

**Aumento da atividade anticoagulante da varfarina e sua potencial interação com o extrato aquoso de goji berry (*Lycium barbarum* L.) em ratos Wistar**

**Increased warfarin anticoagulant activity and its potential interaction with aqueous extract of goji berry (*Lycium barbarum* L.) in Wistar rats**

**Aumento de la actividad anticoagulante de la warfarina y su suposible interacción con el extracto acuoso de la baya de goji (*Lycium barbarum* L.) en ratas Wistar**

Recebido: 10/12/2020 | Revisado: 15/12/2020 | Aceito: 18/12/2020 | Publicado: 24/12/2020

**Gabriel Amoreli de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4581-3641>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [gabrielamoreli@hotmail.com](mailto:gabrielamoreli@hotmail.com)

**Maxsuel Ananias Camilo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6027-4845>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [maxsuel\\_ananias@hotmail.com](mailto:maxsuel_ananias@hotmail.com)

**Luís Gustavo Marques**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4849-6191>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [luisgm.farma@gmail.com](mailto:luisgm.farma@gmail.com)

**Carla Miguel de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2812-7647>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [carla\\_oliveira03@hotmail.com](mailto:carla_oliveira03@hotmail.com)

**Sônia Aparecida Figueiredo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2549-4273>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [soniaafigueiredo@hotmail.com](mailto:soniaafigueiredo@hotmail.com)

**Letícia Barbosa Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6976-1938>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [lbs2011@ufmg.br](mailto:lbs2011@ufmg.br)

**Ramon Alves de Oliveira Paula**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4562-0970>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [alvesfarmacia@yahoo.com.br](mailto:alvesfarmacia@yahoo.com.br)

**Fernanda Borges de Araújo Paula**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3077-3023>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [fernanda.paula@unifal-mg.edu.br](mailto:fernanda.paula@unifal-mg.edu.br)

**Maria Rita Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-002X>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [maria.ritarodrigues@unifal-mg.edu.br](mailto:maria.ritarodrigues@unifal-mg.edu.br)

**Stella Maris da Silveira Duarte**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6276-3420>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [stellaunifal@yahoo.com.br](mailto:stellaunifal@yahoo.com.br)

**Resumo**

O consumo de goji berry (*Lycium barbarum* L.) tem despertado interesse mundial devido suas excelentes propriedades nutricionais e funcionais, relacionada à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas decorrentes do estresse oxidativo, o classifica como um “super alimento”. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do extrato aquoso de goji berry nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos Wistar tratados com varfarina. A concentração de fenóis totais foi determinada pelo reagente Folin-Ciocalteu, enquanto a capacidade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: água destilada (veículo – controle negativo); alimentados diariamente com o extrato (0,18 g.Kg<sup>-1</sup>); tratados diariamente com água destilada e varfarina (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> – controle positivo) e aqueles tratados concomitantemente com o extrato e varfarina, durante sete dias. Nossos resultados demonstraram elevada quantidade de polifenóis (6,19 ± 0,3 mg EAG.g<sup>-1</sup>) no extrato aquoso a 10 % (m.v<sup>-1</sup>) e sugerem considerável atividade antioxidante (IC<sub>50</sub> 1068 µg.mL<sup>-1</sup>). Não observamos diferenças significativas entre os perfis bioquímicos e hematológicos, ou sequer sinais de toxicidade do extrato quando administrado sozinho. Os dados provenientes do uso concomitante com a varfarina são impressionantes e mostram aumento significativo no tempo de protombina, com a

potencialidade de sangramento. Coletivamente, essas observações sugerem a propensão de uma interação clinicamente importante entre a varfarina e o *Lycium barbarum* L., o que compromete a segurança deste medicamento e lança luz para pesquisas futuras relacionadas a uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares envolvidos.

**Palavras-chave:** Assistência à saúde; Interações alimento-droga; Tempo de protrombina; Tromboembolia venosa.

### **Abstract**

The consumption of goji berry (*Lycium barbarum* L.) has aroused worldwide interest due to its excellent nutritional and functional properties, related to the reduced risk of developing chronic diseases due to oxidative stress, being classified as a “super food”. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of aqueous extract of goji berry on hematological and biochemical parameters in Wistar rats treated with warfarin. The concentration of total phenols was determined by the Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant capacity determined by the DPPH test. The animals were divided into four experimental groups: distilled water (vehicle - negative control); fed daily with the extract (0.18 g.Kg<sup>-1</sup>); treated daily with water and warfarin (0.5 mg.Kg<sup>-1</sup> - positive control) and those treated concomitantly with the extract and warfarin, for seven days. Our results showed a high amount of polyphenols (6.19 ± 0.3 mg EAG.g<sup>-1</sup>) in the 10 % aqueous extract (m.v<sup>-1</sup>) and suggests considerable antioxidant activity (IC<sub>50</sub> 1068 µg.mL<sup>-1</sup>). We did not observe significant differences between the biochemical and hematological profiles, or even signs of toxicity of the extract when administered alone. The data from concomitant use with warfarin are impressive and show a significant increase in prothrombin time, with the potential for bleeding. Collectively, these observations suggest the propensity for a clinically important interaction between warfarin and *Lycium barbarum* L., which compromises the safety of this drug and sheds light on future research related to a deeper understanding of the molecular mechanisms involved.

**Keywords:** Delivery of health care; Food-drug interactions; Prothrombin time; Venous thromboembolism.

### **Resumen**

El consumo de la baya de goji (*Lycium barbarum* L.) ha despertado un interés a nivel mundial debido a sus excelentes propiedades nutricionales y funcionales, relacionadas con la disminución del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas derivadas del estrés oxidativo,

clasificándolo como un “super alimento”. Por lo tanto, el objetivo de este estudio ha sido evaluar los efectos del extracto acuoso de la baya de goji sobre parámetros hematológicos y bioquímicos en ratas Wistar tratadas con warfarina. La concentración de fenoles totales se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, mientras que la capacidad antioxidante fuera determinado mediante la prueba DPPH. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales: agua destilada (vehículo - control negativo); alimentado diariamente con el extracto (0,18 g.Kg<sup>-1</sup>); tratados diariamente con agua y warfarina (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> - control positivo) y los tratados simultáneamente con el extracto y warfarina, a lo largo de siete días. Nuestros resultados mostraron una alta cantidad de polifenoles (6,19 ± 0,3 mg EAG.g<sup>-1</sup>) en el extracto acuoso al 10 % (m.v<sup>-1</sup>) y sugieren una actividad antioxidante considerable (IC<sub>50</sub> 1068 µg.mL<sup>-1</sup>). No hemos observado diferencias significativas entre los perfiles bioquímicos y hematológicos, o siquiera signos de toxicidad del extracto cuando se administra solamente el. Los datos provenientes del uso concomitante con warfarina son impresionantes y muestran un aumento significativo del tiempo de protrombina, con potencial de hemorragia. Conjuntamente, estas observaciones sugieren la propensión a una interacción clínicamente importante entre warfarina y *Lycium barbarum* L., lo que compromete la seguridad de este fármaco y nos aclara para la búsqueda de futuras investigaciones relacionadas con una comprensión más exhaustiva de los mecanismos moleculares implicados.

**Palabras clave:** Asistencia sanitaria; Interacciones alimento-medicamento; Tiempo de protrombina; Tromboembolia venosa.

## 1. Introdução

A crescente procura por alimentos que apresentem características sensoriais e funcionais atraentes aos consumidores, bem como relacionadas a busca por uma melhor qualidade de vida, incrementa o estudo dos alimentos (Cañizares et al., 2020). Evidências científicas mostraram que o fruto do *Lycium barbarum*, denominado goji berry ou wolfberry (European Pharmacopoeia Commission, 2019), é uma fonte substancial de ácidos orgânicos e valiosos compostos bioativos (Donno et al., 2015; Lopatriello et al., 2017; Rocchetti et al., 2018), além de carboidratos (Montesano et al., 2016), vitaminas, minerais (Llorent-Martínez et al., 2013) e ácidos graxos benéficos, como o linoleico e mirístico (Blasi et al., 2017). Além disso, pode estar relacionada a um amplo espectro de propriedades biológicas: imunomoduladores (Ren et al., 2012), antitumorais (Tang et al., 2012), na saúde epitelial do intestino (Wang et al., 2019); anti-diabéticos (Tang et al., 2015) e anti-envelhecimento

(Wojdyło, Nowicka & Bąbelewski, 2018). O conjunto dessas características permite a sua denominação como um “super alimento” (Yao, Heinrich & Weckerle, 2018).

Por outro lado, existe uma convicção popular de que fitoterápicos, por serem naturais, são sempre seguros para o consumo (Zhang, Tian & Xie, 2015). No entanto, esse raciocínio pode ser enganoso diante da possibilidade de sua interação com medicamentos. Tal situação adquire contornos preocupantes em razão do amplo acesso e aquisição de plantas medicinais no Brasil, comercializadas sem qualquer restrição (Leung et al., 2008; Leite et al., 2016).

A varfarina é um anticoagulante oral indicado para a prevenção e tratamento de doenças tromboembólicas importantes no contexto da saúde pública, como embolia sistêmica e tromboembolismo venoso (Baker et al., 2009; Piatkov et al., 2010). Por apresentar baixo índice terapêutico, torna crucial um monitoramento rigoroso do paciente, a fim de avaliar a resposta da dose e o seu ajuste para evitar a ocorrência de sangramento. Ainda hoje, apesar de disponíveis no mercado outras opções terapêuticas que não exigem esse acompanhamento laboratorial, a varfarina permanece amplamente prescrita em todo mundo, há mais 60 anos (Pirmohamed et al., 2015).

Até onde sabemos, as evidências científicas documentadas sobre a associação entre *Lycium barbarum* e varfarina são escassas e envolvem somente quatro publicações anteriores. Lam, Elmer & Mohutsky (2001) descreveram um caso de uma paciente chinesa de 61 anos com um aumento na Razão Normalizada Internacional (RNI) para 4,1 após ingerir chá de *Lycium barbarum* L. e varfarina. Este episódio também foi demonstrado por Leung et al. (2008), ao mencionarem uma mulher chinesa (80 anos), apresentando uma RNI de 4,97 e 3,86 depois de consumir chá de ervas contendo este fitoterápico. Rivera et al. (2012) relataram esta correlação entre uma equatoriana-americana de 71 anos com uma RNI indeterminada (>120 segundos), possivelmente após a ingestão de suco de goji e o anticoagulante supracitado. Por fim, Zhang, Tian & Wie (2015) relataram esta ação adversa em um homem chinês de 65 anos (RNI = 3,84) posterior a ingestão de vinho de goji berry. Tais achados são tidos como clinicamente relevantes e, sem dúvida, comprometem a eficácia do tratamento, aumentam os seus custos e as readmissões hospitalares, bem como a consequente sobrecarga do sistema de saúde.

Os exemplos acima sugerem uma provável interação deste fitoterápico na farmacocinética da varfarina. Isso abre caminho para uma investigação mais minuciosa, de forma a compreender os mecanismos envolvidos e preencher as lacunas existentes. Portanto, levantamos a hipótese de que o *Lycium barbarum*, como fonte de compostos bioativos, pode influenciar na coagulação sanguínea e, conseqüentemente, alterar o tempo de protombina.

Assim, o objetivo deste estudo é a análise da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos totais do extrato aquoso de goji berry, por meio de testes *ex vivo e in vitro*. Além disso, investigamos os efeitos deste extrato sobre os parâmetros hepáticos e hematológicos em ratos Wistar adultos saudáveis e anticoagulados com varfarina.

## 2. Metodologia

### 2.1 Material vegetal

Nesta pesquisa laboratorial de natureza quantitativa (Pereira et al. 2018), amostras de goji-berry (*Lycium barbarum*) foram adquiridas no comércio local de Alfenas-MG, Brasil, em agosto de 2019. Em seguida, foram armazenadas a -20 °C até as análises. Além disso, no momento da aquisição, observou-se a disponibilidade das informações apresentadas nas embalagens quanto a presença de sua interação com medicamentos.

### 2.2 Obtenção dos extratos aquosos

Os frutos de goji-berry foram submetidos a secagem em estufa com circulação de ar (Nova Ética<sup>®</sup>, Brasil) por 96 horas/45 °C. Posteriormente, foram triturados em moinho de facas (Marconi<sup>®</sup>, Brasil) e tamisados (granulometria igual ou inferior a 0,42 mm/40 mesh) para conferir uniformidade. O preparo dos extratos procedeu-se de maneira a simular o processo tradicional de consumo humano do fitoterápico: infusão de 10 g da droga vegetal à 100 mL de água destilada a 90 °C, por 10 minutos. Com o intuito de padronizar as partículas insolúveis, essa mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo.

### 2.3 Determinação do teor de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais do extrato foi estabelecido pelo ensaio colorimétrico, adaptando o método já relatado por Woisk & Salatino (1998). Resumidamente, 0,1 mL (91 mg.mL<sup>-1</sup>) de amostra foram adicionadas a 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Merck<sup>®</sup>, Alemanha) diluído em água destilada (1:10). Decorridos oito minutos, adicionou-se 0,4 mL da solução de carbonato de sódio a 4 % (m.v<sup>-1</sup>) e, após agitação manual, os tubos foram incubados a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por duas horas, evitando a exposição à luz. Posteriormente, determinou-se em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão) a absorbância a  $\lambda$  740 nm. Por fim, os resultados foram calculados por regressão linear, utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações entre 0,1–13 mg.mL<sup>-1</sup> e os

resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalentes por grama de extrato ( $\text{mg.GAE g}^{-1}$ ) ( $y = 0,1101 x - 0,028$ ;  $R^2 = 0,9996$ ).

## 2.4 Determinação da atividade antioxidante

### 2.4.1 Análises *in vitro*

A porcentagem de atividade antioxidante foi realizada pelo método de captura de radicais livres 1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl (DPPH), de acordo com Hatano et al. (1988). À 4 mL de diferentes diluições do extrato aquoso ( $2275\text{--}71,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi adicionado 1 mL da solução de DPPH ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em etanol ( $\geq 96 \%$ , Vetec<sup>®</sup>, Brasil). A mistura foi armazenada em tubo de ensaio âmbar e agitada manualmente. Decorridos 30 minutos em repouso a temperatura ambiente ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), a absorvância foi determinada espectrofotometricamente a  $\lambda$  517 nm (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão). A atividade sequestrante de radicais DPPH foi expressa em porcentagem e o BHT foi utilizado como controle.

A descoloração do radical DPPH em porcentagem, foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - [(A_{\text{cont}} - A_{\text{Extr}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Em que:  $A_{\text{cont}}$  foi a absorvância do controle (DPPH, Vetec<sup>®</sup>, Brasil) e  $A_{\text{Extr}}$  a absorvância da amostra em solução.

### 2.4.2 Análises *in vivo* e desenho experimental

Após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Alfenas, Brasil (CEUA, protocolo n<sup>o</sup> 041/2019), ratos machos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando 250–290 g, provenientes do Biotério Central da Universidade supracitada foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável em condições ambientalmente controladas, ou seja: temperatura de  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas e umidade de  $80 \pm 5 \%$ . Receberam água destilada e ração comercial *ad libitum*. Para indução da anticoagulação foram administradas doses únicas diárias de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de varfarina (Li et al., 2016), dois dias antes da eutanásia, no mesmo horário.

Os animais foram sistematicamente divididos em quatro grupos experimentais de seis ratos cada:

Grupo 1: controle negativo (água destilada);



Grupo 2: extrato aquoso de goji berry (2 mL.Kg<sup>-1</sup> de extrato aquoso de goji berry);

Grupo 3: controle positivo (ratos tratados diariamente com 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> de varfarina e água destilada);

Grupo 4: ratos tratados concomitantemente com extrato aquoso de goji berry e varfarina.

O extrato foi administrado por gavagem, uma vez ao dia, por sete dias, em idêntico horário, pelo mesmo experimentador, assim como a água destilada do controle. A dose diária incorporada foi de 2 mL.kg<sup>-1</sup>, proporcional a uma xícara (140 mL) de extrato de goji berry em um humano de 70 Kg. No oitavo dia, os animais foram anestesiados com isoflurano 100 % (Cristália<sup>®</sup>, Brasil) para coleta do sangue por punção cardíaca, o qual foi adicionado em tubos contendo EDTA para realização do hemograma; em tubos com citrato para estimativa do tempo de protrombina; e em tubo seco para obtenção de soro. Logo após, estes animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca com o animal anestesiado, para a retirada do fígado. O sangue colhido em citrato foi centrifugado (1.000 x g, Fanem<sup>®</sup>, Brasil) por 10 minutos para separação do plasma e, o sangue em tubo seco, para obtenção do soro. O tecido hepático foi lavado com solução salina 0,9 % e congelado a -20 °C submerso em solução tampão fosfato (pH 7,4).

### **2.4.3 Determinação da inibição da peroxidação de lipídeos no tecido hepático**

A peroxidação de lipídios foi medida pela formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), empregando o método de Winterbourn, Gutteridge & Halliwell (1985), como se segue.

#### **2.4.3.1 Preparação do homogenato**

Amostras de fígado foram pesadas e maceradas em homogeneizador de tecidos (Tecnal<sup>®</sup>, Brasil) em banho de gelo, com solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 (volume equivalente a quatro vezes o peso fresco de tecido). O homogeneizado foi centrifugado (Fanem<sup>®</sup>, Brasil) a 3.000 x g, durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e utilizado nos ensaios.

#### **2.4.3.2 Determinação do teor de proteína total**



Alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram adicionadas a 750 µL de ácido fosfórico 1,22 mol.L<sup>-1</sup>, 750 µL de ácido tiobarbitúrico 0,67 % (p.v<sup>-1</sup>, em ácido acético glacial) e 1350 µL de água destilada, agitadas em vórtex (IKA<sup>®</sup> MS1 Minishaker). Essa mistura foi aquecida em banho de água a 90 °C, por 10 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, até a temperatura ambiente, foram adicionados 1,8 mL de metanol (Merck<sup>®</sup>, Alemanha), agitando-se e, em seguida, procedendo-se a centrifugação por cinco minutos a 900 x g. A fração contendo metanol foi recolhida e utilizada para a determinação da absorbância (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão) a  $\lambda$  532 nm. A concentração de TBARS foi calculada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3 tetraetoxipropano) e os resultados expressos como micrograma de MDA por grama de proteína (µM de MDA/g de proteína). A proteína total do homogeneizado do fígado foi quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

#### **2.4.4 Realização do hemograma**

Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: hemácia, hemoglobina e plaqueta. Procedeu-se a análise utilizando amostras de sangue coletado em tubos contendo EDTA, processadas em um contador hematológico automático de células Counter 19<sup>®</sup> (Wiener Lab, Argentina), previamente calibrado conforme orientação do fabricante.

#### **2.4.5 Realização do tempo de protrombina**

Procedeu-se a leitura em coagulômetro automático Quick-timer<sup>®</sup> (Drake, Brasil), segundo a metodologia proposta por Quick, Stanley-Brown & Bancroft (1935). Os resultados foram expressos em relação a RNI.

#### **2.4.6 Avaliação da função hepática**

As análises bioquímicas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina, creatinina e proteínas totais foram realizadas pelo método colorimétrico em 0,5 mL de soro dos animais, utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica<sup>®</sup>, Brasil) e cumprindo rigorosamente as instruções do fabricante. Procedeu-se as leituras no analisador automático Labmax Plenno<sup>®</sup> do fabricante supracitado, recém calibrado (Calibra H) e aferido com soro controle (Qualitrol 1H e 2H) da mesma marca.

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Posteriormente, com o propósito de comparar as médias, utilizou-se o teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, usando o programa GraphPad Prism, versão 7.01 (GraphPad®, EUA).

## 3. Resultados e Discussão

Diversos metabolitos secundários oriundos de produtos naturais são relacionados às propriedades antioxidantes, sendo os compostos fenólicos aqueles mais eficazes (Guo et al., 2020; Navajas-Porras et al., 2020). Estas substâncias têm a capacidade de inativar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em razão da presença de grupos –OH diretamente ligados a anéis aromáticos, que podem quelar metais pró-oxidativos, ativar enzimas antioxidantes, inibir a peroxidação lipídica e também promover reação oxidativa *in vitro* (Nieva-Rchevarría, Goicoechea & Guillén, 2017; Olszowy, 2019).

É sabido que os compostos fenólicos são os principais componentes bioativos responsáveis pela atividade antioxidante das frutas (Ge et al., 2021; Lou et al., 2020), e, diante dos seus benefícios, passaram a ser explorados em diversas áreas. Por exemplo, sua incorporação à dieta de consumidores que procuram alimentos funcionais (Pogačnik, Ota & Ulrih, 2020), além de representarem uma boa alternativa aos antioxidantes sintéticos nas indústrias de alimentos e medicamentos, por ser considerado um ingrediente seguro (Olszowy, 2019; Food Ingredients & Packaging, 2019).

Pesquisas anteriores indicaram que o goji berry é uma fonte valiosa de ácidos cafeico, p-coumárico, ferúlico e clorogênico, rutina, quercetina, morina, mircetina, apigenina, miricitrina, catequina, epicatequina e o kaempferol (Qian, Liu & Huang, 2004; Le, Chiu, & Ng, 2007; Forino et al., 2016; Protti et al., 2017; Conidi, Drioli & Cassano, 2020).

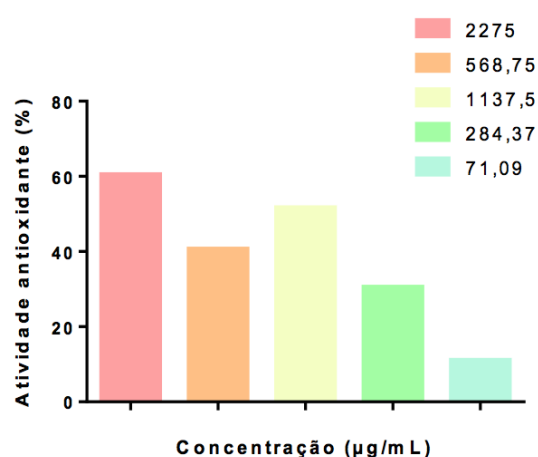
No presente estudo verificou-se um teor de fenólicos totais de  $6,08 \pm 1,18$  mg.EAG.g<sup>-1</sup>, expressos como equivalente de ácido gálico (EAG). Este resultado é superior ao encontrado em muitas das frutas consumidas no Brasil (Alara et al., 2019; Denger et al., 2019; Pedro et al., 2019). Além disso, Skenderidis et al. (2019) observaram para espécies coletadas em diferentes meses na Grécia, resultados semelhantes aos aqui relatados ( $6,19 \pm 0,3$  mg.EAG.g<sup>-1</sup>) e superiores aos  $2,68$  mg EAG.100g<sup>-1</sup> obtidos por Donno et al.

(2015), em frutos provenientes da Itália, e também aos relatados por Rocchetti et al. (2018) e Benchennouf et al. (2016).

As diferenças encontradas acima podem ser justificadas a fatores que vão desde o ambiente de onde a planta foi coletada, como composição do solo, umidade, condições climáticas, estágio de maturação, presença de predadores, até as condições extrativas, tais quais a seletividade e polaridade do solvente, pH, temperatura e método extrativo (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Žlabur et al., 2020).

O ensaio de DPPH (Figura 1) foi utilizado para avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres do extrato aquoso do goji berry. A Figura 1 apresenta a porcentagem de atividade antioxidante encontrada para diferentes concentrações do extrato (2275,00 – 71,09  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

**Figura 1.** Atividade sequestrante de radical DPPH do extrato aquoso de goji berry.



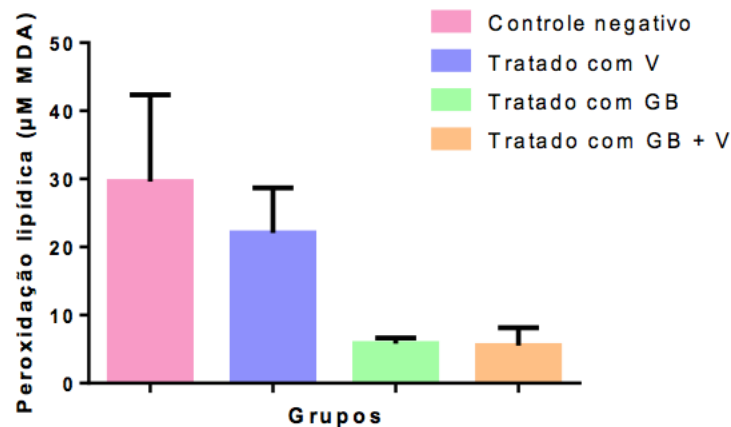
Fonte: Autores (2020).

Neste teste obteve-se um valor de  $\text{CE}_{50}$  (concentração necessária para causar 50 % do efeito) de  $1068 \mu\text{g.mL}^{-1}$  superiores aos  $1150 \pm 7,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  obtidos por Skenderidis et al. (2019) em frutos coletados na Grécia (Skenderidis et al. 2019). Já Yang et al. (2013) ao testar compostos isolados da *L. Barbarum* encontraram  $\text{CE}_{50}$  de  $58,1 \pm 9,3 \mu\text{M}$  (Yang et al., 2013). Para compostos isolados, Mocan et al. (2018) obtiveram resultados que variaram  $8,79 \pm 0,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $9,35 \pm 0,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Estimar a extensão da peroxidação lipídica tem grande importância em diversas patologias associadas ao estresse oxidativo, em que espécies reativas de oxigênio atacam várias classes de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (Tsikas, 2017). A Figura

2 mostra os resultados encontrados de índice de inibição peroxidação lipídica em fígado de ratos para os quatro grupos de animais.

**Figura 2.** Índice de inibição da peroxidação de lipídeos em fígado de ratos com diferentes tratamentos.



V: varfarina; GB: extrato aquoso de goji berry. Fonte: Autores (2020).

É interessante observar que os animais tratados apenas com o extrato aquoso do Goji berry tiveram uma considerável diminuição da peroxidação lipídica.

O resultado das análises dos parâmetros hematológicos evidenciou que não houveram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) entre o controle negativo (água destilada) e os animais que receberam diariamente (por sete dias) apenas o extrato ( $2 \text{ mL.Kg}^{-1}$ ), em relação ao número de hemácias, hemoglobina e plaquetas (Tabela 1) sugerindo uma aparente “segurança” no consumo de goji berry, uma vez que níveis anormais destes biomarcadores podem indicar diversos desequilíbrios fisiológicos, tais como inflamações, eventos tromboembólicos, hemorragias, processos infecciosos e hemólise (Sherkatolabbasieh, Firouzi & Shafizadeh, 2020). Por outro lado, se considerarmos a alta meia vida das hemácias (120 dias), são necessárias novas pesquisas com um tempo de tratamento maior para constatação de eventuais alterações nestas células. No entanto, ficou claro que a ingestão do extrato não induziu a hemólise.

Os testes bioquímicos avaliaram os níveis de aminotransferases, albumina e proteínas séricas (Tabela 1). A aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são enzimas encontradas principalmente no fígado, mas também pode ser secretadas em menores quantidades por outros órgãos, tais como rins e coração (Rasool et al., 2020). Estas enzimas são utilizadas como biomarcadores para triagem de funções hepáticas (Zhang et al., 2020).

Nossos resultados mostram que não foi observada nenhuma alteração significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ), o que pode indicar a ausência de toxicidade no tecido hepático nas doses administradas apenas com o extrato de goji berry e naquelas com uso concomitante de goji berry e varfarina. Cumpre destacar, que até onde sabemos, dados hematológicos provenientes da administração de goji berry e varfarina estão sendo esclarecidos pela primeira vez nessa pesquisa.

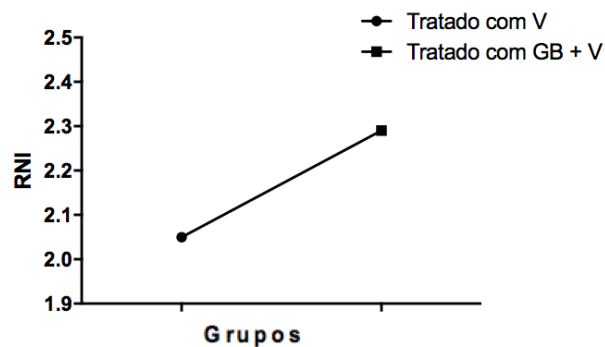
**Tabela 1.** Parâmetros hematológicos de ratos com diferentes tratamentos, após sete dias.

Parâmetros	Grupos			
	Controle negativo	Goji berry	Varfarina	Goji berry + varfarina
Hemácia	8,099 ± 0,45	8,103 ± 0,67	-	-
Hemoglobina	13,3 ± 1,69	14,050 ± 1,54	-	-
Plaqueta	582,17 ± 1,05	491,08 ± 1,41	-	-
Albumina (mg/dL)	3,90 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,41 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,17 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,15 <sup>a</sup>
Proteínas séricas (mg/dL)	6,53 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,73 ± 0,31 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,17 <sup>a</sup>	6,06 ± 0,32 <sup>a</sup>
AST (mg/dL) <sup>1</sup>	109,66 ± 18,01 <sup>a</sup>	98,53 ± 0,23 <sup>a</sup>	110,56 ± 13,31 <sup>a</sup>	101,91 ± 5,19 <sup>a</sup>
ALT (mg/dL) <sup>2</sup>	49,25 ± 9,02 <sup>a</sup>	54,49 ± 5,01 <sup>a</sup>	50,67 ± 7,04 <sup>a</sup>	55,55 ± 8,18 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>AST: aspartato aminotransferase; <sup>2</sup>ALT: alanina aminotransferase. Fonte: Autores (2020).

O controle do nível de anticoagulação foi feito pelo tempo de protrombina (TP) e os resultados foram expressos na RNI (Figura 3). O TP é o ensaio mais utilizado para monitoramento do índice terapêutico e da segurança da terapia anticoagulante, pois avalia os fatores II, V, VII e X da coagulação, fornecendo dados referentes ao risco de sangramento ou ao estado de coagulação dos pacientes. Estes dados são fundamentais para a avaliação de novas alternativas aos anticoagulantes tradicionais (Silva et al., 2020).

**Figura 3.** Razão Normalizada Internacional de ratos com diferentes tratamentos.



V: varfarina; GB: extrato aquoso de goji bery. Fonte: Autores (2020).

Observou-se que os animais tratados apenas com o extrato aquoso de goji bery não tiveram alterações significativas no TP ( $p > 0,05$ ). Além disso, a Figura 3 mostra que o RNI foi de 2,05 e 2,29 para os ratos tratados apenas com varfarina e tratados com goji berry + varfarina, respectivamente. É interessante notar que todos nossos resultados estão dentro da faixa terapêutica segura de RNI, que vai de 2,0 a 3,0. Pontuamos que, quando tal índice é menor que o referido intervalo, há o risco de trombose; por sua vez, quando maior, existe o risco de sangramento (Rudasill, Liu & Kamath, 2019). Neste aspecto, os indicadores mostram que a ingestão de extrato em ratos anticoagulados aumentou o RNI, indicando uma provável interação entre eles. Este fato, adquire contornos ainda mais preocupantes ao se constatar que nenhuma frase de alerta estava disponível na rotulagem das amostras adquiridas para a realização deste estudo. Por fim, podemos sugerir que a dose administrada de 0,18 g de goji bery/kg foi segura para estes animais. Já para humanos, uma dose diária de *L. barbarum* de 6 g por três dias não afetou o RNI de três pacientes com valores cardíacos protéticos que estavam fazendo uso com varfarina (Zhang, Tian & Xie, 2015).

A varfarina é um anticoagulante oral antagonista da vitamina K, comercialmente encontrado como uma mistura racêmica de varfarina R e S, sendo que cada enantiômero é metabolizado por enzimas distintas. A S-varfarina é metabolizada principalmente pela enzima CYP2C9. Então, qualquer composto que provoque a sua inibição pode diminuir o metabolismo da S-varfarina, aumentando seu efeito, o que é particularmente perigoso, já que este é o isômero mais potente (Kaminsky & Zhang, 1997). Dentre os possíveis inibidores desta enzima está o goji berry, sendo que na literatura já foram publicados alguns trabalhos associando o consumo de produtos à base desta fruta com o aumento da RNI em pacientes usuários de varfarina. Como nestes manuscritos a quantidade de fruta consumida pelos

pacientes alternou consideravelmente, os aumentos do RNI também foram bastante distintos, variando entre 3,86 a 4,97 (Lam, Elmer & Mohutsky, 2001; Leung et al., 2008; Ulbricht et al., 2008; Rivera et al., 2012; Zhang, Tian & Xie, 2015).

É interessante notar que a maioria dos estudos com o goji berry são direcionados apenas em polissacarídeos, considerando-os como os principais componentes bioativos deste fruto (Tang et al., 2015; Yang et al., 2015; Wu et al., 2018). Entretanto, muitos destes manuscritos falham ao não levar em consideração que extratos vegetais são amostras complexas, sendo possível obter várias classes de metabólitos secundários com as mesmas condições extrativas (Annadurai et al., 2021). Dessa forma, sem mais análises, é difícil atribuir a atividade antioxidante à somente um grupo de compostos específico, considerando o potencial antioxidante de diversas outras substâncias, como carotenoides (beta-caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, dipalmitato de zeaxantina, monopalmitato de zeaxantina, palmitato de beta-criptoxantina) e vitaminas (ácido ascórbico tiamina, riboflavina e tocoferol), já isolados de *Lycium barbarum* (Inbaraj et al., 2008; Wang et al., 2010; Amagase & Farnsworth, 2011; Wojdyło, Nowicka & Bąbalewski, 2018; Ahad et al., 2020; Skenderidis et al., 2019; Abuduaibifu & Tamer, 2019).

Assim, o presente estudo propõe um novo olhar para a composição fitoquímica do goji berry, estabelecendo uma correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante, por meio de um coeficiente Pearson positivo de 0,9127.

Como pontos positivos do presente estudo, podemos citar a eficiência da extração dos compostos fenólicos em água, o que é mais realístico se comparado a forma de consumo habitualmente empregada em humanos, além de corroborar uma abordagem ecologicamente correta. Em acréscimo, os resultados foram interpretados de acordo com diversos parâmetros, e não de forma isolada, na tentativa de responder os potenciais efeitos esperados.

#### **4. Conclusão**

Aqui, demonstramos que o extrato aquoso de goji berry a 10 % (g.mL<sup>-1</sup>) apresentou considerável capacidade sequestrante de radicais DPPH, diretamente relacionada a sua concentração, com um valor de IC<sub>50</sub> de 1068 µg.mL<sup>-1</sup>. Como esperado, foi verificado o efeito inibitório da peroxidação lipídica, com redução significativa dos seus níveis entre animais do controle negativo e tratados, evidenciando a potencialidade de influência positiva na saúde. Estes resultados podem estar diretamente relacionados ao elevado teor de compostos



fenólicos totais observado nas amostras, evidenciados por um alto coeficiente de correlação de Pearson (0,9127).

Considerando a elevada meia vida da hemácia (120 dias), possivelmente o tempo experimental de sete dias na concentração de 0,18 g.kg<sup>-1</sup> (equivalente a 140 mL/dia) não foi o bastante para observar diferença significativa nos parâmetros hematológicos entre os grupos. Porém, ficou evidente que o extrato não induziu a hemólise. Curiosamente, apesar de não ter sido detectada toxicidade no consumo do extrato, quando coadministrado com a varfarina, resultou no aumento da atividade anticoagulante, evidenciado pela elevação do tempo de protombina, observação também semelhante aos relatos clínicos em humanos já mencionados.

Esse cenário adiciona evidências importantes a respeito dessa interação, de potencial risco para pacientes em tratamento com este medicamento. Certamente, esse é um assunto importante, o que exige a adoção de estratégias que vão desde a disponibilização de frases de alerta na rotulagem do produto até a orientação de médicos e farmacêuticos acerca do gerenciamento dos pacientes, tanto na detecção, notificação, quanto no monitoramento rigoroso do RNI dos mesmos.

Por fim, nossos resultados fornecem subsídios para estudos futuros, mais detalhados, incluindo a análise antioxidante por outros métodos, como ATBS e FRAP, além da prospecção fitoquímica para identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato. Além disso, apesar dos esforços para superar as limitações aqui relatadas, o entendimento conclusivo do(s) possível(is) mecanismo(s) molecular(es) envolvidos nessa complexa resposta biológica, como o estudo da enzima P450, precisa ser amplamente explorado.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Unifal-MG pela oportunidade de realização dessa pesquisa.

### **Referências**

Abuduaibifu, A., & Tamer, C. E. (2019). Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), e14077. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14077>.

Ahad, H., Jin, H., Liu, Y., Wang, J., Sun, G., Liang, X., & Aisa, H. A. (2020). Chemical profiling of spermidines in goji berry by strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-

SPE) combined with ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS/MS). *Journal of Chromatography B*, 1137, 121923. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121923>.

Alara, O. R., Mudalip, S. K. A., Abdurahman, N. H., Mahmoud, M. S., & Obanijesu, E. O. (2019). Data on parametric influence of microwave-assisted extraction on the recovery yield, total phenolic content and antioxidant activity of *Phaleria macrocarpa* fruit peel extract. *Chemical Data Collections*, 24(1), 100277-100284. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2019.100277>.

Amagase, H., & Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44(7), 1702-1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.027>.

Annadurai, P., Annadurai, V., Yongkun, M., Pugazhendhi, A., & Dhandayuthapani, K. (2021). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Plecosperrum spinosum* Trecul. *Process Biochemistry*, 100(1), 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.031>.

Baker, W., Cios, D. A., Sander, S. D., & Coleman, C. I. (2009). Meta-analysis to assess the quality of warfarin control in atrial fibrillation patients in the United States. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 15(3), 244-252. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2009.15.3.244>.

Benchenouf, A., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Kokkalou, E. (2016). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 596-602. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1265987>.

Blasi, F., Montesano, D., Simonetti, M. S., & Cossignani, L. (2017). A simple and rapid extraction method to evaluate the fatty acid composition and nutritional value of goji berry lipid. *Food Analytical Methods*, 10(4), 970-979. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0652-x>.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Cañizares, L. C. C., Timm, N. S., Ramos, A. H., Neutzling, H. P., Ferreira, C. D., & Oliveira, M. (2020). Effects of moisture content and expansion method on the technological and sensory properties of white popcorn. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100282. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100282>.

Conidi, C., Drioli, E., & Cassano, A. (2020). Coupling ultrafiltration-based processes to concentrate phenolic compounds from aqueous goji berry extracts. *Molecules*, 25(16), 3761. <https://doi.org/10.3390/molecules25163761>.

Denger, A. P. F. L., Kawano, L. O., Paula, R. A. O., Santos, L. B., Rodrigues, M. R., Paula, F. B. A., Duarte, S. M. S. Determinação da atividade antioxidante e de fenóis totais do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) *Research, Society and Development*, 9(11), e 2859119781. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.9781>.

Donno, D., Beccaro, G. L., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., & Bounous, G. (2015). Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods*, 18(B), 1070-1085. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.020>.

European Pharmacopoeia Commission (2019). Barbary wolfberry fruit: *Lycii fructus*. In: European Pharmacopoeia Commission. *European pharmacopoeia*. (10. Ed., pp. 1332-1333). Strasbourg: Council of Europe.

Food Ingredients & Packaging (2019, Jun. 9). *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. Recuperado em: 04 de dezembro 2020, de <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>.

Forino, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., & Ciminiello, P. (2016). NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* (goji berries). Isolation and structural determination of a novel N-feruloyl tyramine dimer as the most abundant

antioxidant polyphenol of goji berries. *Food Chemistry*, 194, 1254-1259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.129>.

Ge, X., Jing, L., Zhao, K., Su, C., Zhang, B., Zhang, Q., Han, L., Yu, X., & Li, W. (2021, Jan 15). The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color. *Food Chemistry*, 335, 127655. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127655>.

Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374-381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. Recuperado em 15 out. 2020 de <https://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/25.pdf>.

Guo, Y., Amorati, R., & Valgimigli, L. (2020, Oct. 26). Synergic antioxidant activity of  $\gamma$ -terpinene with phenols and polyphenols enabled by hydroperoxyl radicals. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128468>.

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090-2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>.

Inbaraj, B. S., Lu, H., Hung, C. F., Wu, W. B., Lin, C. L., & Chen, B. H. (2008). Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC DAD-APCI MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4-5), 812-818. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.001>.

Kaminsky, L. S., & Zhang, Z.-Y. (1997). Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(1), 67-74. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(96\)00140-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(96)00140-4).

Lam, A. Y., Elmer, G. W., & Mohutsky, M. A. (2001). Possible interaction between Warfarin and *Lycium Barbarum* L. *Annals of Pharmacotherapy*, 35(10), 1199-1201. <https://doi.org/10.1345/aph.1Z442>.

Le, K., Chiu, F., & Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105(1), 353-363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.063>.

Leite, P. M., Castilho, R. O., Ribeiro, A. L. P., & Martins, M. A. P. (2016). Consumption of medicinal plants by patients with heart diseases at a pharmacist-managed anticoagulation clinic in Brazil. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 38(2), 223-227. <https://doi.org/10.1007/s11096-016-0270-0>.

Leung, H., Hung, A., Hui, A. C. F., & Chan, T. Y. K. (2008). Warfarin overdose due to the possible effects of *Lycium barbarum* L. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1860-1862. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.008>.

Li, H., Zhang, C., Fan, R., Sun, H., Xie, H., Luo, J., Wang, Y., Lv, H., Tang, T. (2016). The effects of Chuanxiong on the pharmacokinetics of warfarin in rats after biliary drainage. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.005>.

Llorent-Martínez, E. J., Fernández-de Córdova, M. L., Ortega-Barrales, P., & Ruiz-Medina, A. (2013). Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. *Microchemical Journal*, 110, 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.05.016>.

Lopatriello, A., Previtera, R., Pace, S., Werner, M., Rubino, L., Werz, O., Tagliatella-Scafata, O., & Forino, M. (2017). NMR-based identification of the major bioactive molecules from an Italian cultivar of *Lycium barbarum*. *Phytochemistry*, 144, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.08.016>.

Lou, X., Xu, H., Hanna, M., & Yuan, L. (2020). Identification and quantification of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolic compounds in hawthorn berry fruit (*Crataegus pinnatifida*) and antioxidant activity evaluation. *LWT*, 130, 109643. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109643>.

Mocan, A., Moldovan, C., Zengin, G., Bender, O., Locatelli, M., Simigiotis, M., Atalay, A., Vodnar, D. C., Rohn, S., & Crisan, G. (2018). UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their

antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 414-424. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.054>.

Montesano, D., Cossignani, L., Giua, L., Urbani, E., Simonetti, M. S., & Blasi, F. (2016). A simple HPLC-ELSD method for sugar analysis in Goji Berry. *Journal of Chemistry*, 2016(3), 1-5. <https://doi.org/10.1155/2016/6271808>.

Navajas-Porras, B., Pérez-Burillo, S., Morales-Pérez, J., Rufián-Henares, J. A., & Pastoriza, S. (2020). Relationship of quality parameters, antioxidant capacity and total phenolic content of EVOO with ripening state and olive variety. *Food Chemistry*, 325(1), 126926-126939. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126926>.

Nieva-Rchevarría, B., Goicoechea, E., & Guillén, M. D. (2017). Effect of liquid smoking on lipid hydrolysis and oxidation reactions during in vitro gastrointestinal digestion of European sea bass. *Food Research International*, 97(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.032>.

Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, 144(1), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>.

Pedro, A. C., Sánchez-Mata, M-C., Pérez-Rodríguez, M. L., Cámara, M., López-Colón, J. L., Bach, F., Bellettini, M., Haminiuk, C. W. I. (2019). Qualitative and nutritional comparison of goji berry fruits produced in organic and conventional systems. *Scientia Horticulturae*, 257(1), 108660-108668. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108660>.

Pereira, A. S., Shitsuka, M. S., Pereira, F. J., Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1).

Piatkov, I., Rochester, C., Jones, T., & Boyages, S. (2010). Warfarin toxicity and individual variability: clinical case. *Toxins*, 2(11), 2584-2592. <https://doi.org/10.3390/toxins2112584>.

Pirmohamed, M., Kamali, F., Daly, A. K., & Wadelius, M. (2015). Oral anticoagulation: a critique of recent advances and controversies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(3), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.01.003>.

Pogačnik, L., Ota, A., & Ulrih, N. P. (2020). An overview of crucial dietary substances and their modes of action for prevention of neurodegenerative diseases. *Cells*, 9(3), 576. <https://doi.org/10.3390/cells9030576>.

Protti, M., Gualandi, I., Mandrioli, R., Zappoli, S., Tonelli, D., & Mercolini, L. (2017). Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*Lycium spp.*) berries. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.048>.

Qian, J.-Y., Liu, D., & Huang, A. (2004). The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. *Food Chemistry*, 87(2), 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.11.008>.

Quick, A. J., Stanley-Brown, M., & Bancroft, F. W. (1935). A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *American Journal of the Medical Sciences*, 190(4), 501-511. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1650068>.

Rasool, A., Zulfajric, M., Gulzard, A., Hanafiahef, M. M., Unnisab, S. A., & Mahbooba, M. (2020). In vitro effects of cobalt nanoparticles on aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities of wistar rats. *Biotechnology Reports*, 26, e00453. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00453>.

Ren, Z., Na, L., Xu, Y., Rozati, M., Wang, J., Xu, J., Sun, C., Vidal, K., Wu, D., & Meidani, S. N. (2012). Dietary supplementation with lacto-wolfberry enhances the immune response and reduces pathogenesis to influenza infection in mice. *The Journal of Nutrition*. 142(8), 1596-1602. <https://doi.org/10.3945/jn.112.159467>.

Rivera, C. A., Ferro, C. L., Bursua, A. J., & Gerber, B. S. (2012). Probable interaction between *Lycium barbarum* (Goji) and Warfarin. *Pharmacotherapy*, 32(3), 50-53. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.2012.01018.x>.



Rocchetti, G., Chiodeli, G., Giuberti, G., Ghisoni, S., Baccolo, G., Biasi, F., Montesano, D., Trevisan, M., & Lucini, L. (2018). UHPLC-ESI-QTOF-MS profile of polyphenols in Goji berries (*Lycium barbarum* L.) and its dynamics during in vitro gastrointestinal digestion and fermentation. *Journal of Functional Foods*, 40, 564-572. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.042>.

Rudasill, S. E., Liu, J., & Kamath, A. F. (2019). Revisiting the International Normalized Ratio (INR) threshold for complications in primary total knee arthroplasty: an analysis of 21,239 cases. *The Journal of Bone and Joint Surgery: American Volume*, 101(6), 514-522. <https://doi.org/10.2106/JBJS.18.00771>.

Sherkatolabbasieh, H., Firouzi, M., & Shafizadeh, S. (2020). Evaluation of platelet count, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein levels in paediatric patients with inflammatory and infectious disease. *New Microbes and New Infections*, 37, 100725. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100725>.

Silva, V. M., Rezende, D. C., Garcia, E. S., Cavalheiro, C., & Strunz, C. C. (2020). Effect of anticoagulant adjustment on prothrombin time test using two different PT reagents in patients with elevated hematocrit. *Practical Laboratory Medicine*, 22, e00177. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2020.e00177>.

Skenderidis, P., Lampakis, D., Giavasis, I., Leontopoulos, S., Petrotos, K., Hadjichristodoulou, C., & Tsakalof, A. (2019). Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of Goji Berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) fruits. *Antioxidants*, 8(3), 60. <https://doi.org/10.3390/antiox8030060>.

Tang, W.-M., Chan, E., Kwok, C.-Y., Lee, Y.-K., Wu, J.-H., Wan, C.-W., Chan, R. Y.-K., Yu, P. H.-F., & Chan, S.-W. (2012). A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. *Inflammopharmacology*, 20, 307-314. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0107-3>.

Tang, H.-L., Chen, C., Wang, S.-K., & Sun, G.-J. (2015). Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L.

*International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 235-242.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.026>.

Tsikakos, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>.

Ulbricht, C., Chao, W., Costa, D., Rusie-Seamon, E., Weissner, W., & Woods, J. (2008). Clinical evidence of herb-drug interactions: a systematic review by the natural standard research collaboration. *Current Drug Metabolism*, 9(10), 1063-1120. <https://doi.org/10.2174/138920008786927785>.

Wang, C. C., Chang, S. C., Inbaraj, B.S., & Chen, B. H. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 120(1), 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.005>.

Wang, H., Zhang, S., Shen, Q., & Zhu, M.-J. (2019). A metabolomic explanation on beneficial effects of dietary Goji on intestine inflammation. *Journal of Functional Foods*, 53, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.014>.

Winterbourn, C. C., Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1985). Doxorubicin dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 1(1), 43-49. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90028-5).

Woisk, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>.

Wojdyło, A., Nowicka, P., & Bąbelewski, P. (2018). Phenolic and carotenoid profile of new goji cultivars and their anti-hyperglycemic, anti-aging and antioxidant properties. *Journal of Functional Foods*, 48, 632-642. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.061>.

Wu, D. T., Guo, H., Lin, S., Lam, S. C., Zhao, L., Lin, D. R., Qin, Wen. (2018). Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of *Lycium*

*barbarum* polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.016>.

Yang, X., Bai, H., Li, W. C. J., Zhou, Q., Wang, Y., Han, J., Zhu, X., Dong, M., & Hu, D. (2013). *Lycium barbarum* polysaccharides reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 204(3), 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.05.010>.

Yang, R., Zhao, C., Chen, X., Chan, S. & Wu, J. (2015). Chemical properties and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum*) polysaccharides extracted by different methods. *Journal of Functional Foods*, 17, 903-909. [tps://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.045](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.045).

Yao, R., Heinrich, M., & Weckerle, C. S. (2018). The genus *Lycium* as food and medicine: a botanical, ethnobotanical and historical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 50-66. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.010>.

Zhang, J., Tian, L. & Xie, B. (2015). Bleeding due to a probable interaction between warfarin and Gouqizi (*Lycium Barbarum* L.). *Toxicology Reports*, 2, 1209-1212. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.08.011>.

Zhang, G.-M., Zhang, G.-M., Hu, S., Peng, Y.-F., & Gu, B. (2020). Is testing of aspartate aminotransferase necessary along with every alanine aminotransferase for health check in elderly individuals? *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry*, 507, 224-227. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.003>.

Zhang, X., Li, X., Su, M., Du, J., Zhou, H., Li, X., & Ye, Z. (2020). A comparative UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics approach for distinguishing peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) fruit cultivars with varying antioxidant activity. *Food Research International*, 137(1), 109531-109543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109531>.

Žlabur, J. S., Žutić, I., Radman, S., Pleša, M., Brnčić, M., Barba, F. J., Rochetti, G., Lucini, L., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Brnčić, S. R., Galić, A., & Voća, S. (2020). Effect of different green extraction methods and solvents on bioactive components of chamomile

(*Matricaria chamomilla* L.) flowers. *Molecules*, 25(4), 810.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25040810>.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Gabriel Amoreli de Oliveira – 15 %  
Maxsuel Ananias Camilo – 15 %  
Luís Gustavo Marques – 15 %  
Carla Miguel de Oliveira – 5 %  
Sônia Aparecida Figueiredo – 5 %  
Letícia Barbosa Santos – 10 %  
Ramon Alves de Oliveira Paula – 10 %  
Fernanda Borges de Araújo Paula – 5 %  
Maria Rita Rodrigues – 5 %  
Stella Maris da Silveira Duarte – 15 %