker and cholinergic receptors. This action occurs because anatoxin-a binds irreversibly to acetylcholine receptors, as it is not degraded by acetylcholinesterase (Devlin, et al., 1997; Andrinolo & Sedan, 2015; Chen & Blatchley, 2020).

In this way, it acts on cholinergic synapses, activating the nicotinic receptors of the postsynaptic cell. The postsynaptic cell may be another neuron that will respond with the start of a nerve impulse or a muscle or effective glandular cell that will respond to the presence of contraction or anatoxin-inducing discharge, depending on the case. Unlike acetylcholine, anatoxins-a will not be deactivated by acetylcholinesterase, so that the activation signal remains "on". According to their action at the synaptic level, mammalian poisonings are characterized by intense muscle contractions and abundant salivation. Muscle cells continue to be stimulated, causing muscle contractions, fatigue and paralysis (Devlin, et al., 1977; Andrinolo & Sedan). Signs of poisoning by this toxin in wild and domestic animals include imbalance, muscle fasciculation, wheezing and seizures. Death occurs due to respiratory arrest and occurs from a few minutes to a few hours, depending on the dosage and previous food consumption. Clinical signs of intoxication show progression of muscle fasciculation, decreased movement, exaggerated abdominal breathing, cyanosis, convulsion and culmination with death (Azevedo, 1998; Kubickova, et al., 2019).

Another neurotoxin, later characterized, which shows the same signs of anatoxin-a poisoning, plus intense salivation, was designated as anatoxin-a (s). This neurotoxin has an action mechanism similar to anatoxin-a, as it inhibits the action of acetylcholinesterase, preventing the degradation of acetylcholine bound to receptors. Anatoxin-a (s) (See Figure 3 - B) binds to the enzyme and does not allow its interaction with acetylcholine. As acetylcholine is not deactivated, it remains in the synaptic space for a longer time, acting on nicotinic receptors. Thus, the result is similar to that described for anatoxin-a (Andrinolo & Sedan, 2015). Another main group of toxins, the most common intoxications involving cyanobacteria are hepatotoxins, which are slower in action, causing death between a few hours and a few days, due to intrahepatic hemorrhage and hypovolemic shock. The signs observed after ingesting these hepatotoxins are prostration, anorexia, vomiting, abdominal pain and diarrhea (Azevedo, 1998; Andrinolo & Sedan, 2015; Svirčev, et al., 2017). The species

already identified as producing these hepatotoxins are included in the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* and *Cylindrospermopsis* (Carmichael, 1994; Köker, et al., 2017; Kubickova, et al., 2019).

Another type is the saxitoxins (STXs), which are powerful neurotoxic alkaloids, manufactured by marine eukaryotic dinoflagellates and prokaryotic freshwater cyanobacteria. They constitute a notable example of toxins that are manufactured by organisms belonging to various kingdoms of life (Dittmann, et al., 2012). In freshwater conditions, STXs are mostly linked to the filamentous cyanobacteria of several genera, including *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Scytonema*, *Geitlerinema*, *Cylindrospermum* and *Phormidium* (Borges, et al., 2015).

Saxitoxin (STX) was the first analog to be identified (Schantz, 1975). Saxitoxin and its analogs (STXs) are composed of a 3,4-peridropurine tricyclic system and have two guanidinium groups. The STX molecule can be replaced in multiple positions (See Figure 3 - C).

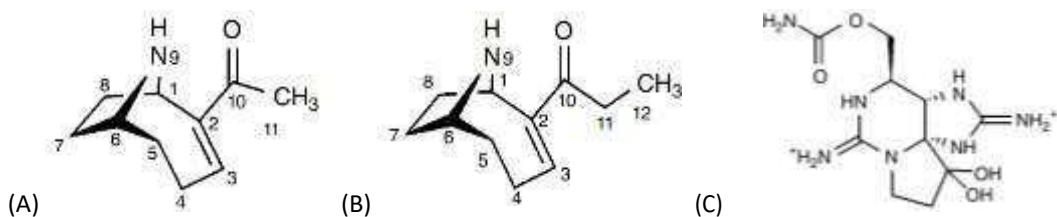
Currently, 57 STXs are described. Dependent about their chemical forms, STXs can be categorized into several groups, including carbamoyl toxins (C), descarbamoyl toxins (dc), N-sulfocarbamoyl toxins (G), gonyautoxins (GTX) and deoxycarbamoyl toxins (LW) (Wiese, et al., 2010; Meriluoto, et al., 2016).

STXs are powerful neurotoxins. They are blocking voltage-gated sodium ion channels in neuronal cells, working on the extracellular sides by interacting with a neurotoxin receptor referred to as site 1 (Nakagawa, et al., 2019). Recently, it was discovered that STX also binds to the potassium and calcium channels (Llewellyn, 2006; Catterall, 2015).

Consumption of STXs by humans is leading to the syndromes known as paralytic mollusk poisoning (PMP). In serious cases, PMP causes death from lung failure. From the marine environment, about 2,000 cases of human poisoning from shellfish and fish use are reported annually with a mortality rate of roughly 15%. An antidote or detox route is still not clear (Meriluoto, et al., 2016).

STXs accumulate in all aquatic food webs in marine environments. Usual vectors for STXs are filter mollusks like mussels and oysters, but are also transported by non-traditional vectors such as fish, crabs or snails to the terrestrial biota, including human beings, is caused by case PMP (Deeds, 2008).

Figure 3: Structural formula of Neurotoxins: A - Anatoxin-a; B- Anatoxin-a (S) and C- Saxitoxin.



Source: Meriluoto (2007).

4. Cyanotoxins And Health

The increase in the population of cyanobacteria when it occurs in aquatic communities, is called flowering. The consequence is that higher concentrations of toxic cyanobacteria are responsible for producing high concentrations of cyanotoxins that can induce and mediate the death of fish and other animals, including man, through the consumption of contaminated water or organisms. Therefore, the study of cyanotoxins is important for public health (Carmichael, 1994; Melaram, 2020).

These toxins, when present in water used for domestic supply, fishing or leisure, can reach human populations and cause adverse effects such as gastroenteritis, hepato-enteritis and other diseases of the liver and kidney, cancer, skin irritations, allergies, conjunctivitis, problems with vision, muscle weakness, breathing problems, choking, convulsions and death, depending on the type of toxin, concentration and contact route. (Carmichael, 1994; Huisman, et al., 2018; Melaram, 2020) (See Table 2).

In recent years, cyanotoxins have been the subject of many studies, because they are soluble in water and pass through the conventional system that use common treatment adsorbents and, therefore, this type of treatment is unlikely to provide an efficient elimination of cyanotoxins. It is commonly understood that in most species, most toxins remain within healthy cells and are only released in lysis, which can be a consequence of natural senescence, changes in environmental conditions or during corrective practices, such as the use of algacide in the process treatment (Teixeira, et al., 2020).

Many countries have defined their health recommendations according to the provisional guidance of the World Health Organization, which was set at 1.0 µg / L for microcystin-LR (Jang, et al., 2003). Therefore, the main concern with cyanotoxins is related to the presence of these toxins in reservoirs destined for public supply (Wood, 2016; Abbas, et al., 2020).

Human exposure and possible cyanotoxin poisoning are causally related to cyanobacterial cell proliferation and lysis. So, intoxication can occur in different ways: when drinking contaminated water, during the recreational use of water, especially in the presence of blooms, through contact with the skin and also when drinking water unintentionally; inhaling aerosol particles, potentially possible during showers, when playing water sports; consumption of exposed food and by hemodialysis, if the water is not treated properly (Carmichael & Boyer, 2016; Huisman, et al., 2018).

Thus, cyanotoxins can have a toxic effect on humans and other animals, even in small concentrations. Among the most known types of toxins, they can be classified according to their mechanism of action into hepatotoxic, which are microcystins and nodularins; neurotoxic, represented by anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a (s) and a large group called saxitoxins; cytotoxic, cylindrospermopsin; and dermatotoxins, which are lipopolysaccharide toxins, common to several species of cyanobacteria. There are still other toxins not common: aplysiatoxin, debromoaplysiatoxin and lyngbiatoxin-a, with distinct actions, such as dermatotoxic, tumor-promoting and gastric irritants, but not yet fully elucidated (Malik, et al., 2020).

Table 2: Cyanotoxins, genera and symptoms after exposure.

Toxin	Producing Bodies	Symptoms of acute exposure	Referências
Microcystins	<i>Anabaenopsis, Anabaena, Aphanizomenon, Aphanocapsa, Arthrospira, Fischerella, Gloeotrichia, Hapalosiphon, Merismopedia, Microcystis, Oscillatoria, Pleurocapsalean, Phormidium, Planktothrix, Radiocystis, Synechococcus, Snowella, Synechocystis, Woronichinia</i>	Prostration, pilo erection, anorexia, nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhea, renal damage; hepatotoxic, tumour promoters, hypovolemic shock and intrahepatic hemorrhage. Death (in some cases)/immediate up to 24 h.	(Falconer et al., 1983; Rinehart et al., 1988; Turner et al. 1990; Lawton and Codd, 1991; Sivonen et al., 1991; Fawell et al., 1993; Yu, 1994; Yoshida et al., 1997; Jochimsen et al., 1998; Mahakhant et al., 1998; dos Vieira et al., 2003; Ballot, 2004; Botha et al., 2004; Ballot et al., 2005; Carey et al., 2007; Fiore et al., 2009; Chen et al., 2015; Spooof and Catherine, 2017).
Nodularins	<i>Nodularia Nostoc</i>	Prostration, pilo erection, anorexia, vomiting, abdominal pain, diarrhea, hypovolemic shock and intrahepatic hemorrhage. Hepatotoxic, tumour promoters; carcinogenic..	(Sivonen et al., 1989; Soong et al., 1992; Resson et al., 1994; Carmichael and Boyer, 2016; Spooof and Catherine, 2017).
Anatoxin – a	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Arthrospira, Cylindrospermum, Microcystis, Oscillatoria, Planktothrix, Raphidiopsis, Tychonema(bourrellyi).</i>	Progressive paralysis, strong abdominal breathing, cyanosis, convulsion, Tingling in fingers and toes; dizziness, convulsions; paralysis, muscle fasciculation, gasping death from asphyxiation. Death (in some cases)/ immediate up to 1–2 h.	(Lippy and Erb, 1976; Devlin et al., 1977; Carmichael and Gorham, 1981; Sykora and Keleti, 1981; Carmichael et al., 1985; Fawell and James, 1994; Fitzgeorge et al., 1994; Resson et al., 1994; Sivonen and Jones, 1999; Ballot, 2004; Ballot et al., 2005; Van Apeldoorn et al., 2007; Shams et al., 2015; Carmichael and Boyer, 2016).
Anatoxin-a (S)	<i>Anabaena lemmermannii, A. flos-aquae, A. spiroides.</i>	Progressive paralysis, muscle weakness, decreased respiratory rate, Hyper salivation, diarrhea, exaggerated abdominal breathing, cyanosis, convulsions. Death and survival time of 10–30 min.	(Dillenberg and Dehnel 1960; Mahmood and Carmichael, 1987; Matsunaga et al., 1989; Carmichael et al., 1990; El Saadi and Cameron 1993; Stewart, 2004; Van Apeldoorn et al., 2007; Aráoz et al., 2010).
Cylinderspermopsin	<i>Anabaena Aphanizomenon, Chrysoosporum, Cylindrospermopsis raciborskii, Lyngbya, Oscillatoria, Raphidiopsis, Sphaerospermopsis, Umezakia.</i>	Nausea, vomiting, bloody diarrhoea, kidney damage, headache, dehydration, convulsions, intense salivation. Death occurs from respiratory failure.	(Byth, 1980; Bourke et al., 1983; Hawkins et al., 1985; Ohtani et al., 1992; Li et al., 2001; Schembri et al., 2001; Svrcek and Smith, 2004; Spooof et al., 2006; Seifert et al., 2007).

Source: Authors.

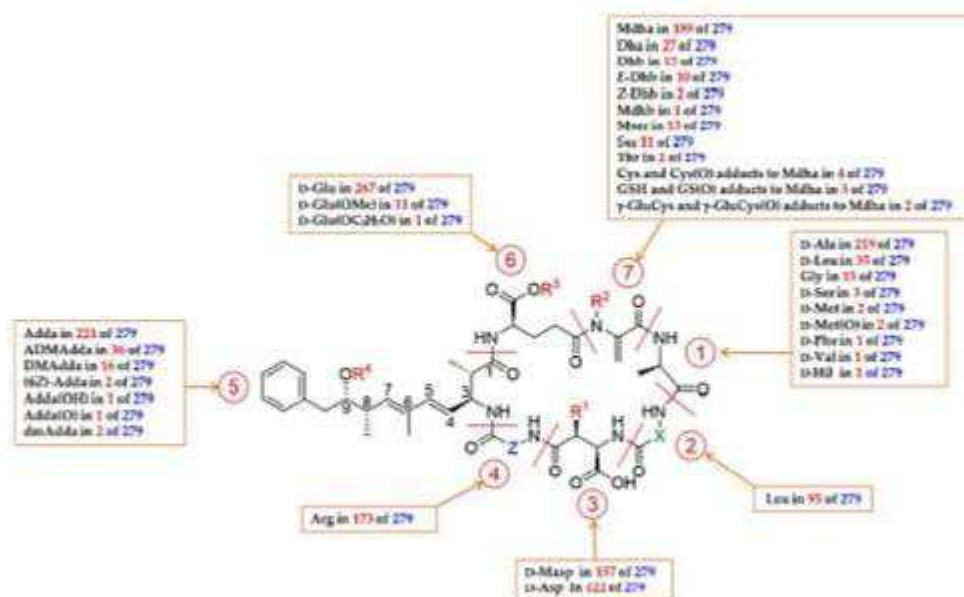
5. Microcystin And Oxidative Stress

Microcystins are hepatotoxins composed of a cyclic heptapeptide with more than 100 isoforms with different toxicities (Puddick, et al., 2014). Being produced by several genera of cyanobacteria, including *Microcystis* and *Anabaena* (Schreidah, et al., 2020). These toxins are considered to be very potent and widely distributed cyanotoxins, occurring worldwide. Microcystins have a strong affinity with serine / threonine protein phosphatases due to their cyclic heptapeptide structure, thus acting as potent inhibitors of the eukaryotic protein phosphatase families PP1 and PP2A, leading to cell apoptosis. Through this mechanism, microcystins induce oxidative stress in the cell. (Carmichael, 1994; Campos & Vasconcelos, 2010; Greer, et al., 2017).

Since microcystins are recognized for their ability to cause acute poisoning, which can lead vertebrate animals, including humans, to severe liver changes, causing damage and culminating in tissue failure (Carmichael, 1994; Svirčev, et al., 2017).

Microcystin-LR (MC-LR) is the most common and most toxic isoform (See Figure 4) among microcystins, with leucine and arginine in positions 2 and 4, respectively (Ding & Nam Ong., 2003). The lethal dose for 50% of the exposed individuals (LD50) for mice is quite low, approximately $60 \mu\text{g L}^{-1}$, therefore considered highly toxic (Jang, et al., 2003).

Figure 4: General structure of microcystins (MCs) and an overview of their structure, observing diversity. R1 = H or CH₃; R2= H or CH₃; R3 = H, CH₃ or C₃H₆OH; R4 = H, CH₃ or COCH₃; X and Z = variable L-amino acids.



Source: Bouaicha (2019).

One of the characteristics of microcystins is the presence of the β -amino acid Adda. This amino acid has the ability to increase the overall hydrophobicity of the microcystin molecule and another unsaturated amino acid, Mdha, acts as an additional receptor (Bouaicha, et al., 2019). Adda plays an important role in hepatotoxicity, since the removal or saturation of Adda dramatically reduces the toxicity of microcystin-LR.

Adda C-7 geometric isomers in microcystins -LR and RR proved to be essentially non-toxic, but the substitution of the Adda C-9 methoxy group with acetoxy or hydroxy groups has been studied and is not able to reduce toxicity (Harada, et al., 2004).

A biochemical characteristic of MC toxicity is the production of ROS. The generation of ROS has been reported in in vitro systems, in human liver cells (Nong, et al., 2007), in fish cells (Pichardo, et al., 2007), lymphocytes (Zhang, et al., 2008). And human erythrocytes (Sicińska, 2006), as well as in several in vivo studies in mice and rat liver, heart and reproductive system (Ding, et al., 2001; Weng, et al., 2007; Wei, et al., 2008; Li, et al., 2008; Qiu, et al., 2009).

The generation of ROS is intrinsically related to mitochondrial metabolism and can lead to cell death due to necrosis or apoptosis. Likewise, it is believed to be involved in a number of pathologies, such as impaired heart blood pumping function and diseases in the liver and kidneys. (Weng, et al., 2007; Wei, et al., 2008; Qiu, et al., 2009).

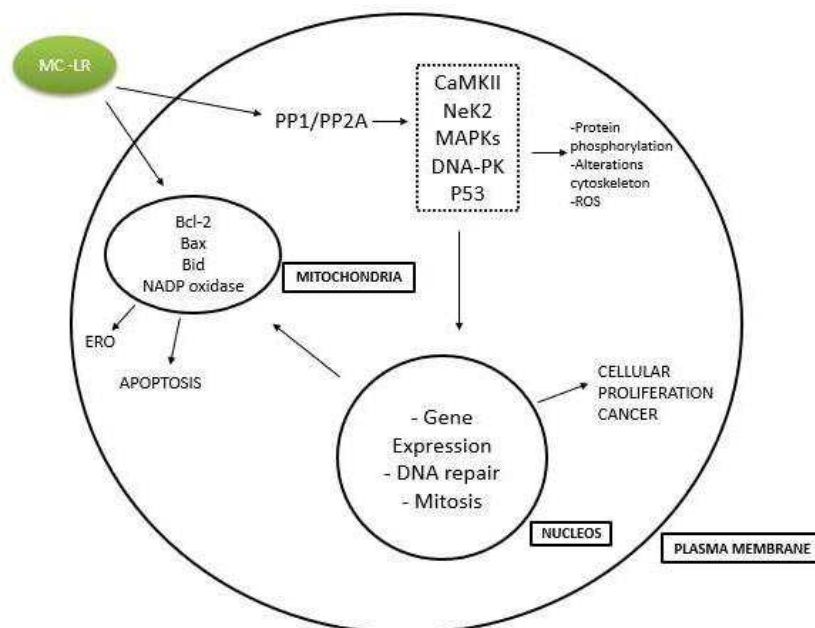
The mechanisms of ROS production mediated by MC and cell injury are poorly understood (Wei, et al., 2008). Studies have reported for the first time the increase in Ca^{2+} in the mitochondria of rat hepatocytes in culture, as the first event that precedes apoptosis induced by MC-LR (Ding & Ong, 2001).

After the beginning of the permeability of the carrier membrane, three important cellular events may occur (i) elevation of the ROS formation, (ii) loss of the mitochondrial membrane (MMP) potential and (iii) release of mitochondrial apoptotic factors, such as cytochrome c, triggering the execution of apoptosis (Lemasters, et al., 1998).

Another plausible mechanism for the generation of ROS is the increase in the activity of NADPH oxidase. Thus, positive regulation of CYP2E1 mRNA, an isoform of cytochrome P450 that exhibits NADPH oxidase activity, concomitant with oxidative stress in HepG2 cells induced by MC-LR, was verified. In addition, other molecules have been reported to be related to MC-LR-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress (Nong, et al 2007).

The pro-apoptotic proteins of the BCL-2 family, including Bax and Bak, normally act on the mitochondrial membrane to promote the permeabilization and release of cytochrome C and ROS, important signals in the cascade of the apoptosis mechanism. Thus studies indicate that the pro-apoptotic proteins Bax and Bid were positively regulated in hepatocytes in vivo of mouse liver after oxidative stress induced by MC-LR. This positive regulation of proteins was concomitant with the loss of mitochondrial membrane potential and cell apoptosis. Pro-apoptotic proteins are known to associate to create pores in the mitochondrial membrane, therefore, capable of inducing permeabilization of the outer membrane. In addition to Ca^{2+} and CYP2E1 (membrane protein expressed at high levels in the liver), these proteins are important in oxidative stress induced by MC-LR and cellular apoptosis (Campos & Vasconcelos, 2010). (See Figure 5).

Figure 5: Suggested pathways for MC absorption, toxicity, biotransformation and excretion in animal cells.



Source: Campos and Vasconcelos (2010 - Adapted).

Likewise, Wei et al., 2008 found that the activation of the JNK protein affects some crucial enzymes of energy metabolism and leads to MC-LR-induced mitochondrial dysfunction. MC-LR has also been shown to interact directly with isolated rat kidney mitochondria. The toxin led to a strong decrease in the transmembrane potential as a result of the inhibition of redox complexes (Zareba, et al., 2007).

Microcystins can also increase oxidative stress by changing the antioxidant concentrations. It is known that reduced glutathione (GSH) is the main intracellular antioxidant with various biological purposes. GSH can participate as an indirect antioxidant or directly. In the first instance, GSH serves as a substrate for GSH peroxidase to minimize hydrogen peroxide. Additionally, GSH acts directly as a free radical hunter to react with OH, HOCl, peroxinitrito, ER and carbon-centered radicals. Therefore, the depletion of GSH often accompanies the generation of ROSs (Halliwell & Gutteridge, 1989).

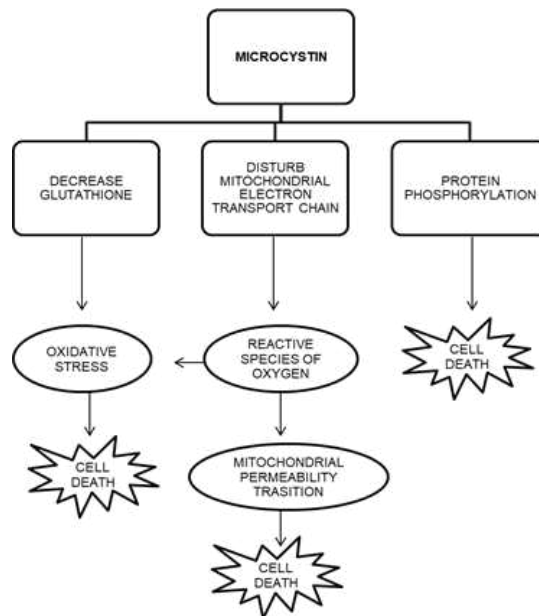
In the second situation, GSH can be combined with xenobiotics and plays a significant role in the metabolic pathway that leads to detoxification. Cellular GSH are also known to be important for the regulation of the cytoskeleton organization. Disturbance of cellular redox status by depletion of intracellular GSH has been shown to interrupt microfilament structures in human fibroblasts (Kletsas, et al., 1998). Cellular GSH was also found to be rapidly depleted within 30 minutes of exposure to microcystin (Runnegar, et al., 1987). Preprocessing of mice with GSH shielded from the lethality of microcystin (Hermansky, et al., 1991).

It was later shown that microcystin can conjugate solution with GSH and cysteine in cell-systems that and below in vivo circumstances through the Mdha portion of the microcystins (Kondo, et al., 1992). This conjugation reaction can occur under enzymatic activity by glutathione S-transferase (GST) (Pflugmacher, et al, 1998). In line with the observation above, it is also possible to verify that there has been an early reduction in intracellular GSH amounts following exposure to microcystin in cultured rat hepatocytes. Astoundingly, the GSH level increased significantly later, possibly due to the cell's identity-protection mechanisms. A precursor of GSH, significantly increased intracellular levels of GSH and decreased cytotoxicity induced by microcystin,

and changes in the cytoskeleton. In contrast, butionin-sulfoximine (BSO), a specific inhibitor of GSH synthesis, improved cellular susceptibility to microcystin-induced cytotoxicity and cytoskeletal changes (Ding, et al., 2000). Consequently, all the evidence above suggests that GSH plays a crucial role in detoxifying cyanobacterial toxins.

Thus, the proliferation of cyanobacteria poses a serious threat to the aquatic environment. Because microcystin may be causing cell death for at least three routes. First, microcystin can change the antioxidant balance through early depletion of GSH, subsequently intracellular oxidative stress and oxidative injury and cell death. Second, microcystin can disrupt mitochondrial ETC, followed by ROS production and membrane permeabilization. After membrane permeabilization, mitochondrial cytochrome c and Ca²⁺ are released. Then, calpain and Ca²⁺-dependent protein kinase II + calmodulin are activated, which ultimately leads to cell death. Third, microcystin causes cell protein phosphorylation and leads to cell death in a less explicit mechanism. (See Figure 6).

Figure 6: A proposed model of cell events induced by microcystin.



Source: Ding and Ond (2003-Adaptad).

As shown in the image above, it is possible to understand that when the production of free radicals exceeds the antioxidant defense capacity of organisms, there is an imbalance between the production of reactive species and the biological system in its ability to immediately detoxify reactive oxygen intermediates or repair the resulting damage, which can cause toxic effects through the production of peroxides and free radicals that damage all components of the cell, including proteins, lipids and DNA.

Due to the relevance of oxidative stress in the toxicity of MC, antioxidant compounds can be considered in the prevention of animals exposed to the toxin. The compounds have been shown to extinguish free radicals, decrease oxidative stress and reduce histological damage to organisms exposed to MC (Prieto, et al., 2008).

6. Conclusion

MC are potent hepatotoxins with genotoxic properties. They are strong inhibitors of the serine / threonine phosphatases PP1 and PP2A. This is probably the main mechanism of action of these toxins through which it alters cellular metabolism and triggers a cascade of events that lead to necrosis or apoptosis of animal cells. MC regulates the activity of protein kinases by directly inhibiting PP1 and PP2A. This can have a strong impact on the activity of phosphoproteins, DNA repair systems and gene expression. On the other hand, the cyclic peptide appears to interact with the mitochondria of animal cells, triggering oxidative stress and apoptosis. In addition, the molecule can be inactivated in cells in a process that involves conjugation with glutathione. MC toxicity is a multi-path process and, regardless of recent achievements, the molecular mechanisms underlying MC toxicity remain elusive and a lack of knowledge persists regarding specific interaction proteins and the target of MC with the signaling pathways that trigger the cell response and the toxicity pathways of the cell injury.

Therefore, it is necessary to further study able to bring more information related to the capacity of microcystin generate cellular oxidative damage.

References

- Abbas, T., Kajjumba, G. W., Ejjada, M., Masrura, S. U., Marti, E. J., Khan, E., & Jones-lepp, T. L. (2020). Recent advancements in the removal of cyanotoxins from water using conventional and modified adsorbents—a contemporary review. *Water (Switzerland)*, *12*(10). <https://doi.org/10.3390/w12102756>
- Andrinolo, D., & Sedan, D. (2015). Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas Cyindrospermopsinas , Lipopolisacáridos. *Cianobacterias Como Determinantes Ambientales de La Salud*, 49–66.
- Andrinolo, D., Sedan, D., Telese, L., Aura, C., Masera, S., Giannuzzi, L., Marra, C. A., & de Alaniz, M. J. T. (2008). Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. *Toxicon*, *51*(3), 457–467. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.012>
- Aráoz R, Molgó J, & Tandeau de Marsac N (2010) Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56:813–828
- Azevedo, S. M. F. O. (1998). Toxinas de cianobactérias : causas e conseqüências para a saúde pública. *Med On Line*, *1*, 1–16.
- Ballot, A. (2004) Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya-Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *J Plankton Res* 26:925–935. <https://doi.org/10.1093/plank t/fbh084>
- Ballot, A, Krienitz, L, Kotut, K, Wiegand, C, & Pflugmacher, S (2005) Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4:139–150. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.01.001>
- Borges, H. L. F., Branco, L. H. Z., Martins, M. D., Lima, C. S., Barbosa, P. T., Lira, G. A. S. T., Bittencourt-Oliveira, M. C., & Molica, R. J. R. (2015). Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil. *Harmful Algae*, *43*, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.01.003>
- Botha, N., Gehringer, M. M., Downing, T. G., van de Venter, M., & Shephard, E G. (2004) The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCO₂ cells. *Toxicon* 43:85–92

- Bouaïcha, N., Miles, C. O., Beach, D. G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N. Y., & Nguyen-Quang, T. (2019). Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins*, *11*(12), 1–40. <https://doi.org/10.3390/toxins11120714>
- Bourke, A. T. C., Hawes, R. B., Neilson, A., & Stallman, N D. (1983) An outbreak ofhepato-enteritis (the Palm Island mysterious disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon Suppl*3:45-48.
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, *91*(3), 1049–1130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
- Byth S (1980) Palm Island mystery disease. *Med J Aust* 2:40-42.
- Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(1), 268–287. <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>
- Cardona, T., Sánchez-Baracaldo, P., Rutherford, A. W., & Larkum, A. W. (2019). Early Archean origin of Photosystem II. *Geobiology*, *17*(2), 127–150. <https://doi.org/10.1111/gbi.12322>
- Carey, C. C., Haney, J. F., & Cottingham, K. L. (2007) First report of microcystin-LR in the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. *Environ Toxicol* 22:337–339. <https://doi.org/10.1002/tox.20245>
- Carmichael, W. W., Gorham, P. R. (1981) The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: Carmichael WW (ed) *The Water Environment: Algal Toxins and Health*. Plenum Press, New York, pp 161-172.
- Carmichael, W. W., Jones, C. L. A., Mahmood, N. A., & Theiss, W. C. (1985) Algal toxins and waterbased diseases. *CRC Crit Rev Environ Control*15(3):275-303.
- Carmichael, W. W., Mahmood, N. A., & Hyde, E. G. (1990) Natural toxins from cyanobacteria (blue-green) algae. In: Hall S, Strichartz G (eds) *Marine Toxins: Origins, Structure and Molecular Pharmacology*. American Chemical Society, 87- 106.
- Carmichael, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, *270*(1), 78–86. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0194-78>
- Carmichael, W. W., & Boyer, G. L. (2016). Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae*, *54*(April), 194–212. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.002>
- Carmichael, W. W., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Sugauma, M., Nishiwaki, R., & Fujiki, H. (1994). Nodularin, a Potent Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A, Is a New Environmental Carcinogen in Male F344 Rat Liver. *Cancer Research*, *54*(24), 6402–6406.
- Carpenter, S. R. (2005). Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(29), 10002–10005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503959102>
- Catterall, W. A. (2015). Finding channels. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(47), 28357–28373. <https://doi.org/10.1074/jbc.X115.683383>
- Chen, L, Chen J, Zhang X, & Xie P (2015) A review of reproductive toxicity of microcystins. *J Hazard Mater* 301:381–399
- Chen, M., & Blatchley, E. R. (2020). Chlorine/UV treatment of anatoxin-a by activation of the secondary amine functional group. *Environmental Science: Water Research and Technology*, *6*(5), 1412–1420. <https://doi.org/10.1039/c9ew01112a>
- Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J., & Bartram, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, *3*(4), 323–347. <https://doi.org/10.1080/109374000436364>

- Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J., & Bartram, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 3(4), 323–347. <https://doi.org/10.1080/109374000436364>
- Deeds, J. R. (2008). Non-Traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning. *Marine Drugs*, 6(2), 308–348. <https://doi.org/10.3390/md20080015>
- Devlin, J. P., Edwards, O. E., Gorham, P. R., Hunter, N. R., Pike, R. K., & Stavric, B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Canadian Journal of Chemistry*, 55(8), 1367–1371. <https://doi.org/10.1139/v77-189>
- Dhanam, S., Sathya, A., & Elayaraj, B. (2016). Study of physico-chemical parameters and phytoplankton diversity of Ousteri lake in Puducherry. *World Scientific News*, 54, 153–164.
- Dillenberg, H. O., & Dehne! M. K. (1960) Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can Med Assoc J* 83:1151-1154.
- Ding, W. X., Shen, H. M., & Ong, C. N. (2000). Microcystin cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 108(7), 605–609. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108605>
- Ding, W. X., Shen, H. M., & Ong, C. N. (2001). Pivotal role of mitochondrial Ca²⁺ in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(5), 1155–1161. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5309>
- Ding, W.-X., & Nam Ong, C. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 220(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00100-9)
- Dittmann, E., Fewer, D. P., & Neilan, B. A. (2012). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12000>
- dos Vieira, J. M. S., de P Azevedo, M. T., de Oliveira Azevedo, S. M. F., Honda, R. Y., Corrêa, B. (2003) Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (*Chroococcales*, *Cyanobacteria*) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 42:709–713
- El Saadi, & Cameron, A. S. (1993) Illness associated with blue-green algae. *Med J Aust* 158:792-793.
- Evans, D. M., Hughes, J., Jones, L. F., Murphy, P. J., Falfushynska, H., Horyn, O., Sokolova, I. M., Christensen, J., Coles, S. J., & Rzymiski, P. (2019). Elucidating cylindrospermopsin toxicity via synthetic analogues: An in vitro approach. *Chemosphere*, 234, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.021>
- Falconer, I. R., Beresford, A. M., & Runnegar, M. T. C. (1983). Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Medical Journal of Australia*, 1(11), 511–514. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1983.tb136192.x>
- Fawell, J. K., James, .C P., & James, H. A. (1993) Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water Foundation for Water Research, Marlow, Bucks.
- Feng, G., Abdalla, M., Li, Y., & Bai, Y. (2011). NF-κB mediates the induction of Fas receptor and Fas ligand by microcystin-LR in HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 352(1–2), 209–219. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0756-y>
- Fiore, M. F., Genuário, D. B., da Silva, C. S. P., Shishido, T. K., Moraes, L. A. B., Cantúcio Neto, R., & Silva-Stenico, M. E. (2009) Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. *Toxicon* 53(7–8):754–761. <https://doi.org/10.1016/j.toxic.2009.02.010>
- Fitzgeorge, R. B., Clark, S. A., Keevil, C. W. (1994) Routes of intoxication. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter C (eds) *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. Royal Society of Chemistry, London, pp 69-74.

Fu, W. Y., Chen, J. P., Wang, X. M., & Xu, L. H. (2005). Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. *Toxicol*, 46(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2005.03.021>

Greer, B., Maul, R., Campbell, K., & Elliott, C. T. (2017). Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(16), 4057–4069. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0352-4>

Gupta, N., Pant, S. C., Vijayaraghavan, R., & Rao, P. V. L. (2003). Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants(LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188(2–3), 285–296. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00112-4)

Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., & Cameán, A. M. (2011). Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquatic Toxicology*, 105(1–2), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.015>

Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Jos, Á., & María Cameán, A. (2011). Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1567–1572. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.030>

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, second ed. Clarendon Press, Oxford

Harada, K. I., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., & Tsuji, K. (2004). Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicol*, 44(1), 107–109. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.04.003>

Hawkins, P. R., Runneger, M. T. C., Jackson, A. R. B., Falconer, I. R (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindromopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol*50(50): 1292- 1295.

Hermansky, S. J., Stohs, S. J., Eldeen, Z. M., Roche, V. F., & Mereish, K. A. (1991). Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 11(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/jat.2550110112>

Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471–483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

Humpage, A. R., & Falconer, I. R. (2003). Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*, 18(2), 94–103. <https://doi.org/10.1002/tox.10104>

li, C. (2012). Ecology of Cyanobacteria II. *Ecology of Cyanobacteria II*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>

Jang, M. H., Ha, K., Joo, G. J., & Takamura, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. In *Freshwater Biology*

(Vol. 48, Issue 9). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x>

Janssen, E. M. L. (2019). Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, 151, 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>

Ji, Y., Lu, G., Chen, G., Huang, B., Zhang, X., Shen, K., & Wu, S. (2011). Microcystin-LR induces apoptosis via NF-κB /iNOS pathway in INS-1 cells.

International Journal of Molecular Sciences, 12(7), 4722–4734. <https://doi.org/10.3390/ijms12074722>

Jochimsen E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, M. B. de C., Filho de, M. D. A., Lyra, T. M., Barreto,

V. S.T., Azevedo, S. M.F.O, & Jarvis W. R (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis centre in Brazil. *N Eng J Med* 338(13):873-878.

Kinnear, S. (2010). Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research. *Marine Drugs*, 8(3), 542–564. <https://doi.org/10.3390/md8030542>

Kletsas, D., Barbieri, D., Stathakos, D., Botti, B., Bergamini, S., Tomasi, A., Monti, D., Malorni, W., & Franceschi, C. (1998). The highly reducing sugar 2- deoxy-D-ribose induces apoptosis in human fibroblasts by reduced glutathione depletion and cytoskeletal disruption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(2), 416–425. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7975>

Köker, L., Akçaalan, R., Albay, M., & Neilan, B. A. (2017). Molecular detection of hepatotoxic cyanobacteria in inland water bodies of the Marmara region, Turkey. *Advances in Oceanography and Limnology*, 8(1), 52–60. <https://doi.org/10.4081/aiol.2017.6394>

Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K. ichi, Matsuura, K., Murata, H., & Suzuki, M. (1992). Formation, Characterization, and Toxicity of the Glutathione and Cysteine Conjugates of Toxic Heptapeptide Microcystins. *Chemical Research in Toxicology*, 5(5), 591–596. <https://doi.org/10.1021/tx00029a002>

Kubickova, B., Babica, P., Hilscherová, K., & Šindlerová, L. (2019). Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>

Lawton, L. A., & Codd, G. A. (1991). Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Waters. *Water and Environment Journal*, 5(4), 460–465. <https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.1991.tb00643.x>

Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366(1–2), 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00112-1)

Li, R., Carmichael, W. W., Brittain, S., Eaglesham, G. K., Shaw, G. R., Watanabe, M. M. (2001) First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *J Phycol* 37:1121–1126

Li, Y., Sheng, J., Sha, J., & Han, X. D. (2008). The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats in vivo and in vitro. *Reproductive Toxicology*, 26(3–4), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.09.004>

Lippy E. C, & Erb J (1976) Gastrointestinal illness at Sewickley, Pa. *J Am Water Works Assoc* 68:606-610.

Llewellyn, L. E. (2006). Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports*, 23(2), 200–222. <https://doi.org/10.1039/b501296c>

Ma, J., Feng, Y., Jiang, S., & Li, X. (2017). Altered cellular metabolism of HepG2 cells caused by microcystin-LR. *Environmental Pollution*, 225, 610–619. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.029>

MacKintosh, R. W., Dalby, K. N., Campbell, D. G., Cohen, P. T. W., Cohen, P., & MacKintosh, C. (1995). The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Letters*, 371(3), 236–240. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00888-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00888-G)

Mahakhant A, Sano T, Ratanachot P, Tong-a-ram T, Srivastava VC, Watanabe MM, Kaya K (1998) Detection of microcystins from cyanobacterial water blooms in Thailand fresh water. *Psychol Res* 42(s2):25–29. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.1998.00119.x>

Mahmood W. A, Carmichael W. W (1987) Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25(11): 1211-1227.

Malik, J. K., Bharti, V. K., Rahal, A., Kumar, D., & Gupta, R. C. (2020). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819090-6.00031-3>

Matsunaga S, Moore R. E, Niemczura W. P, Carmichael W. W (1989) Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J Am Chem Soc* 111:8021- 8023.

Melaram, R. (2020). *Journal of Earth and Environmental Microcystin Exposure Pathways and Human Health*. October.

Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. A. (2016). In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. <https://doi.org/10.1002/9781119068761>. Metcalf, J. S., & Codd, G. A. (2020). Co-occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins with other environmental health hazards: Impacts and implications. *Toxins*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/toxins12100629>

Mohamed, Z., Ahmed, Z., Bakr, A., Hashem, M., & Alamri, S. (2020). Detection of free and bound microcystins in tilapia fish from Egyptian fishpond farms and its related public health risk assessment. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 15(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00003-019- 01254-0>

Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A., & Vasconcelos, V. (2013). Cylindrospermopsin: Occurrence, methods of detection and toxicology. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 605–620. <https://doi.org/10.1111/jam.12048>

Nakagawa, H., Munakata, T., & Sunami, A. (2019). Mexiletine block of voltage-gated sodium channels: Isoform- And state-dependent drug-pore interactions.

Molecular Pharmacology, 95(3), 236–244. <https://doi.org/10.1124/mol.118.114025>

Nong, Q., Komatsu, M., Izumo, K., Indo, H. P., Xu, B., Aoyama, K., Majima, H. J., Horiuchi, M., Morimoto, K., & Takeuchi, T. (2007). Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free Radical Research*, 41(12), 1326–1337. <https://doi.org/10.1080/10715760701704599>

Norris, R. L. G., Seawright, A. A., Shaw, G. R., Senogles, P., Eaglesham, G. K., Smith, M. J., Chiswell, R. K., & Moore, M. R. (2002). Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Toxicon*, 40(4), 471–476. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00243-4)

Ohtani I, Moore R. E (1992) Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114:7941- 7942.

Pai, M. Systematic reviews and meta-analyses: an illustrated step-by-step guide. *The National Medical Journal of India*, 17, 86-95.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. In *Marine Drugs* (Vol. 8, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/md8051650>

Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K. A., Krause, E., Codd, G. A., & Steinberg, C. E. W. (1998). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1425(3), 527–533. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00107-X)

Pichardo, S., Jos, A., Zurita, J. L., Salguero, M., Cameán, A. M., & Repetto, G. (2007). Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1460–1467. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.012>

Prieto, A. I., Jos, Á., Pichardo, S., Moreno, I., & Cameán, A. M. (2008). Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(5), 1152–1159. <https://doi.org/10.1897/07-496.1>

Puddick, J., Prinsep, M. R., Wood, S. A., Kaufononga, S. A. F., Cary, S. C., & Hamilton, D. P. (2014). High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Marine Drugs*, *12*(11), 5372–5395. <https://doi.org/10.3390/md12115372>

Qiu, T., Xie, P., Liu, Y., Li, G., Xiong, Q., Hao, L., & Li, H. (2009). The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. *Toxicology*, *257*(1–2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.012>

Rastogi, R. P., Sinha, R. P., & Incharoensakdi, A. (2014). The cyanotoxin-microcystins: Current overview. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 215–249). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9334-6>

Ressom R, Soong F. S, Fitzgerald J, Turczynowicz L, El Saadi, Roder D, Maynard T, & Falconer I (1994) Health Effects of Toxic Cyanobacterial (Blue-Green Algae) National Health and Medical Research Council (NHMRC), Australia, Canberra.

Rinehart, K. L., Harada, K. I., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C. A., Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Mulligan, P. E., Beasley, V. R., Dahlem, A. M., & Carmichael, W. W. (1988). Nodularin, Microcystin, and the Configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society*, *110*(25), 8557–8558. <https://doi.org/10.1021/ja00233a049>

Runnegar, M. T. C., Andrews, J., Gerdes, R. G., & Falconer, I. R. (1987). Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, *25*(11), 1235–1239. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90142-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90142-5)

Runnegar, M. T., Xie, C., Snider, B. B., Wallace, G. A., Weinreb, S. M., & Kuhlkamp, J. (2002). In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicological Sciences*, *67*(1), 81–87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.1.81>

Schantz, E. J., Ghazarossian, V. E., Schnoes, H. K., Strong, F. M., Spinger, J. P., Pezzanite, J. O., & Clardy, J. (1975). The Structure of Saxitoxin. *Journal of the American Chemical Society*, *97*(5), 1238–1239. <https://doi.org/10.1021/ja00838a045>

Schembri M. A, Neilan B. A., & Saint C. P (2001) Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Tox* 16:413–421

Schreidah, C. M., Ratnayake, K., Senarath, K., & Karunarathne, A. (2020). Microcystins: Biogenesis, Toxicity, Analysis, and Control. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 33, Issue 9). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00164>

Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, & Shaw G (2007) First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 6:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.07.001>

[://doi.org/10.1016/j.hal.2006.07.001](https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.07.001)

Shams S, Capelli C, Cerasino L, & Ballot A (2015) Anatoxin-a producing *Tychonema* (cyanobacteria) in European waterbodies. *Water Res* 69:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.006>

[://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.006)

Sicińska, P., Bukowska, B., Michałowicz, J., & Duda, W. (2006). Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon*, *47*(4), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.006>

Sivonen K, Carmichael W. W, Namikoshi M, Rinehart K. L, Dahlem A. M, & Niemela S. I (1991) Isolation and characterization of heptatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Appl Environ Microbiol* 56:2650-2657.

Sivonen K, Himberg K, Luukkainen R, Niemela S. I, Poon G. K, & Codd G. A (1989) Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxic Assess* 4:339-352.

- Sivonen K, & Jones G (1999) Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (eds) Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management. E&FN Spon, London, pp 41–111
- Soong F. S, Maynard E, Kirke K, & Luke C (1992) Illness associated with blue-green algae. *Med J Aust* 156(1):67.
- Sotton, B., Guillard, J., Bony, S., Devaux, A., Domaizon, I., Givaudan, N., Crespeau, F., Huet, H., & Anneville, O. (2012). Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*): Experimental Study and In Situ Observations in a Peri-Alpine Lake. *PLoS ONE*, 7(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052243>
- Spoof L, Berg K. A, Rapala J, Lahti K, Lepisto L, Metcalf J. S, Codd G. A, & Meriluoto J (2006) First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol* 21(6):552–560
- Spoof L, & Catherine A (2017) Appendices 3. Tables of microcystins and nodularins. In: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (eds) Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Section VIII, Wiley publisher. ISBN: 978-1-119-06868-6
- Stevens, D. K., & Krieger, R. I. (1991). Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid saxitoxin-A. *Toxicon*, 29(2), 167–179. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90101-V](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90101-V)
- Stewart I (2004) Recreational exposure to freshwater cyanobacteria: epidemiology, dermal toxicity and biological activity of cyanobacteria lipopolysaccharides. Ph.D. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Queensland, pp 1–418.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G. A., & Meriluoto, J. (2017). Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Archives of Toxicology*, 91(2), 621–650. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>
- Svrcek C, & Smith D. W (2004) Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J Environ Eng Sci* 3:155–185
- Sykora J. L, & Keleti G (1981) Cyanobacteria and endotoxins in drinking water supplies. In: The Water Environment: Algal Toxins and Health. Plenum Press, New York, pp 285- 302.
- Szlag, D. C., Sinclair, J. L., Southwell, B., & Westrick, J. A. (2015). Cyanobacteria and cyanotoxins occurrence and removal from five high-risk conventional treatment drinking water plants. *Toxins*, 7(6), 2198–2220. <https://doi.org/10.3390/toxins7062198>
- Takai, A., Eto, M., Hirano, K., Takeya, K., Wakimoto, T., & Watanabe, M. (2018). Protein phosphatases 1 and 2A and their naturally occurring inhibitors: current topics in smooth muscle physiology and chemical biology. *Journal of Physiological Sciences*, 68(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0556-6>
- Teixeira, M. R., Rosa, M. J., Sorlini, S., Biasibetti, M., Christophoridis, C., & Edwards, C. (2020). Removal of Cyanobacteria and Cyanotoxins by Conventional Physical-chemical Treatment. *Water Treatment for Purification from Cyanobacteria and Cyanotoxins*, 69–97. <https://doi.org/10.1002/9781118928677.ch3>
- Teneva, I., Klaczewska, D., Batsalova, T., Kostova, Z., & Dzhambazov, B. (2016). Influence of captopril on the cellular uptake and toxic potential of microcystin-LR in non-hepatic adhesive cell lines. *Toxicon*, 111, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.006>
- Turner P. C, Gammie A. J, Hollinrake K, & Codd G. A (1990) Pneumonia associated with Cyanobacteria. *Br Med J* 300: 1440-1441
- Van Apeldoorn M. E, van Egmond H. P, Speijers G. J. A., & Bakker G. J. I. (2007) Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 51:7–60

- Wei, Y., Weng, D., Li, F., Zou, X., Young, D. O., Ji, J., & Shen, P. (2008). Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis*, 13(8), 1031–1042. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0237-2>
- Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., & Shen, P. (2007). The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*, 232(1–2), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.12.010>
- Wiese, M., D'Agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, 8(7), 2185–2211. <https://doi.org/10.3390/md8072185>
- Wimmer, K. M., Strangman, W. K., & Wright, J. L. C. (2014). 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 37, 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.006>
- Wood, R. (2016). Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. *Environment International*, 91, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026>
- Yan, M., Shen, G., Zhou, Y., Meng, X., & Han, X. (2020). The role of ERK-RSK signaling in the proliferation of intrahepatic biliary epithelial cells exposed to microcystin-leucine arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(2), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.143>
- Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, Tamura S. I, & Ueno Y (1997) Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Nat Toxins* 5:91-95.
- Yu, S. H (1994) Blue-green algae and liver cancer, In: Steffensen D A, & Nicholson B. C (eds) *Toxic Cyanobacteria, Current Status of Research and Management: International Workshop, 22-26 March 1994, Adelaide, SA. Proceedings, Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research, Salisbury, SA, 22-26.*
- Zareba, G., Cernichiari, E., Hojo, R., Nitt, S. M., Weiss, B., Mumtaz, M. M., Jones, D. E., Clarkson, T. W., & Dennis. (2007). Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: *Journal of Applied Toxicology*, 27(July), 511–518. <https://doi.org/10.1002/jat>
- Žegura, B., Štraser, A., & Filipič, M. (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 727(1–2), 16–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.01.002>
- Zhang, H., Zhang, J., Chen, Y., & Zhu, Y. (2008). Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(4), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9189-7>

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *TURNERA SUBULATA* (Chanana) COMPARADO A *HARPAGOHYTUM PROCUMBENS* (Garra do diabo) NO COMBATE AO ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO

A *Turnera subulata* é uma planta medicinal substancial usada na medicina popular para tratar várias doenças, mas pouco conhecida no meio científico. No entanto a *Harpagophytum procumbens* já é bastante estudada. O presente estudo teve como objetivo avaliar os teores de fenólicos, flavonoides e antocianinas a fim de verificar a capacidade antioxidante e a atividade anti-inflamatória (*in vitro*) das amostras de plantas de *T. subulata* e *H. procumbens* extraídas em diferentes técnicas com solvente aquoso. Os resultados obtidos revelaram que o teor de fenólicos totais de *T. subulata* nas diferentes técnicas (soxhlet = 135,7 ±0,1; ultrassom= 123,8 ±2,5 e evaporador rotativo= 131,0 ±0,1 mg/g) foram sugestivamente superiores aos demais extratos. Uma forte propriedade antioxidante foi observada para os extratos de *T. subulata*. A capacidade antioxidante total obteve uma correlação positiva com o teor de antocianinas para *T. subulata* ($R^2=0,9541$, $p=0,0000$). O estudo de atividade anti-inflamatória foi observado em extratos para ensaio de desnaturação de proteínas (*in vitro*) os extratos exibiram um melhor potencial antidesnaturante para *T. subulata* (Soxhlet=66,2±0,1; Ultrassom= 65,9±0,9 rotaevaporador=53,6±1,5 µg/ml.). Eventualmente, esses resultados justificaram que os extratos aquosos de *T. subulata* apresenta grande potencial antioxidante e anti-inflamatório. Desse modo, extratos de *T. subulata* poderiam ser candidatos promissores para o desenvolvimento produtos eficiente e de baixo custo.

Palavras Chaves: Radicais livres. Plantas medicinais. Inflamação.

ABSTRACT

Turnera subulata is a substantial medicinal plant used in folk medicine to treat various diseases, but little known in the scientific community. However, *Harpagohytum Procumbens* is already well studied. The present study aimed to evaluate the levels of phenolics, flavonoids and anthocyanins to verify the antioxidant capacity and anti-inflammatory activity (*in vitro*) of plant samples of *T. subulata* and *H. procumbens* extracted using different techniques with aqueous solvent. The results obtained revealed that the total phenolic content of *T. subulata* in the different techniques (soxhlet = 135.7 ±0.1; ultrasound = 123.8 ±2.5 and rotary evaporator = 131.0 ±0.1 mg/ g) were suggestively superior to the other extracts. A strong antioxidant property was observed for *T. subulata* extracts. The total antioxidant capacity was positively correlated with anthocyanin content for *T. subulata* ($R^2=0.9541$, $p=0.0000$). The study of anti-inflammatory activity was observed in extracts for protein denaturation assay (*in vitro*) the extracts showed a better antidenaturing potential for *T. subulata* (Soxhlet=66.2±0.1; Ultrasound= 65.9±0.9 rotaevaporator=53.6±1.5 µg/ml.). Eventually, these results justified that the aqueous extracts of *T. subulata* have great antioxidant and anti-inflammatory potential. Thus, extracts of *T. subulata* could be promising candidates for efficient and low-cost product development.

Keywords: Free radicals. Medicinal plants. Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (ERO), metabólitos parcialmente reduzidos de oxigênio que possuem fortes capacidades oxidantes, são deletérios para as células em altas concentrações, mas em baixas concentrações, tem funções de sinalização complexas. As espécies reativas de oxigênio formadas como subprodutos do metabolismo celular normal são necessárias para manter a homeostase e a sinalização celular (Arfin et al., 2021).

Além do metabolismo celular, eles são gerados por oxidases específicas da membrana plasmática em resposta a fatores de crescimento e citocinas e servem como mensageiros secundários em vias de sinalização específicas e desempenham um papel na regulação da expressão gênica (Thannickal & Fanburg, 2000). As células possuem um sistema de defesa para manter as EROs em níveis fisiologicamente normais, ou seja, enzimas chamadas antioxidantes, responsáveis por transformar os radicais livres em moléculas estáveis e menos danosas, cujo comprometimento pode levar a um estado de estresse oxidativo (Halliwell, 2007).

O termo “estresse oxidativo” refere-se a um sério desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes. Sies (1997) definiu-a como “um distúrbio na atividade pró-oxidante-antioxidante equilíbrio em favor do primeiro, levando a danos potenciais”. Tal dano é muitas vezes chamado de “dano oxidativo”. Matthew Whiteman e Hillewell (2004) definiu o dano oxidativo como “o dano biomolecular causado pelo ataque de ERO sobre os constituintes dos organismos vivos” (Halliwell & Whiteman, 2004).

O estresse oxidativo pode resultar de níveis diminuídos de antioxidantes, por exemplo, mutações que afetam as atividades de enzimas de defesa antioxidante, como Cu, Zn, SOD ou GSH-Px, ou toxinas que esgotam as defesas antioxidantes. Por exemplo, muitos xenobióticos são metabolizados por conjugação com GSH; altas doses podem esgotar o GSH e causar estresse oxidativo, mesmo que o xenobiótico não seja ele próprio um gerador de espécies reativas. Deficiências em minerais dietéticos (por exemplo, Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se) e/ou antioxidantes também podem causar estresse oxidativo; Aumento da produção de espécies reativas, por exemplo, pela exposição de células ou organismos a níveis elevados de O_2 ou a outras toxinas que são eles próprios espécies reativas (por exemplo, NO_2) ou são metabolizados para gerar espécies reativas ou ativação excessiva de sistemas “naturais” que produzem tais espécies (por exemplo, ativação inadequada de células fagocíticas em doenças inflamatórias crônicas) (Halliwell & Whiteman, 2004).

Já o dano biomolecular que pode ser causado pelo ataque direto de espécies reativas durante o estresse oxidativo. As consequências do estresse oxidativo podem incluir. A adaptação da célula ou organismo pela regulação positiva dos sistemas de defesa, que podem: (a) proteger completamente contra danos; (b) proteger contra danos até certo ponto, mas não completamente; ou (c) "superproteger" (por exemplo, as células são então resistentes a níveis mais altos de estresse oxidativo impostas posteriormente). A lesão celular envolve dano a qualquer ou a todos os alvos moleculares como, lipídios, DNA, proteína, carboidrato, entre outros. Danos as biomoléculas podem resultar de alterações relacionadas ao estresse oxidativo nos níveis de íons (por exemplo, Ca^{2+}) ou ativação de proteases, por exemplo, e morte celular. A célula pode: recuperar-se do dano oxidativo reparando-a ou substituindo as moléculas danificadas, ou pode sobreviver com dano oxidativo persistente ou dano oxidativo, principalmente ao DNA, pode desencadear a morte celular, por apoptose ou necrose (Halliwell & Whiteman, 2004).

Sabe-se que o estresse oxidativo é sempre acompanhado de inflamação e estão intimamente relacionados e tipicamente envolvidos em distúrbios celulares. A inflamação é uma resposta de defesa do corpo humano a estímulos agressivos, envolvendo reações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas para localizar, inativar e destruir o agente agressor, além de promover cicatrização e reparo tecidual (Alzoubi et al., 2019; Chung et al., 2018). Durante o processo inflamatório, várias vias celulares desempenham um papel crucial na recuperação e manutenção do equilíbrio homeostático. Nesse processo, a participação dos macrófagos no sistema imunológico é fundamental para a ativação das vias inflamatórias e na liberação de mediadores inflamatórios específicos (Freeman, et al., 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são usados diariamente e indiscriminadamente no tratamento de doenças inflamatórias em todo o mundo (Norris et al 2017). No geral, os AINEs podem causar efeitos colaterais devido ao seu mecanismo de ação. Os principais efeitos adversos incluem sangramento gastrointestinal, alterações nas funções cardiovasculares e renais e outras complicações, como hemorragia e até morte (Shal et al., 2018). Apesar da diversidade de anti-inflamatórios no mercado farmacêutico, nenhuma formulação oferece baixa toxicidade e mínimos efeitos adversos. Essa situação estimula a busca por novas moléculas visando drogas mais seguras e com baixos efeitos colaterais para o tratamento da inflamação (Sochocka, et al. 2017; Kalivarathan et al., 2017; <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/3/1084/htm> - B11-molecules-27-01084 Sen Li et al 2020).

Na busca por moléculas menos tóxicas e com eficiente atividade antioxidante e anti-inflamatória, os polifenóis que são provenientes de plantas são considerados como excelentes alternativas. Desse modo, podem ser usados para resistir ao estresse oxidativo. Polifenóis são apresentados na forma de compostos fenólicos como flavonas, flavonóides, ácidos fenólicos e outros. Muitos tipos de polifenóis e metabólitos derivados de polifenóis são eficientes na redução do estresse oxidativo e da inflamação (Se Li, et al., 2021).

Nesse contexto, compostos fenólicos de plantas (por exemplo, flavonóides, ácidos fenólicos, ligninas) têm sido descritos quanto às suas diversas atividades farmacológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, hepatoprotetores e antimicrobianos (Kisiriko et al. 2021). Os polifenóis são objeto de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos devido à sua inibição direta ou indireta ou ativação de importantes alvos celulares e moleculares, por meio da modulação da expressão de mediadores inflamatórios (Ali et al., 2020).

Com base nisso, estudos têm se concentrado em avaliar a biodiversidade vegetal como reservatório composto para fins terapêuticos, além de elucidar atividades medicinais atribuídas pela tradição popular (Fitzgerald et al., 2020; Kisiriko et al., 2021).

Nesse contexto, *Turnera subulata* (família Turneraceae) que é uma espécie com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo como principal centro de diversidade a América tropical. Ocorre, preferencialmente, em ambientes abertos, na Caatinga e Restinga, inclusive associadas a locais perturbados pela ação antrópica. (Kumar et al., 2005).

Tal espécie é amplamente utilizada na medicina popular devido às suas propriedades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória, hipoglicemiante, antifúngica e antioxidante. (Kumar et al., 2005; Galvez et al., 2006; Nascimento et al., 2006; Brito et al., 2012). Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Turnera* revelaram a presença de flavanóis, alcalóides, taninos, glicosídeos cianogênicos, ácidos graxos, triterpenóides e vários compostos fenólicos relacionados às suas bioatividades (Kumar et al., 2005; Szewczyk & Zidorn, 2014).

Vários estudos relatam o uso de plantas da família Turneraceae para tratamento de processos inflamatórios (Montanher et al., 2007; Park et al., 2018). Em relação à *T. subulata*, seus efeitos anti-inflamatórios têm sido descritos principalmente pela inibição da produção de citocinas (Souza et al., 2016). Em estudo, Luz et al. (2019) mostraram a capacidade dos extratos de *T. subulata* em inibir direta e indiretamente a trombina, promovendo poucos efeitos colaterais. Esses dados são relevantes, pois esse fator de coagulação também está relacionado a uma resposta inflamatória (Luz et al., 2019).

Assim, estudos sobre o potencial antioxidante e anti-inflamatório dessa espécie vegetal são relevantes para propor uma associação entre o perfil fitoquímico e seus efeitos farmacológicos.

Além da *Turnera subulata*, uma outra espécie de vegetal que possui um potencial anti-inflamatório e antioxidante bastante considerável. Mas, no entanto, não é típica de região tropical. Tal vegetal é bastante conhecida e utilizada no mundo todo, trata-se da *Harpagophytum procumbens*, conhecido popularmente como “garra do diabo” e/ou “unha-do-diabo”.

A *Harpagophytum procumbens* é uma planta herbácea perene originária do deserto de Kalahri, das estepes da Namíbia, Botswana e África do Sul, não sendo, portanto, uma planta nativa do Brasil. Além disso, não são encontrados relatos de ocorrência da espécie no Brasil (Ministério da Saúde, 2015).

A *Harpagophytum procumbens*, que foi introduzido no mercado como fitoterápico, é um analgésico à base de planta com efeitos anti-inflamatórios, é comumente usada para tratar inflamações como dores musculoesqueléticas e reumatismo (Chantre2000; Denner et al., 2007). Como mecanismo de ação é possível verificar o papel do *Harpagophytum procumbens* na ciclooxigenase (COX) onde foi demonstrado em diferentes estudos (Anauate et al., 2010; fiebich et al., 2012). Por exemplo, em um estudo de Abdelouahab e Heard (2008), foi demonstrado que o uso de componentes ativos de *Harpagophytum procumbens* reduziria a expressão de COX-2 em pele suína recém-excisada (Abdelouahab & Heard, 2008). O ensaio de sangue total de doadores saudáveis demonstrou que *Harpagophytum procumbens* inibe indistintamente a atividade da COX-1 e COX-2, 37,2 e 29,5%, respectivamente (Anauate et al., 2010). Outros estudos para descobrir os alvos moleculares do anti-inflamatório *H. procumbens* afirmam que o *H. procumbens* previne a indução da expressão gênica pró-inflamatória bloqueando a via AP-1 (Fiebich et al, 2012). Em outro estudo, foi revelado que o uso de *Harpagophytum* por oito semanas pode melhorar a dor nas costas entre 50% e 70%, e também, seu efeito na dor no quadril e no joelho foi maior do que a dor nas costas (Chrubasik et al., 2003).

Muitos estudos já examinaram o mecanismo bioquímico e papel terapêutico do *H. procumbens* no tratamento de várias doenças a exemplo da osteoartrite (Chantre, et al 2000; Chrubasik et al 2003; Fiebich,2012) evidenciando que o *Harpagophytum procumbens* possui, de fato, efeito no combate a doenças oxidantes e inflamatórias.

Levando em comparação, o mesmo não ocorre com a *Turnera subulata* que trata-se de um vegetal pouco estudado, não havendo pesquisas claras para avaliar o papel da *Turnera subulata* em comparação com um vegetal com potencial já esclarecido.

Desse modo, esse estudo teve como objetivo comprovar a capacidade antioxidante e a atividade anti-inflamatória de *Turnera subulata* comparando-a com a *Harpagophytum procumbens*, demonstrando sua efetividade no combate ao estresse oxidativo e a inflamação. Evidenciando-se assim, a capacidade de uma planta nativa do nordeste brasileiro ser utilizada como um produto natural e um importante vegetal no combate ao estresse oxidativo.

2.0 METODOLOGIA

2.1 Amostragem

As folhas da *Turnera subulata*, foram coletados no município de Massaranduba/PB (7°08'37"S e 35°46'37"W) (Figura 1 A) com elevação de 491m, Sítio Cachoeira de Pedra D'água (Figura 1 B). A amostragem foi coletada às 10:21 hora do dia 21/01/2020, de forma manual, com temperatura ambiente variando em torno de 28±2°C (Figura 2 A). Após coleta, o material foi levado a laboratório, retiradas as folhas para lavagem em água corrente e posteriormente em água destilada, na sequência foram secas em estufa à 40°C, e pesadas a cada 1 hora até estabilização do peso (Figura 2 B). Em seguida, armazenadas em sacos herméticos para análises posteriores.

Figura 1: A) Localização do município de Massaranduba no mapa da Paraíba. B) Geolocalização do Sítio Cachoeira de Pedra D'água



Fonte: A: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Massaranduba_\(Para%C3%ADba\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Massaranduba_(Para%C3%ADba))

B: <https://www.google.com.br/maps/place/Massaranduba,+PB>

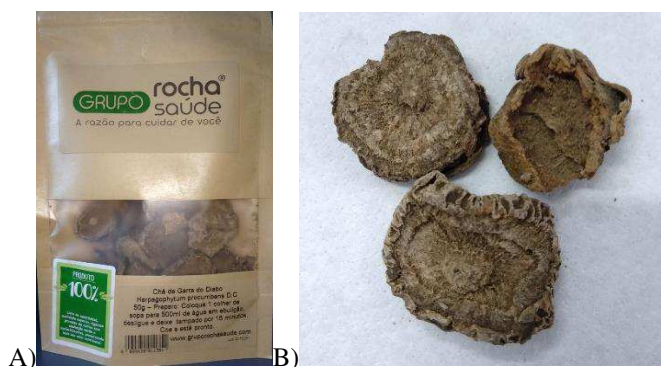
Figura 2: A) *Turnera subulata*; B) Folhas de *T. subulata*.



Fonte: Autora (2020)

E as raízes de *Harpagophytum procumbens* foram obtidas em sua versão comercial para chá, sob a forma de raízes secas, adquiridas do grupo Rocha Saúde (TM Rocha Comércio e Exportação) (Figura 3).

Figura 3: Forma comercial do chá de *Harpagophytum procumbens*; B) raízes de *H. procumbens*.



Fonte: Autora (2022)

2.2 Extração dos bioativos

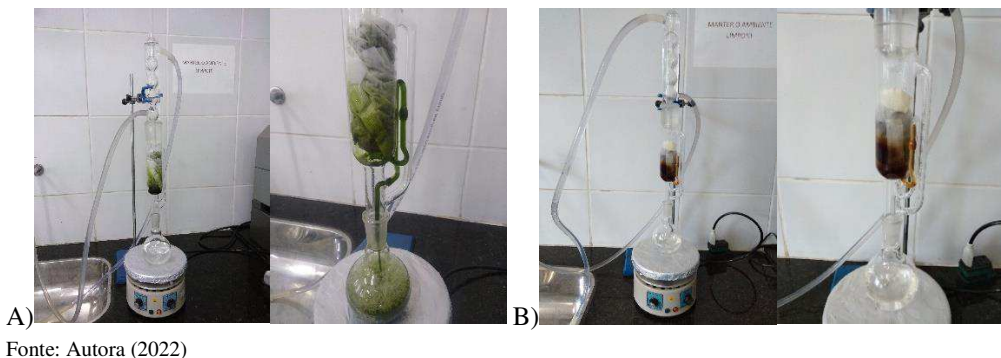
A extração foi realizada em três técnicas: Soxhlet, Evaporação rotativa e técnica ultrassônica. Em todas as técnicas usou-se apenas a água destilada como solvente. As condições de operação foram obtidas a partir da literatura. Na extração utilizou-se a razão 10 ml de solvente/g de folha (*T. subulata*) ou raiz (*H. procumbens*). O extrato obtido de cada tipo de extração foi armazenado à -25°C em freezer (Marca FRICON) e em seguida foi liofilizado por 48 horas a vácuo de 0,12mbar em liofilizador Christ – Alfa 1-2 LD plus (Marca Nova Analítica).

2.2.1 Soxhlet

Na extração Soxhlet utilizou-se a razão 200ml de solvente para 20g de folha ou raiz, sendo conduzida a 100°C. O tempo de extração foi de 6 ciclos de 1 hora cada, totalizando 6

horas de extração (Figura 4). Ao fim dos ciclos, as amostras foram congeladas a -25°C para posterior liofilização. (Szewczyk e Zidorn, 2014).

Figura 4: Extração de bioativos *T. subulata* em Soxhlet; B) Extração de bioativos de *H. procumbens* em Soxhlet.



2.2.2 Ultrassom

Na extração por ultrassom utilizou-se a razão 200ml de solvente para 20g de folha ou raiz, foi realizada em aparelho de cavitação ultrassônica, modelo Altsonic Clean 3pa Alt, com frequência do ultrassom de 40 Hertz. A operação foi conduzida a 60°C durante 1 hora. Ao fim, as amostras foram filtradas em filtro de papel e congeladas a -25°C para posterior liofilização (Castejón et al. 2018) (Figura 5).

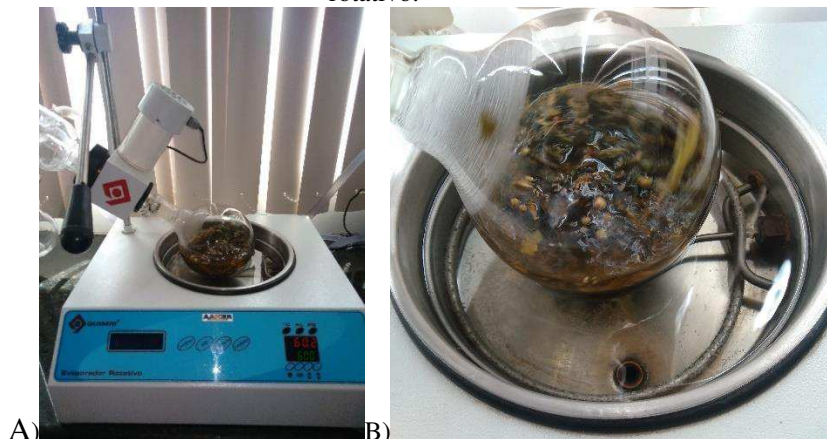
Figura 5: A) Aparelho de ultrassom Alt Sonic Clean; B) Extração de bioativos de *T. subulata* em ultrassom.



2.2.3 Evaporador Rotativo

No evaporador rotativo, os extratos foram agitados continuamente por rotação, a 60°C por 1 hora, não houve remoção do solvente (água) em forma de vapor. O extrato foi filtrado, em filtro de papel e em seguida congelados à -25°C para posterior liofilização (Figura 6).

Figura 6: A) Aparelho de evaporação rotativa; B) Extração de biotivos de *T. subulata* em evaporador rotativo.



Fonte: Autora (2022)

2.3 Determinação de Fenólicos Totais

Os teores de fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com a literatura (Waterhouse, 2006). A amostra em pó, após liofilização, foi pesada 1,0 g e diluída em 50mL de água. Na alíquota do extrato foi adicionado o reagente Folin-Ciocalteu, adicionado água destilada e deixado em repouso por 5 minutos. Após 5 min, adicionou-se solução saturada de carbonato de sódio. Seguida de agitação manual e repouso em banho-maria a 40°C por 30 minutos, após o período determinado foi resfriado à temperatura ambiente, e a amostra foi medida a 765 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis). Todas as amostras foram realizadas em triplicatas. O ácido gálico foi usado como padrão de referência (Waterhouse, 2006).

2.4 Determinação de flavonoides e antocianinas

Os teores de flavonoides e antocianinas foram determinados segundo o método de Francis (1982). Foi pesado 1g da amostra liofilizada, e adicionado 10mL da mistura etanol-HCL. Logo após, foi macerado por um minuto em tubo Falcon e incubado em geladeira por 24 horas para

obtenção do extrato. Após as 24 horas, a amostra foi filtrada em algodão e completada para o volume de 10mL da mistura etanol-HCL. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis) a 374nm para determinação de flavonoides e 535nm para determinação de antocianinas. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas. (Francis, 1982).

2.5 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) de todos os extratos de *T. subulata* e *H. procumbens* foi estimada pelo método do fosfomolibdato. A 0,1 ml de cada extrato vegetal, 1 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) foi adicionado e misturado completamente. Em seguida, as misturas reacionais foram cobertas com papel alumínio e mantidas em banho-maria por 75 minutos a 80°C. Após a incubação, as amostras foram deixadas atingir a temperatura ambiente e, finalmente, as absorvâncias foram registradas em 695 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis). O ácido ascórbico foi usado como padrão. A capacidade antioxidante foi calculada usando a seguinte fórmula (Equação 1) (Saravanan et al., 2020):

$$\text{Capacidade Antioxidante (\%)} = \frac{\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. do controle}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

O método do fosfomolibdato é quantitativo, uma vez que a capacidade antioxidante total é expressa em equivalentes de ácido ascórbico (Umamaheswari et al 2008). A atividade antioxidante total foi expressa em porcentagem, sendo os extratos comparados ao ácido ascórbico na concentração de 100 µg/mL, que foi considerado como 100 % (Araujo et al 2020).

2.6 Atividade anti-inflamatória in vitro

O ensaio de desnaturação de proteínas foi realizado para todos os extratos de *T. subulata* e *H. procumbens*. A solução composta de 2,8 mL de solução salina tampão fosfato, 2 mL de amostra teste (0,5µL) e 0,2 mL de albumina de ovo de galinha . Ácido acetilsalicílico foi usada como controle positivo (droga padrão) e água destilada como controle negativo. Todas as misturas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 min e depois aquecidas a 70°C durante 10 min. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e, em

seguida, as absorvâncias foram lidas em 660 nm. A inibição da desnaturação da proteína foi estimada usando a seguinte equação (Equação 2) (Saravanan et al., 2020):

$$\text{Porcentagem de Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. Controle}} \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

A atividade anti-inflamatória foi expressa em porcentagem, sendo os extratos comparados ao ácido acetilsalicílico na concentração de 100 µg/mL, que foi considerado como 100 % (Araujo et al 2020).

2.7 Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média ± DP (desvio padrão). A correlação entre todas as análises foi realizada por meio de correlação de Spearman, e o coeficiente de correlação (R^2 calculado). Todas as análises e gráficos foram realizados usando o Software Statistica 12.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de compostos bioativos com solvente é uma operação clássica recomendada para muitos processos industriais, principalmente na indústria farmacêutica. O interesse em drogas derivadas de plantas levou a uma maior preocupação por métodos de extração superiores, que pudessem permitir a obtenção do máximo rendimento dos constituintes bioativos em um curto tempo de processamento com baixo custo e mais natural possível, ou seja com a mínima toxicidade. O conteúdo total de polifenóis extraídos depende significativamente da natureza do solvente, bem como do método utilizado (Moharrami & Hashempour, 2021).

Considerando o potencial dos vegetais para diversos fins terapêuticos, neste estudo, dois diferentes extratos de duas espécies de plantas (*T. subulata* e de *H. procumbens*) foram avaliados a capacidade antioxidante total e a atividade anti-inflamatória, bem como as concentrações de substâncias bioativas tais como, fenólicos totais, flavonoides e antocianinas.

As plantas medicinais contêm uma quantidade notável de bioativos a exemplo dos polifenóis. Polifenóis tais como, flavonoides e dentre estes as antocianinas sempre desempenham um papel vital na promoção e manutenção da boa saúde (Olsson, 2004).

Diferentes tipos de antioxidantes de origem vegetal sempre foram drogas potenciais em tratar e reduzir o risco de várias doenças, como inflamação aguda e crônica e formação de tumor (Matés & Sánchez-Jiménez, 2000).

Substâncias antioxidantes à base de plantas sempre têm a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio que podem causar danos ao DNA, lipídios e proteínas. Os antioxidantes podem destruir células cancerosas iniciando a apoptose ou afetando as atividades enzimáticas ou inibindo a expressão de oncogenes. Para avaliação da eficiência antioxidante de uma substância endógena, um método de ensaio específico por si só não será suficiente porque os antioxidantes podem ser polares ou não polares; eles podem eliminar radicais doando um elétron ou íons de hidrogênio, que podem proteger os mecanismos de defesa antioxidantes. Assim, várias técnicas têm sido utilizadas para determinar o potencial antioxidante dos extratos. (Rahman, 2015).

3.1 Teor de Compostos Fenólicos Totais

Os extratos apresentaram uma boa quantidade de compostos fenólicos, tanto os de *T. subulata* quanto os de *H. procumbens*. No entanto, em comparação com todos os extratos, os extratos de *T. subulata* em soxhlet ($135,7 \pm 0,1$ mg/g) e evaporador rotativo ($131,0 \pm 0,1$ mg/g) tiveram as maiores quantidade de compostos fenólicos. E de *H. procumbens* o valor mais significativo foi a extração no evaporador rotativo ($127,6 \pm 1,1$ mg/g) (Tabela 1 e Gráfico 1). Os compostos fenólicos e seus derivados presentes nas plantas são responsáveis por propriedades terapêuticas (Muslim et al 2012). Assim, os maiores teores fenólicos em geral enfatizam a importância medicinal da planta selecionada. Esses bioativos naturais desempenham um papel vital na prevenção e tratamento de malignidades (Jafari et al., 2014). Diferentes bioatividades de compostos fenólicos são responsáveis por propriedades quimiopreventivas como anticarcinogênicos, antioxidantes e anti-inflamatórios. (Wu-Yang Huang et al 2009).

Os valores do teor de fenólicos no presente estudo variaram ligeiramente em relação aos da literatura. Isso pode ser devido à variação geográfica ou métodos de extração, que podem alterar a quantidade de fenólicos (Panche et al., 2016).

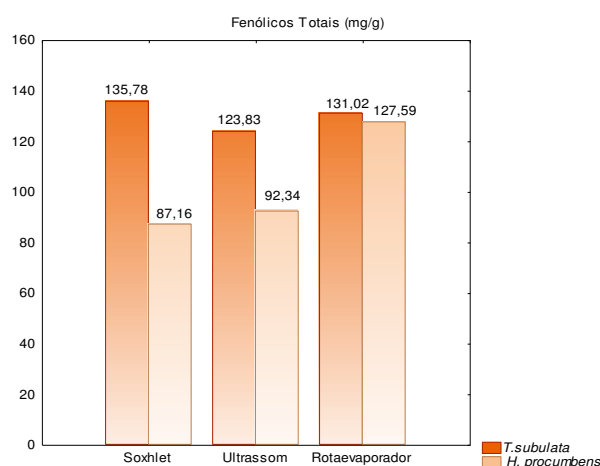
Tabela 1: Média e desvio padrão da concentração de bioativos em mg/g.

Extrato de planta	Teor de fenólicos totais (FEN)	Teor de Flavonóides totais (FLA)	Teor de Antocianinas (ANT)
--------------------------	---------------------------------------	---	-----------------------------------

<i>T. subulata</i> (Soxhlet)	135,7 ±0,1	0,55±0,01	0,05±0,0
<i>T. subulata</i> (Ultrassom)	123,8 ±2,5	0,49±0,0	0,04±0,0
<i>T. subulata</i> (Evaporador)	131,0 ± 0,1	0,53±0,0	0,05±0,0
<i>H. procumbens</i> (Soxhlet)	87,2±0,6	0,55±0,0	0,04±0,0
<i>H. procumbens</i> (Ultrassom)	92,3±1,8	0,55±0,0	0,04±0,0
<i>H. procumbens</i> (Evaporador)	127,6±1,1	0,54±0,0	0,04±0,0

Fonte: Autora (2022)

Gráfico 1: Teor de compostos fenólicos (mg/g) de *T. subulata* e *H. procumbens* nas diferentes técnicas de extração (soxhlet, ultrassom e rotaevaporador)



Fonte: Autora (2022)

3.2 Teor de Flavonoides

A concentração de flavonoides de todos os extratos de *T. subulata* e *H. procumbens* foi determinada segundo Francis (1989). A quantidade de flavonoides presentes em todos os extratos variou de 0,55±0,01 mg/g a 0,49±0,0 mg/g (Tabela 1 e Gráfico 2) apresentando valores similares entre os dois vegetais. Considerando que todos os extratos contêm uma quantidade similar de teor de flavonoides. A variação de concentração de teor de flavonoides depende da natureza da polaridade dos solventes utilizados para a extração (Rahman, 2015). O solvente utilizado para todos os extratos foi o mesmo, a água. A fração flavonoide presente nos diferentes extratos da *T. subulata* apresenta correlação significativa com o teor de fenólicos totais ($R^2=0,9609$; $p=0,0000$) (Gráfico 3). Diferentes relatos da literatura indicam uma correlação linear do conteúdo de fenólicos totais e flavonoides (Shrestha-Dhillon; 2006).

Moléculas de flavonoides são importantes componentes antioxidantes que são responsáveis por desativar os radicais livres com base em sua capacidade de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres. Eles também têm características estruturais ideais para a eliminação de radicais livres (Amarowicz, 2006).

Gráfico 2: Teor de compostos flavonoides (mg/g) de *T. subulata* e *H. procumbens* nas diferentes técnicas de extração (soxhlet, ultrassom e rotaevaporador)

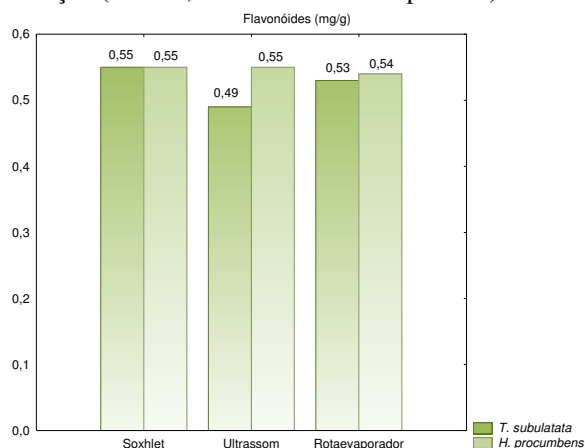
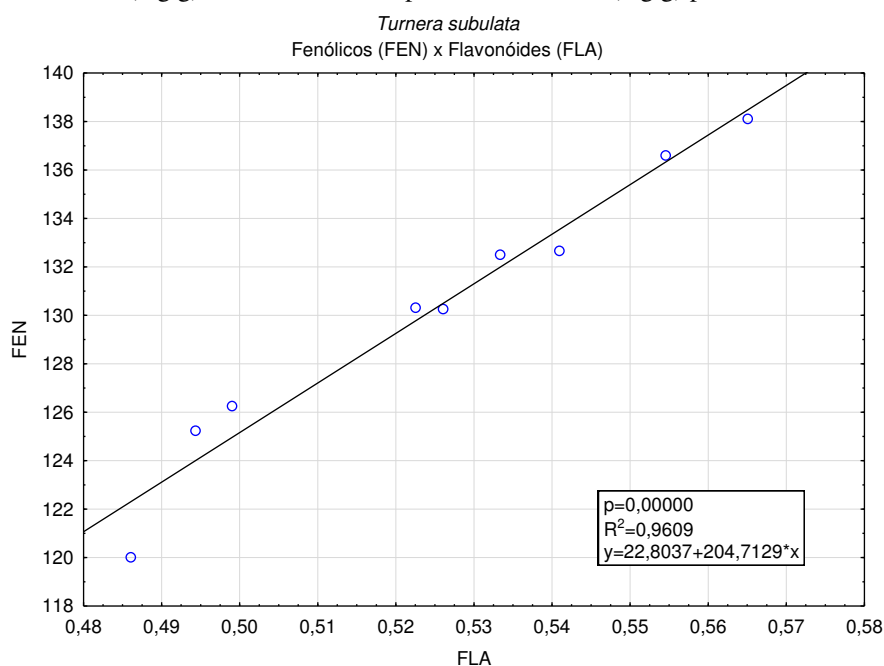


Gráfico 3: Gráfico da análise de correlação de Spermán, correlacionando positivamente o teor de compostos fenólicos (mg/g) com o teor de compostos flavonoides (mg/g) para *T. subulata*.



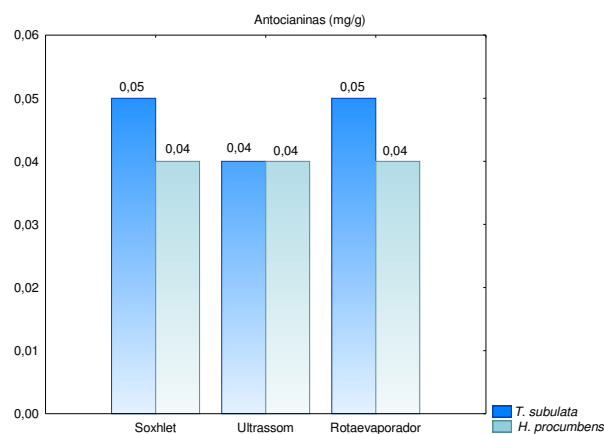
3.3 Teor de Antocianinas

Os valores de teor antocianinas para *T. subulata* e *H. procumbens*, de modo geral, foram similares. Para *T. subulata* no soxhlet e no evaporador rotativo foram iguais (0,05mg/g), havendo uma pequena diminuição apenas no ultrassom (0,04mg/g), quanto a *H. procumbens* não houve diferença entre as técnicas utilizadas (0,04mg/g) (Gráfico 4).

Os estudos científicos disponíveis comprovam os efeitos benéficos da presença de antocianinas em vegetais na prevenção de doenças (Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta 2008;

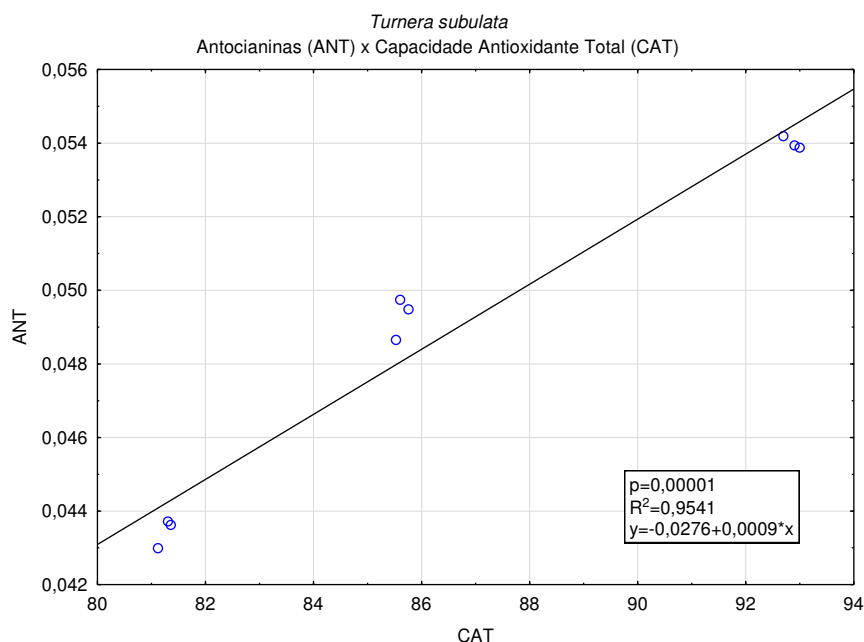
Seifu et al., 2012; Khoo et al., 2017). Pois mesmo após a ingestão de altas doses de antocianinas e derivados não foram observados efeitos negativos, demonstrando sua segurança (Clifford, 2000). Diversos estudos abordam os principais benefícios para a saúde das antocianinas em diferentes tipos de patologias, incluindo saúde ocular, doenças cardiovasculares, antiobesidade, antidiabéticos, efeitos antimicrobianos, atividades anticancerígenas e distúrbios neurodegenerativos (Shim et al., 2012; Alvarez-Suarez et al., 2014; Jankowski et al., 2000; Genskowsky et al 2015; Chen et al., 2015; Rehman et al 2017).

Gráfico 4: Teor de antocianinas (mg/g) de *T. subulata* e *H. procumbens* nas diferentes técnicas de extração (soxhlet, ultrassom e rotaevaporador).



Fonte: Autora (2022)

Gráfico 5: Gráfico da análise de correlação de Serman, correlacionando positivamente o teor antocianinas (mg/g) com a capacidade antioxidante total ($\mu\text{g/ml}$) para *T. subulata*.



Os resultados de correlação mostraram uma correlação positiva do teor de antocianinas com a capacidade antioxidante total ($R^2=0,9541$, $p=0,0000$) (Gráfico 5), evidenciando seu potencial antioxidante. Narayan et al. (1999), descrevem que as antocianinas são um potente antioxidante comparado com antioxidantes clássicos como alfa tocoferol (vitamina E) (Narayan et al., 1999).

3.4 Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante total foi testada para todos os extratos de *T. subulata* e para *H. procumbens*. Por se tratar de um método quantitativo, o ácido ascórbico foi utilizado como padrão. Os resultados indicaram que o extrato extraído em evaporador rotativo apresentou o maior teor de capacidade antioxidante ($92,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) entre os extratos de *T. subulata* (Tabela 2).

A capacidade antioxidante total aumentou proporcionalmente ao conteúdo total de antocianinas para *T. subulata*. Desse modo, houve uma correlação positiva significativa ($R^2=0,9541$; $p < 0,0005$) entre a capacidade antioxidante total e a concentração de antocianinas (Gráfico 3). Os resultados de capacidade antioxidante total indicaram que os extratos de *T. subulata*, seja no evaporador rotativo ($92,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) no soxhlet ($85,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) ou no ultrassom ($81,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) resultaram em maior capacidade antioxidante total do que os

extratos de *H. procumbens* (Tabela 2). Nos últimos tempos, várias pesquisas revelaram a forte relação entre a capacidade antioxidante total e as antocianinas, endossando a importância dos polifenóis como uma biomolécula antioxidante (Rao et al, 2010).

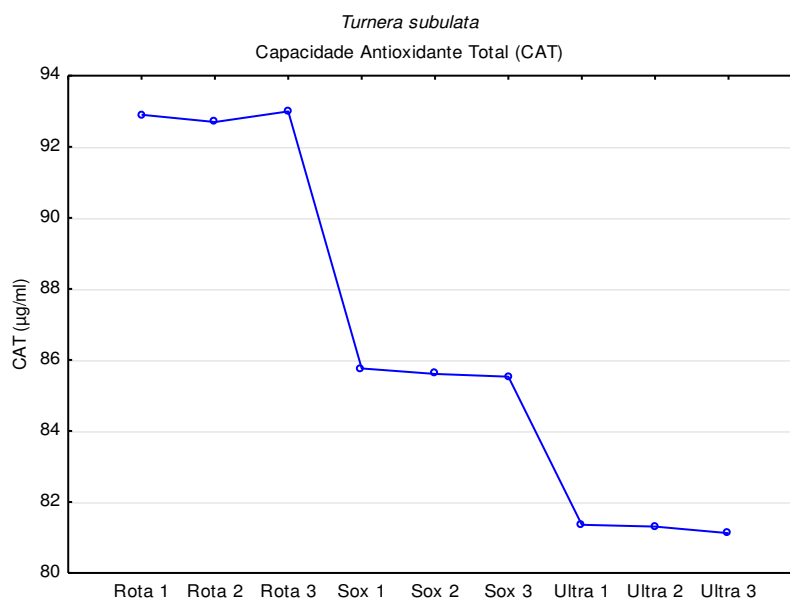
De acordo com relatórios recentes, as moléculas de flavonoides em plantas medicinais desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade da oxidação lipídica em associação com a atividade antioxidante (Sarian et al., 2017). Neste estudo, os extratos *T. subulata* com maiores teores de fenólicos totais (135,7±0,1mg/g; 123,8±2,5mg/g; 131,0±0,1mg/g) tiveram maior capacidade antioxidante (Rotaevaporador=92,9±0,1; Soxhlet=85,6±0,1 e ultrassom=81,3±0,1 µg/ml) (Gráfico 6). A capacidade antioxidante total de *H. procumbens* foi relativamente inferior comparados aos de *T. subulata* (Rotaevaporador=55,2±2,1; Soxhlet=50,5±0,1 e ultrassom=44,1±3,3 µg/ml) (Gráfico 7). As variações nas capacidades antioxidantes dos extratos podem ter sido devidas ao potencial redox do conteúdo de fenol, que poderia atuar como sequestrador de radicais livres, doador de hidrogênio, oxigênio, inibidores, quelantes de metais e agentes redutores (D. Amic, 2003).

Tabela 2: Média e desvio padrão da concentração de bioativos de valores de rendimento em µg/ml.

Extrato de planta	CAT	ANTI
<i>T. subulata</i> (Soxhlet)	85,6±0,1	66,2±0,1
<i>T. subulata</i> (Ultrassom)	81,3±0,1	65,9±0,9
<i>T. subulata</i> (Evaporador)	92,9±0,1	53,6±1,5
<i>H. procumbens</i> (Soxhlet)	50,5±0,1	44,9±1,0
<i>H. procumbens</i> (Ultrassom)	44,1±3,3	66,5±1,6
<i>H. procumbens</i> (Evaporador)	55,2±2,1	32,1±0,3

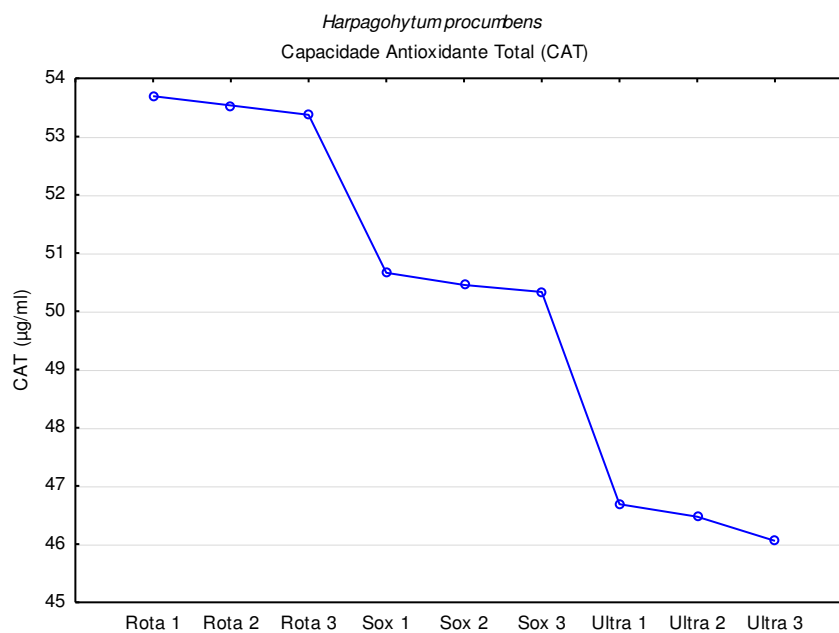
Legenda:
 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)
 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA (ANTI)
 Fonte: Autora (2022)

Gráfico 6: Gráfico dos valores ($\mu\text{g/ml}$) da Capacidade Antioxidante Total para *T. subulata*.



Fonte: Autora (2022)

Gráfico 7: Gráfico dos valores ($\mu\text{g/ml}$) da Capacidade Antioxidante Total para *H. procumbens*.



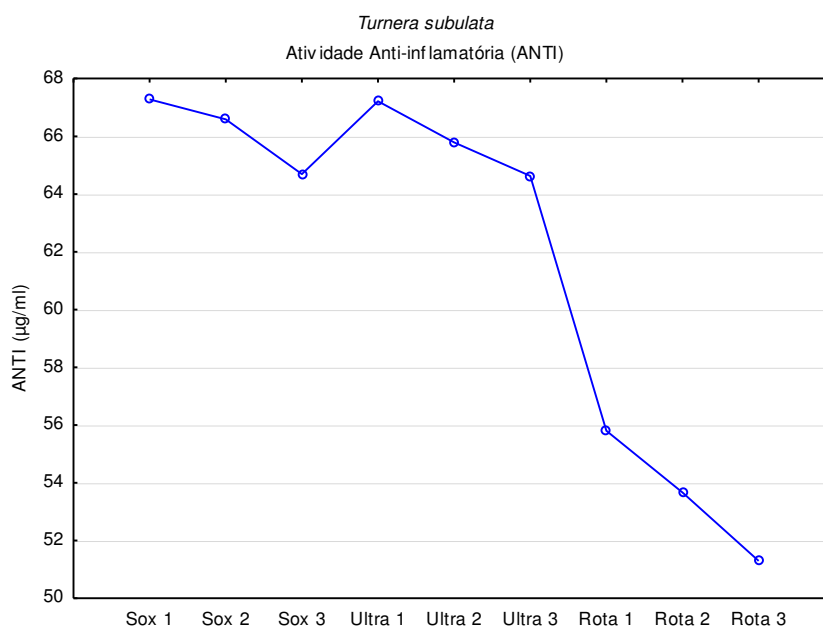
Fonte: Autora (2022)

3.5 Atividade Anti-inflamatória (in vitro)

As propriedades de vários metabólitos secundários de plantas têm sido extensivamente estudadas, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Zaynab, 2018; Yang et al., 2020; Góral et al., 2020). Assim, este estudo avaliou a capacidade antioxidante total e da propriedade anti-inflamatória em modelo in vitro para *T. subulata* e *H. procumbens*.

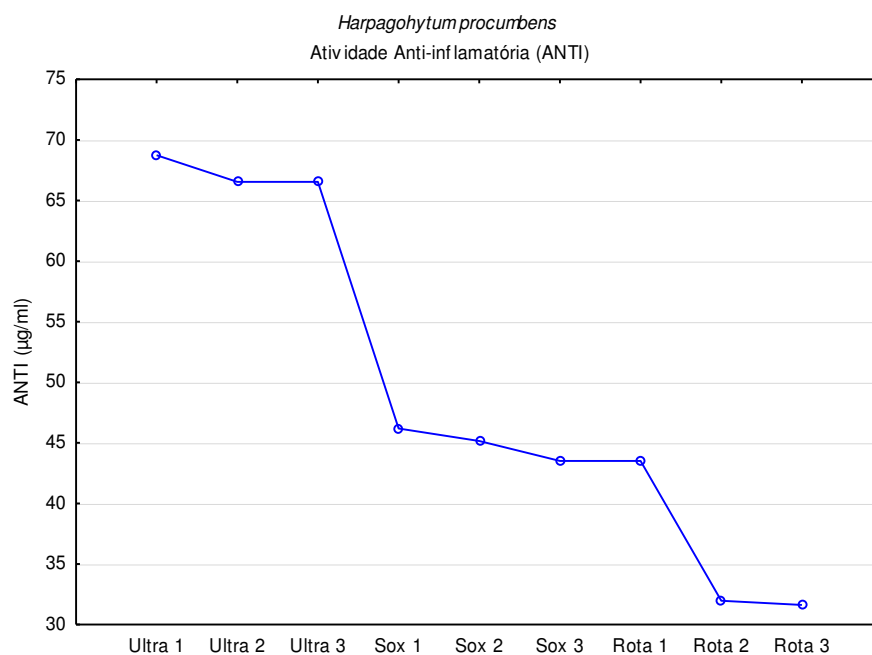
A desnaturação de proteínas é uma razão bem definida para o processo inflamatório. O potencial da atividade anti-inflamatória de todos os extratos de *T. subulata* e *H. procumbens* para inibir a desnaturação de proteínas foram estudados. Os resultados observados indicaram que todos os extratos exibiram um melhor potencial antidesnaturante para *T. subulata* (Soxhlet=66,2±0,1; Ultrassom= 65,9±0,9 rotaevaporador=53,6±1,5 µg/ml.) (Tabela 1 e Gráfico 8) quando comparado a *H. procumbens* no Soxhlet (44,9±1,0 µg/ml) e Rotaevaporador (32,1±0,3 µg/ml) e iguais para o método de Ultrassom (66,5±1,6 µg/ml) (Tabela 1 e Gráfico 9).

Gráfico 8: Gráfico dos valores (µg/ml) da Atividade Anti-inflamatória para *T. subulata*.



Fonte: Autora (2022)

Gráfico 9: Gráfico dos valores (µg/ml) da Atividade Anti-inflamatória para *H. procumbens*.



Fonte: Autora (2022).

Estudos sobre os mecanismos reguladores das respostas inflamatórias revelaram que a inflamação pode retardar a cicatrização e, em situação crônica, também pode desempenhar um papel importante no aparecimento de câncer e outras doenças crônicas (Furman et al., 2019). Portanto, o uso de anti-inflamatórios não esteroides para supressão da inflamação é prevalente, apesar de vários efeitos adversos, como sangramento gastrointestinal e úlceras (Lee e Katz, 2021). Por outro lado, evidências crescentes sugerem que produtos naturais, como extratos vegetais, devido à sua fitocomposição, podem diminuir processos inflamatórios (Nunes et al., 2020; Shin et al., 2020; Puangraphant et al., 2022;).

Estudos evidenciam que com relação à fitocomposição, destaca-se que os compostos fenólicos são a principal classe entre os metabólitos secundários presentes no gênero *Turnera* (Szewczyk e Zidorn, 2014). E que a presença de flavonoides em extratos de *T. subulata* possivelmente está relacionada às condições climáticas do bioma caatinga brasileiro, local de coleta, onde a alta exposição à radiação solar favorece a biossíntese de compostos fenólicos (Rempelos et al., 2018).

As propriedades anti-inflamatórias observadas com tratamentos com extratos de *T. subulata* estão correlacionadas com a presença de flavonoides, o que aponta para o envolvimento desses compostos na inibição da síntese e atividade de diferentes mediadores pró-inflamatórios (Serafini et al., 2010). Além disso, os flavonoides são relatados como moléculas com baixa citotoxicidade (Serafini et al., 2010; Chang et al., 2019).

De acordo com a composição química, vários mecanismos de ação podem estar associados aos efeitos imunomoduladores observados com extratos aquosos de folhas de *T. subulata*. Um mecanismo sugeriu que o efeito anti-inflamatório desta espécie pode ser devido à capacidade dos extratos de folhas de modular as vias de sinalização bloqueando a resposta inflamatória em macrófagos RAW 264.7. Esse efeito também diminui a secreção de TNF- α e IL-1 β , aumentando o bloqueio de RAGE e CD40 como principais mecanismos de ação (Souza et al., 2016).

Estudos mostram que extratos de *T. subulata* como produtos naturais ativos possuem efeitos inibitórios sobre a secreção de mediadores pró-inflamatórios, que também podem estar associados aos grupos fenólicos detectados na composição química do extrato. De acordo com os estudos, a combinação de polifenóis tem efeitos sinérgicos na atividade biológica (Zhang et al., 2019; Sharma et al., 2019; Giordano et al., 2020).

Além dos efeitos imunomoduladores demonstrados em estudos, vale ressaltar que Luz et al. (2019) mostraram a capacidade dos extratos de *T. subulata* em inibir a trombina, a principal protease na cascata de coagulação, que desempenha um papel na resposta inflamatória (Foley e Conway, 2016). A trombina pode sinalizar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, e moléculas de adesão celular, promovendo ativação leucocitária e proliferação de fibroblastos, além de contribuir para o recrutamento de leucócitos (Foley e Conway, 2016; Palhares et al., 2016). Os estudos com extratos de folhas de *T. subulata* demonstraram efeito inibitório direto sobre a trombina e indireto através do cofator II da heparina, corroborando o efeito dos extratos no processo inflamatório (Luz et al., 2019).

No geral, esses resultados suportam estudos etnofarmacológicos, que descrevem o uso de flores e folhas do gênero *Turnera* na medicina popular para tratar doenças inflamatórias (Szewczyk e Zidorn, 2014). Dados experimentais indicam o efeito imunomodulador de extratos aquosos e hidroalcoólicos de flores e folhas de *T. subulata* através da inibição da secreção de citocinas inflamatórias e aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-10. Apesar dos escassos dados na literatura sobre extratos da espécie *T. subulata*, é possível sugerir sua ação anti-inflamatória.

De modo geral, os resultados fornecem evidências científicas que apoiam o uso de folhas de *T. subulata* na medicina popular no combate ao estresse oxidativo celular e distúrbios inflamatórios, que podem ser aplicadas como uma alternativa para auxiliar nesse tratamento.

4.0 CONCLUSÃO

Neste estudo, pudemos demonstrar a quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides e de antocianinas presentes em diferentes extratos aquosos de *T. subulata* e *H. procumbens*. Esses extratos servem como sequestrantes ou inibidores de radicais livres, talvez atuando como oxidantes primários. Que também inibiu a desnaturação da proteína, de forma eficaz. Assim, infere-se que os extrato aquoso de *T. subulata* concentrações de metabólitos secundários significativos e com boa atividade antioxidante e anti-inflamatória são excelentes candidatos para o desenvolvimento de antioxidantes e anti-inflamatórios potentes e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

- Abdelouahab, N., & Heard, C. (2008). Effect of the major glycosides of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) on epidermal cyclooxygenase-2 (COX-2) in vitro. *Journal of Natural Products*, 71(5), 746–749. <https://doi.org/10.1021/np070204u>
- Ali, S. S., Ahmad, W. A. N. W., Budin, S. B., & Zainalabidin, S. (2020). Implication of dietary phenolic acids on inflammation in cardiovascular disease. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 21(2), 225–240. <https://doi.org/10.31083/J.RCM.2020.02.49>
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Busco, F., Quiles, J. L., Cordero, M. D., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.002>
- M. Alzoubi, Haitham & Abdo, Majeda & Al-Gasaymeh, Anwar & Alzoubi, Ali. (2019). An empirical study of e-Service quality and its impact on achieving a value added. *Journal of Business & Retail Management Research*. 13. 10.24052/JBRMR/V13IS04/ART-12. (n.d.).
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551–562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4)
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76(1), 55–61.
- Anauate, M. C., Torres, L. M., & De Mello, S. B. V. (2010). Effect of isolated fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw) on COX-1, COX-2 activity and nitric oxide

production on whole-blood assay. *Phytotherapy Research*, 24(9), 1365–1369. <https://doi.org/10.1002/ptr.3124>

Ansari, N., & Khodaghali, F. (2013). Natural Products as Promising Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease: Molecular Mechanism Aspect. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 414–429. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311040005>

Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B., & Kumar, D. (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants*, 10(5), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox10050642>.

Brito, Jorge A. López, Maria Aparecida do Nascimento, José B.M. Macêdo, Gabriel Araujo Silva, Cláudia N. Oliveira, Adriana Augusto de Rezende, José Brandão-Neto, Aline Schwarz, Maria das Graças Almeida, Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 50, 12, 2012, Pages 4340-4347, ISSN 0278-6915, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.003>.

Castejón, N., Luna, P., & Señoráns, F. J. (2018). Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. *Food Chemistry*, 244(September 2017), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.014>

Chang, S.K.; Alasalvar, C.; Shahidi, F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2019, 59, 1580–1604.

Chantre, P., Cappelaere, A., Leblan, D., Guedon, D., Vandermander, J., & Fournie, B. (2000). Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, 7(3), 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80001-X](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80001-X)

Chen, X. Y., Zhou, J., Luo, L. P., Han, B., Li, F., Chen, J. Y., Zhu, Y. F., Chen, W., & Yu, X. P. (2015). Black Rice Anthocyanins Suppress Metastasis of Breast Cancer Cells by Targeting RAS/RAF/MAPK Pathway. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/414250>

Chung, A. P. Y. S., Gurtu, S., Chakravarthi, S., Moorthy, M., & Palanisamy, U. D. (2018). Geraniin Protects High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress in Sprague Dawley Rats. *Frontiers in Nutrition*, 5(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00017>

Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063–1072. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q)

da Luz, J. R. D., Barbosa, E. A., Do Nascimento, T. E. S., de Rezende, A. A., Ururahy, M. A. G., Brito, A. da S., Araujo-Silva, G., López, J. A., & Almeida, M. D. G. (2022). Chemical Characterization of Flowers and Leaf Extracts Obtained from *Turnera subulata* and Their Immunomodulatory Effect on LPS-Activated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031084>

Darley-usmar, V., & White, R. (1997). Physiological Society Symposium : Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress Reaction of Nitric Oxide With Superoxide : *Experimental Physiology*, 13(December 1995), 305–316.

De Pascual-Teresa, S., & Sanchez-Ballesta, M. T. (2008). Anthocyanins: From plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 281–299. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9074-0>

Denner, S. S. (2007). A Review of the Efficacy and Safety of Devil’s Claw for Pain Associated With Degenerative Musculoskeletal Diseases, Rheumatoid, and Osteoarthritis. *Holistic Nursing Practice*, 21(4), 203–207. <https://doi.org/10.1097/01.HNP.0000280932.65581.72>

Dias, M. V. S. F., Melo, V. S. P. de, Belém, L. de F., & Souza, A. E. F. de. (2021). Avaliação in vitro da atividade carrapaticida de *Turnera subulata* Sm em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Research, Society and Development*, 10(9), e31910918198. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18198>

dos Santos, D. C., da Silva, G. A., da Conceição Araújo, A. B., de Freitas, R. L. S., Nunes, A. R., & dos Santos Dias, A. J. (2020). Chemical prospecting and evaluation of the biological activity of the propolis of Salinópolis, Pará. *Revista Virtual de Química*, 12(2), 492–499. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200039>

Farpour, H. R., Rajabi, N., & Ebrahimi, B. (2021). The Efficacy of *Harpagophytum procumbens* (Teltonal) in Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Active-Controlled Clinical Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5596892>

Fiebich, B. L., Muñoz, E., Rose, T., Weiss, G., & McGregor, G. P. (2012). Molecular targets of the antiinflammatory *Harpagophytum procumbens* (Devil’s claw): Inhibition of TNF α and COX-2 gene expression by preventing activation of AP-1. *Phytotherapy Research*, 26(6), 806–811. <https://doi.org/10.1002/ptr.3636>

Fitzgerald, M., Heinrich, M., & Booker, A. (2019). Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in Pharmacology*, 10(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01480>

Foley, J.H.; Conway, E.M. Cross talk pathways between coagulation and inflammation. *Circ. Res.* 2016, 118, 1392–1408.

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

Freeman, L. R., Haley-Zitlin, V., Rosenberger, D. S., & Granholm, A. C. (2014). Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: A review of proposed mechanisms. *Nutritional Neuroscience*, 17(6), 241–251. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000092>

Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* 2019, 25, 1822–1832.

Galvez, J., de Souza Gracioso, J., Camuesco, D., Galvez, J., Vilegas, W., Monteiro Souza Brito, A. R., & Zarzuelo, A. (2006). Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. *Fitoterapia*, 77(7–8), 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.029>

Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), 4235–4242. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7628>

Giordano, A.; Morales-Tapia, P.; Moncada-Basualto, M.; Pozo-Martínez, J.; Olea-Azar, C.; Nestic, A.; Cabrera-Barjas, G. Polyphenolic composition and antioxidant activity (ORAC, EPR and cellular) of different extracts of *Argyria radiata* vitroplants and natural roots. *Molecules* 2022, 27, 610.

Góral, I.; Wojciechowski, K. Surface activity and foaming properties of saponin-rich plants extracts. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2020, 279, 102145.

Gu, R., Wang, Y., Long, B., Kennelly, E., Wu, S., Liu, B., Li, P., & Long, C. (2014). Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(6), 903–915. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00084>

Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

Ifesan, B O T; Fashakin, J F; Ebosele, F; Oyerinde, A S. *European J Med Plants* ; 2013 Jul-Sept; 3(3): 465-473

Jafari, S., Saeidnia, S., & Abdollahi, M. (2014). Role of Natural Phenolic Compounds in Cancer Chemoprevention via Regulation of the Cell Cycle. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 409–421. <https://doi.org/10.2174/1389201015666140813124832>

Jankowski A, Jankowska B, Niedworok J. [The effect of anthocyanin dye from grapes on experimental diabetes]. *Folia Medica Cracoviensia*. 2000 ;41(3-4):5-15. PMID: 11339016.

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>

Kisiriko, M., Anastasiadi, M., Terry, L. A., Yasri, A., Beale, M. H., & Ward, J. L. (2021). Phenolics from medicinal and aromatic plants: Characterisation and potential as biostimulants and bioprotectants. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216343>

Kumar, S., Taneja, R., & Sharma, A. (2005). The genus *Turnera*: A review update. *Pharmaceutical Biology*, 43(5), 383–391. <https://doi.org/10.1080/13880200590962926>

Lee, M.W.; Katz, P.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, anticoagulation, and upper gastrointestinal bleeding. *Clin. Geriatr. Med.* 2021, 37, 31–42.

Li, S., Liang, T., Zhang, Y., Huang, K., Yang, S., Lv, H., Chen, Y., Zhang, C., & Guan, X. (2021). Vitexin alleviates high-fat diet induced brain oxidative stress and inflammation via antioxidant, anti-inflammatory and gut microbiota modulating properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 171(May), 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.028>

Li, S., Xian, F., Guan, X., Huang, K., Yu, W., & Liu, D. (2020). Neural Protective Effects of Millet and Millet Polyphenols on High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress in the Brain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 208–214. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00802-6>

Luz, J.R.D.; Nascimento, T.E.S.; Morais, L.V.F.; Cruz, A.K.M.; Rezende, A.A.; Brandão-Neto, J.; Ururahy, M.A.G.; Luchessi, A.D.; López, J.A.; Rocha, H.A.O.; et al. Thrombin inhibition: Preliminary assessment of the anticoagulant potential of *Turnera subulata* (Passifloraceae). *J. Med. Food* 2019, 22, 384–392.

Luz, J.R.D.; Nascimento, T.E.S.; Morais, L.V.F.; Cruz, A.K.M.; Rezende, A.A.; Brandão-Neto, J.; Ururahy, M.A.G.; Luchessi, A.D.; López, J.A.; Rocha, H.A.O.; et al. Thrombin inhibition: Preliminary assessment of the anticoagulant potential of *Turnera subulata* (Passifloraceae). *J. Med. Food* 2019, 22, 384–392.

Matés, J. M., & Sánchez-Jiménez, F. M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: Implications for cancer therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32(2), 157–170. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00088-6)

Ministério da Saúde. (2015). MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Harpagophytum procumbens* DC. ex Meissn. (“GARRA-DO-DIABO”). Brasília, 5. <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/05/Monografia-Harpagophytum.pdf>

Moharrami 2021.pdf. (n.d.).

Montanher, A. B., Zucolotto, S. M., Schenkel, E. P., & Fröde, T. S. (2007). Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.031>

Muslim, N. S., Nassar, Z. D., Aisha, A. F. A., Shafaei, A., Idris, N., Majid, A. M. S. A., & Ismail, Z. (2012). Antiangiogenesis and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pithecellobium jiringa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-210>

Narayan, M. S., Naidu, K. A., Ravishankar, G. A., Srinivas, L., & Venkataraman, L. V. (1999). Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 60(1), 1–4. <https://doi.org/10.1054/plef.1998.0001>

Nascimento, M. A., Silva, A. K., França, L. C. B., Quignard, E. L. J., López, J. A., & Almeida, M. G. (2006). *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 97(12), 1387–1391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.009>

Nunes, C.D.R.; Barreto, M.B.; Pereira, S.M.F.; Cruz, L.L.; Passos, M.S.; Moraes, L.P.; Vieira, I.J.C.; Oliveira, D.B. Plants as sources of anti-inflammatory agents. *Molecules* 2020, 25, 3726.

Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, Å., & Duan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7264–7271. <https://doi.org/10.1021/jf030479p>

Palhares, L.C.G.F.; Brito, A.S.; Lima, M.A.; Nader, H.B.; London, J.A.; Barsukov, I.L.; Andrade, G.P.V.; Yates, E.A.; Chavante, S.F. A further unique chondroitin sulfate from the shrimp *Litopenaeus vannamei* with antithrombin activity that modulates acute inflammation. *Carbohydr. Polym.* 2019, 222, 115031.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Park, J. W., Kwon, O. K., Ryu, H. W., Paik, J. H., Paryanto, I., Yuniato, P., Choi, S. H., Oh, S. R., & Ahn, K. S. (2018). Anti-inflammatory effects of *Passiflora foetida* L. In LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(6), 3709–3716. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3559>

Puangpraphant, S.; Cuevas-Rodríguez, E.O.; Oseguera-Toledo, M. Anti-inflammatory and antioxidant phenolic compounds. In *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress*; Levy, N., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 165–180.

Rahman, M. M., Islam, M. B., Biswas, M., & Khurshid Alam, A. H. M. (2015). In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1618-6>

Rao, A. S. V. C., Reddy, S. G., Babu, P. P., & Reddy, A. R. (2010). The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-4>

Rebouças, E. de L., da Silva, A. W., Rodrigues, M. C., Ferreira, M. K. A., Mendes, F. R. S., Marinho, M. M., Marinho, E. M., Pereira, L. R., Araújo, J. I. F. de, da Silva, J. Y. G., Moura, L. F. W. G., Magalhaes, F. E. A., Salles Trevisan, M. T., dos Santos, H. S., Marinho, E. S., & Guedes, M. I. F. (2021). Antinociceptive, anti-inflammatory and hypoglycemic activities of the ethanolic *Turnera subulata* Sm. flower extract in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 1–13. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1981449>

Rehman, S. U., Shah, S. A., Ali, T., Chung, J. Il, & Kim, M. O. (2017). Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. *Molecular Neurobiology*, 54(1), 255–271. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9604-5>

Rempelos, L.; Almuayrifi, A.M.; Baranski, M.; Tetard-Jones, C.; Eyre, M.; Shotton, P.; Cakmak, I.; Ozturk, L.; Cooper, J.; Volakakis, N.; et al. Effects of agronomic management and climate on leaf phenolic profiles, disease severity, and grain yield in organic and conventional wheat production systems. *J. Agric. Food. Chem.* 2018, 66, 10369–10379.

Serafini, M.; Peluso, I.; Raguzzini, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* 2010, 69, 273–278.

Sharma, R.; Padwad, Y. Plant polyphenol-based second-generation synbiotic agents: Emerging concepts, challenges, and opportunities. *Nutrition* 2020, 77, 110785.

Shin, S.A.; Joo, B.J.; Lee, J.S.; Ryu, G.; Han, M.; Kim, W.Y.; Park, H.H.; Lee, J.H.; Lee, C.S. Phytochemicals as anti-inflammatory agents in animal models of prevalent inflammatory diseases. *Molecules* 2020, 25, 5932.

Souza, N.C.; Oliveira, J.M.; Morrone, M.D.S.; Albanus, R.D.; Amarante, M.D.S.M.; Camillo, C.D.S.; Langassner, S.M.Z.; Gelain, D.P.; Moreira, J.C.F.; Dalmolin, R.J.S.; et al. *Turnera subulata*: Anti-inflammatory properties in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Med. Food* 2016, 19, 922–930.

Szewczyk, K.; Zidorn, C. Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *J. Ethnopharmacol.* 2014, 152, 424–443.

WATERHOUSE, A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, p. 3-5, 2006.

Wu-Yang Huang, Yi-Zhong Cai & Yanbo Zhang (2009) Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention, *Nutrition and Cancer*, 62:1, 1-20, DOI: 10.1080/01635580903191585.

Yang, Y.; Saand, M.A.; Abdelaal, W.B.; Zhang, J.; Wu, Y.; Li, J.; Fan, H.; Wang, F. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of two coconut varieties reveals aromatic coconut cold-sensitive in response to low temperature. *J. Proteom.* 2020, 30, 103766.

Zaynab, M.; Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M.W.; Bahadar, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* 2018, 124, 198–202.

Zhang, L.; McClements, D.J.; Wei, Z.; Wang, G.; Liu, X.; Liu, F. Delivery of synergistic polyphenol combinations using biopolymerbased systems: Advances in physicochemical properties, stability and bioavailability.

