



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NÍVEL DOUTORADO**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS DA  
CAATINGA E MATA ATLÂNTICA: ASPECTOS  
ETNOBOTÂNICOS E ECOLÓGICOS**

**THIAGO ANTONIO DE SOUSA ARAÚJO**

Recife, 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS DA  
CAATINGA E MATA ATLÂNTICA: ASPECTOS  
ETNOBOTÂNICOS E ECOLÓGICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas do Centro de Ciências da  
Saúde da Universidade Federal de  
Pernambuco

Área de Atuação: Obtenção e avaliação de  
produtos naturais e  
bioativos

**THIAGO ANTONIO DE SOUSA ARAÚJO**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque**

**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim**

Recife, 2012

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

A719a Araújo, Thiago Antonio de Sousa.  
Atividade antioxidante de plantas medicinais da caatinga e mata atlântica: aspectos etnobotânicos e ecológicos / Thiago Antonio de Sousa Araújo. – Recife: O autor, 2012.  
138 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Ulysses Paulino de Albuquerque.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.  
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Radicais Livres. 2. Colubrina. 3. Anacardiaceae. I. Albuquerque, Ulysses Paulino de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-156)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**Reitor**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**Vice-Reitor**

Silvio Romero de Barros Marques

**Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação**

Francisco de Sousa Ramos

**Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**Vice-diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Vânia Pinheiro Ramos

**Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Dalci José Brondani

**Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Antônio Rodolfo Santos de Faria

**Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

Nereide Stela Santos Magalhães

**Vice-Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

Ana Cristina Lima Leite



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
PRO-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 28 de maio de 2012.

Defesa de Tese de Doutorado de **Thiago Antônio de Sousa Araújo** defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de maio de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE, ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque**

(Depto. de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cecília de Fátima Castelo Branco Rangel de Almeida**

(Dept<sup>o</sup> de Licenciatura Ciências Biológica, Centro de Ensino Superior do vale do São Francisco- CESVASF).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Dr. Joabe Gomes de Melo**

(Laboratório de Etnobotânica Aplicada - LEA da Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Antônio Fernando Morais de Oliveira**

(Dept<sup>o</sup> Botânica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**QUARTO EXAMINADOR EXTERNO: Prof.Dr. Thiago Mendonça de Aquino**

(Dept<sup>o</sup> de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico aos meus pais **Iran Sérgio e  
Lúcia Luzia**, a minha esposa **Cybelle  
Albuquerque** e a minha filha **Maria  
Letícia**, motivos de minha luta, força e  
vontade de buscar sempre o melhor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro ao meu Deus por ter me dado força, coragem e pelas ótimas pessoas que Ele colocou junto comigo nesse minha nova caminhada;

Ao Professor Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque e ao amigo UPA pelo prestígio de poder ter aprendido ao mesmo tempo sobre Ciência, pessoas e amizade de modo tranquilamente agitado e profissionalmente descontraído;

A Professora Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim pelo apoio dado em todos os momentos, momentos estes que vão mais além do que ela mesma imagina;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e seus Professores pela oportunidade e ensinamentos;

A toda a comunidade do Carão e de Canaã pelo acolhimento e por todo aprendizado científico e sócio-político-cultural que fizeram mudar meu olhar sobre as pessoas, a Ciência e sobre mim mesmo;

A prefeitura municipal de Altinho e a prefeitura municipal de Araçoiaba, na pessoa dos secretários de agricultura e abastecimento e de saúde, respectivamente, pelo apoio logístico e político durante este trabalho;

Aos agentes de saúde do Carão, Senhores Inaldo e Alexandre e de Canaã, Mariinha, Fita e Dona Maria, pela disponibilidade em apresentar a comunidade as pessoas e seus costumes;

Aos grandes companheiros e irmãos do Laboratório de Etnobotânica Aplicada - LEA - Alysson, Cecília, Ernani, Flávia, Gustavo, Joabe, Luciana, Lucilene, Marcelo, Nelson, Patrícia, Taline, Vital, Washigton em especial André e Luciani que não mediram esforços para me ajudar e pelos ótimos momentos de discussões e descontrações;

Aos companheiros e amigos do Laboratório de produtos Naturais - LaProNat - Jeniffer, Henrique, Tadeu, Dani Lima, Dani Cabral, Clarissa, Elvis, Camila, e em especial Dani Sena e Valerium pelo incentivo, presteza e comprometimento e pelos momentos de alegria que fizeram este trabalho ainda mais prazeroso;

Aos novos amigos da Labmulti da UFRN, Dra. Graça Almeida, Gabriel Araújo, Lilian Solon, Naira e Leandro, pelo breve convívio que valeu por anos de aprendizado;

Ao meu Irmão Pedro, a minha Sogra Albanita e todos os meus familiares e amigos, pela compreensão das minhas ausências em alguns momentos e incentivo nesta jornada;

Ao povo Brasileiro e em especial ao povo Permabucano pelo financiamento dos meus estudos e formação, por meio da UPE, UFPE e FACEPE, o qual pretendo retribuir da melhor forma possível.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste estudo.

*Aprígio “Gabrié”,  
Você padece  
Aranha desce  
Puxando fio da teia  
A ciência da “abêia”  
Você morre e não conhece*

Bananeira - Mestre de Maracatú - citado e recitado por José Belo da Silva (Zé Belo)

**SUMÁRIO**

<b>1. Introdução</b>	<b>11</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b>	<b>15</b>
2.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS) e a saúde humana	<b>16</b>
2.2 Plantas e agentes antioxidantes	<b>18</b>
2.3 O efeito do ambiente na atividade antioxidante das plantas	<b>21</b>
<b>3. Artigo - Como dois tipos vegetacionais podem influenciar na seleção de plantas medicinais que sugerem atividade antioxidante?</b>	<b>25</b>
<b>4. Artigo - Comparação da atividade antioxidante de plantas medicinais em dois biomas do Nordeste do Brasil</b>	<b>60</b>
<b>5. Artigo - Rainfall effect on the antioxidant capacity and production of phenolic compounds from <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan in a seasonal dry forest (NE Brazil)</b>	<b>83</b>
<b>6. Artigo - Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of <i>Spondias tuberosa</i></b>	<b>104</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>122</b>
<b>8. Referências</b>	<b>125</b>
<b>Apêndice A - Imagens durante o desenvolvimento do trabalho</b>	<b>132</b>
<b>Apêndice B - Termo de consentimento</b>	<b>135</b>
<b>Anexo - Aprovação da pesquisa pelo CEP – UFPE /SISNEP</b>	<b>137</b>

## RESUMO

A Caatinga e a Mata Atlântica são as principais fontes de plantas medicinais para povos que vivem no Nordeste do Brasil. Diversas plantas destes dos tipos vegetacionais são usados em doenças ou sintomas relacionados com o aumento do estresse oxidativo nas células. Com isso, nosso objetivo foi testar como dois diferentes tipos vegetacionais influenciam na seleção de plantas medicinais e de como amostras destas plantas se comportam em relação a atividade antioxidante, além de testar se a sazonalidade climática afeta tal atividade e os compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera colubrina* e se esta mesma atividade e a concentração de taninos nas cascas de *Spondias tuberosa* variam de em relação ao local de coleta. Para tal, foram realizadas entrevistas semiestruturadas em duas comunidades em duas diferentes regiões do Nordeste do Brasil e selecionadas espécies medicinais relacionadas a doenças que envolvem estresse oxidativo para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH e FIC. A identificação e quantificação de compostos fenólicos foram realizadas por meio de CLAE e a quantificação de taninos pelo método de difusão radial. Os dois tipos vegetacionais influenciam na seleção de plantas medicinais para doenças que envolvem doenças com estresse oxidativo, contudo não foram observadas diferenças na atividade antioxidante nas amostras selecionadas nas duas comunidades independente dos métodos antioxidantes. A atividade antioxidante e os principais compostos fenólicos das cascas de *A. colubrina* variaram pouco ao longo do ano, porém estas diferenças são, aparentemente, não relacionadas ao regime de chuva. Em relação aos dados de *S. tuberosa*, foi observado diferença na atividade antioxidante de amostras coletadas em diferentes locais de coleta, contudo não houve diferença em relação a concentração nos teores de taninos. Ambas as comunidades apesar de selecionarem plantas de modos diferentes, conhecem espécies com alta capacidade no sequestro de radicais livres e como quelantes do ion ferroso. Os efeitos ambientais que atuam nas duas áreas de coleta não afetam significativamente nas espécies analisadas, de modo conjunto, e os mecanismos de ação antioxidante agem de modo independente nestas espécies. O local de coleta, dentro de um mesmo tipo vegetacional, parece influenciar mais na atividade antioxidante do que a variação pluviométrica.

Palavras chaves: DPPH, Radicais livres, Etnobiologia; *Anadenanthera colubrina*; *Spondias tuberosa*

## ABSTRACT

The Caatinga and Atlantic Forest are the main sources of medicinal plants for people living in northeastern Brazil. Several plants of vegetation types are used in diseases or symptoms related to increased oxidative stress in cells. Thus, our objective was to test two different vegetation types influence the selection of medicinal plants and samples of how these plants behave in relation to antioxidant activity, and test whether the seasonal climate affects such activity and phenolic compounds in peel *Anadenanthera colubrina* and whether that activity and concentration of tannins in the bark of *Spondias tuberosa* vary in relation to the collection site. For this, semi-structured interviews were conducted in two communities in two different regions of northeastern Brazil and selected medicinal species related diseases involving oxidative stress for the evaluation of antioxidant activity by DPPH and FIC methods. Identification and quantitation of phenolic compounds was performed by HPLC and quantified by the tannin method radial diffusion. The two vegetation types influence the selection of medicinal plants for diseases involving diseases with oxidative stress, however there were no differences in antioxidant activity in selected samples in the two communities regardless of the methods antioxidants. The antioxidant activity and the main phenolic compounds from the barks of *A. colubrina* varied little throughout the year, but these differences are apparently not related to the rainfall regime. With regard to data of *S. tuberosa* difference was observed in the antioxidant activity of samples collected at different sampling sites, but there was no difference in the concentration levels of tannins. Both communities select plants in different ways, known species with high capacity in scavenging free radicals and as ferrous ion chelators. The environmental effects that act in two areas of collection does not significantly affect the species analyzed, so together, and mechanisms of antioxidant action act independently in these species. The collection site, within the same vegetation type, seems to influence more antioxidant activity than the variation in rainfall.

Keywords: DPPH, free radicals, Ethnobiology, *Anadenanthera colubrina*, *Spondias tuberosa*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

Embora exista uma enorme quantidade de estudos sobre a riqueza da biodiversidade da flora brasileira, pouco se sabe sobre o potencial farmacológico das plantas presentes nos diversos ecossistemas (Albuquerque et al., 2007; Di Stasi et al., 2002), bem como os efeitos de variáveis ambientais sobre a atividade biológica dessas plantas.

Para a Caatinga, por exemplo, já se veem documentando as plantas que são utilizadas para fins medicinais explicitando o potencial que esta região tem na produção de novos medicamentos (Agra et al., 2007; Albuquerque et al., 2007; Almeida et al., 2006; Monteiro et al., 2006a; Silva e Albuquerque, 2005). De modo semelhante, estudos em áreas de Mata Atlântica, com populações locais, têm mostrado o enorme conhecimento sobre plantas medicinais (Begossi et al., 2002; Di Stasi et al., 2002; Hanazaki et al., 2006; Pereira et al., 2004; Pinto et al., 2006), e mais especificamente em comunidades que fazem usos dos recursos vegetais de fragmentos de Mata Atlântica do estado de Pernambuco, a categoria medicinal é a mais representativa em relação ao número de espécies citadas (Silva e Andrade, 2005).

Uma das razões em estudar o conhecimento a respeito do uso de plantas medicinais por comunidades tradicionais está no fato de que estudos vêm mostrando, a partir de pesquisas etnofarmacológicas e etnobotânica, que os conhecimentos e práticas dos povos locais podem facilitar na busca de novos produtos bioativos (Canales et al., 2005; Falodun et al., 2006; Khafagi e Dewedar, 2000; Martini et al., 2004; Slish et al., 1999).

Contudo, apesar do aumento de estudos de bioprospecção vegetal, ainda entendemos muito pouco sobre os fatores que podem otimizar a pesquisa científica em termos de tempo, dinheiro e recursos humanos (Albuquerque et al., 2012). Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos como o intuito de entender como o conhecimento a respeito de plantas medicinais é distribuído e influenciado por diversos fatores (Collins et al., 2006; Reyes-Garcia et al., 2005; Silva et al., 2011, Teklehaymanot et al., 2007). Os entendimentos de como estes fatores interferem no conhecimento e uso de plantas medicinais podem ajudar a elucidar como as pessoas selecionam plantas para os mais diversos fins. Este entendimento pode ser um caminho para uma maior efetividade na descoberta de novas drogas (Albuquerque, 2010; Albuquerque et al., 2012).

Para Albuquerque (2006) e Akerreta et al. (2007), fatores abióticos como clima e solo, assim como fatores culturais, são responsáveis pela seleção de plantas com uso medicinal por populações locais. Além de afetarem na seleção de plantas, fatores ambientais podem influenciar a produção de metabólitos com efeito medicinal (ver Monteiro et al., 2006b, Araújo et al., 2012), fazendo com que seja algo raro encontrar uma concentração constante de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Fatores edafoclimáticos como temperatura, tipo de solo, umidade, disponibilidade hídrica e de nutrientes, podem influenciar o cultivo e o conteúdo de princípios ativos nas plantas (Silva et al., 2007).

Contudo, estes estudos têm se concentrado predominantemente com espécies de regiões temperadas e que podem ter sofrido pressões antrópicas seletivas, pois são importantes comercialmente, resultando em estudos de espécies que não podem responder muito sobre o comportamento de plantas selvagens ou de outros tipos de habitats a respeito de fatores ambientais mais diversos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Gottlieb et al. (1996) ressalta que aspectos ecogeográficos são responsáveis pela diversificação na qualidade de metabólitos secundários, os quais são responsáveis pela plasticidade dos vegetais a mudanças físicas de ambientes. Estes mesmos autores sugerem que a interação do meio ambiente com os compostos vegetais podem ser avaliadas por meio do estudo comparativo das propriedades e ocorrência da atividade química em plantas ecogeograficamente caracterizadas (plantas da Caatinga e Mata Atlântica, por exemplo).

Apesar de sua importância, poucos trabalhos enfocam como as condições ambientais interferem nos recursos vegetais utilizados para fins medicinais e, conseqüentemente, na produção de seus compostos bioativos, em especial com função antioxidante (ver por exemplo, Mccune e Johns 2002; 2007 Severino et al., 2007; Zhou e Zhao, 2004).

Mccune e Johns (2002; 2007) mostram, por meio de estudo para diabetes, que se associarmos o conhecimento tradicional sobre plantas, a citação de determinados sintomas e/ou complicações causadas por esta doença e o conhecimento científico, podemos ter grande sucesso na seleção de espécies com atividade antioxidante igual ou próximas a substância puras e conhecidas pelo seu poder antioxidante.

Partindo disso, escolheu-se neste projeto estudar a atividade antioxidante de plantas medicinais visando avaliar se a mesma varia em relação às condições de habitat, sazonalidade climática, ecogeografia e conhecimentos locais em áreas de Caatinga e Mata Atlântica no estado de Pernambuco. Mccune e Johns (2007) sugerem que alguns destes fatores interferem na ação antioxidante, mas quando se comparam estes fatores em duas áreas tropicais, distintas em vegetação, cultura e condições geoclimáticas haverá diferença? A variação sazonal interfere neste processo? Como se comportam as espécies que ocorrem nos dois ambientes? São algumas dessas perguntas que se pretende responder para que estratégias menos onerosas, mais rápidas e eficazes possam trazer benefícios à saúde humana, ao desenvolvimento de técnicas de manejo de plantas medicinais ecologicamente sustentáveis e economicamente eficientes no que se diz respeito à qualidade e descoberta de novas drogas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS) e a saúde humana

O oxigênio está envolvido tanto no crescimento e desenvolvimento do organismo, assim como, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem desregular processos celulares normais e causar a morte da célula, tanto no metabolismo animal quanto no vegetal (Ślesak et al., 2007). As EROS são formadas principalmente por radicais livres (RL), que são moléculas em que o número de elétrons não está pareado na sua órbita externa e pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que não possui elétrons desemparelhados na última camada, mas tem vida longa, sendo extremamente deletério porque participa da reação que produz radicais hidroxilas ( $OH\cdot$ ) (Cheeseman e Slater, 1996; Ferreira e Matsubara, 1997).

No organismo humano as espécies reativas são provenientes, por exemplo, da respiração celular, de inflamações, de peroxissomos e/ou de enzimas do citocromo P450 (Bianchi e Antunes, 1999; Govindarajan et al., 2005).

Existem inúmeras evidências de que estas moléculas causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, que conseqüentemente levam a problemas de saúde, tais como arteriosclerose, câncer, diabetes e inflamações (Cheeseman e Slater, 1996; Choi et al., 2002). Mais de 50 doenças ou eventos nosológicos podem estar relacionadas à estes elementos reativos produzidos pelo metabolismo do  $O_2$ , desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de fisiopatologias associadas a neoplasias, arterioscleroses e doenças neurodegenerativas (Ferreira e Matsubara, 1997; Boudet, 2007).

Grande parte destas doenças, ou seus agravamentos, está relacionada ao desequilíbrio de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes no corpo, ou seja, quando ocorre um aumento das substâncias pró-oxidantes ao ponto dos antioxidantes não inibirem a oxidação dos substratos. A esta condição chamamos de estresse oxidativo, que causa danos na estrutura e função das células levando até à sua destruição (Govindarajan et al., 2005).

Em todo o período de vida existe a produção destes radicais, porém um aumento do número de radicais livres é comum durante o envelhecimento, uma vez que nesta fase da vida, células produzem uma menor concentração de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e catalase (Govindarajan et al., 2005). Matsubara et al. (1992),

mostraram, em um estudo clínico, que os idosos apresentam níveis eritrocitários de agentes antioxidantes menores do que os jovens.

Aumento na produção de radicais livres e estresse oxidativo são característicos de pessoas com diabetes e câncer (Dias et al., 2004). Os RL's, como os radicais hidroxilas, podem atacar e modificar quimicamente o DNA, gerando uma série de purinas e pirimidinas modificadas, muitas das quais são conhecidas por terem efeitos mutagênicos. Os RLs também podem causar danos oxidativos em lipídios e proteínas podendo levar a também mutagênese (Govindarajan et al., 2005).

Outro agente reativo que está envolvido nas alterações do DNA e RNA, causando doenças degenerativas e câncer, são os peróxidos lipídicos, por serem muito deletérios, visto que agem nos ácidos graxos insaturados da membrana celular alterando a sua permeabilidade (Olszewer, 1995). Estes mesmos agentes promovem a arteriosclerose pelo depósito de gorduras nas artérias causado pela oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Esterbauer et al., 1996; Olszewer, 1995).

Para evitar que as EROS prejudiquem o funcionamento normal das células e, conseqüentemente, do nosso corpo, existem alguns agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres, os chamados antioxidantes (Bianchi e Antunes, 1999).

Antioxidantes sintéticos têm demonstrado serem prejudiciais a saúde humana, aumentando a necessidade de pesquisas na busca de antioxidantes naturais (Chludil et al., 2008). Nos últimos anos, cada vez mais tem sido evidenciado que o consumo regular de alimentos ricos com agentes antioxidantes pode diminuir o risco de desenvolver doenças crônicas degenerativas causadas e/ou agravadas por agentes oxidantes (Pastene, 2009). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de frutas e verduras é inversamente associado com doenças cardiovasculares e câncer (Chludil et al., 2008).

Desta forma, a presença destes compostos nas plantas as tem tornado um campo atrativo de investigação e uma questão social muito importante para a melhoria da qualidade de vida humana, por serem compostos que podem ser obtidos de plantas alimentícias e medicinais (Chiang et al., 2004).

Os agentes antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Os não-enzimáticos ainda podem ser subdivididos em duas classes: os associados a membrana lipossolúvel ( $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno), e redutores solúveis em água (glutathiona, ascorbato e fenólicos) (Jaleel et al., 2009).

Entre os agentes enzimáticos estão a catalase e a glutathiona peroxidase (GSH), que atuam no controle de peróxidos. Esta segunda enzima é formada por um tripeptídeo, a glutathiona (ácido glutâmico, cisteína (parte ativa) e glicina). A parte ativa se deve à capacidade redutora do grupamento  $-SH$  (Figura 1). A presença de riboflavina (B2) aumenta a atividade da GSH (Olszewer, 1995; Ferreira e Matsubara, 1997). Estudo dos eritrócitos mostraram que tanto a catalase quanto a glutathiona peroxidase são importantes na proteção de efeitos mediados pelo  $H_2O_2$  (Scott et al., 1991).

Outra enzima antioxidante é a superóxido dismutase (SOD), a qual corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição, existindo duas formas em sistemas eucariontes. Uma citoplasmática que necessita de cobre e zinco para agir (SOD-cobre-zinco) e uma mitocondrial que necessita de manganês (SOD-manganês) (Olszewer, 1995; Ferreira e Matsubara, 1997). Já a catalase, a qual atua no peróxido de hidrogênio age apenas na presença de ferro (Olszewer, 1995). Uma característica comum a várias enzimas antioxidantes é conter traço de minerais, por isso são chamadas de metaloenzimas.

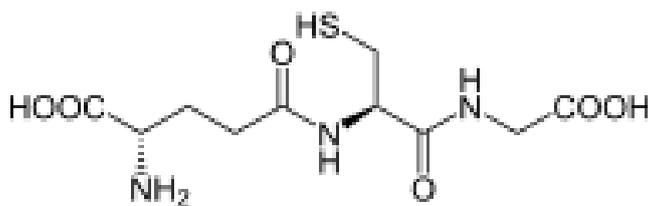


Figura1. Estrutura molecular da Glutathiona

## 2.2 Plantas e agentes antioxidantes

Entre os agentes não-enzimáticos estão as vitaminas A (retinol), E (tocoferóis) e C (ácido ascórbico), carotenóides e polifenóis como flavonóides e taninos, podendo estes ser associados a atividades antidiabéticas, antineoplásicas e antiinflamatórias (Desmarchelier et al., 1999; Mccune e Johns, 2002; 2007).

Um das funções da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) como antioxidante é atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação, conferindo proteção à membrana celular, sendo um importante antioxidante lipofílico produzido por todas as plantas. O  $\alpha$ -tocoferol, por exemplo, é o principal antioxidante da LDL, cerca de sete moléculas dele estão presentes em cada partícula de LDL, realizando, assim, o papel de uns dos principais antioxidantes contra a arteriosclerose (Esterbauer et al., 1996; Ferreira e Matsubara, 1997). A função da vitamina E poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro, mostrando-se mais eficiente quando há altas tensões de  $O_2$ , já o  $\beta$ -caroteno interage com os radicais livres especialmente quando estas tensões são baixas (Ferreira e Matsubara, 1997).

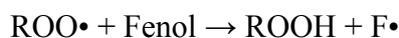
O ascorbato está envolvido na reação com  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  e  $HO^{\cdot}$ , servindo como cofator em reações de peroxidases como a glutiona peroxidase e ascorbato peroxidase (Ślesak et al., 2007). O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais estudados e um dos principais agentes antioxidantes das plantas protegendo-as de EROS produzidos durante a fotossíntese e respiração celular (Jaleel et al., 2009).

Metabólitos secundários, como compostos fenólicos, encontrados nas plantas também estão diretamente relacionados a essas ações antioxidantes (Gottlieb et al., 1996; Pilarski et al., 2006; Srinivasan et al., 2007; Velloso et al., 2006). Estes compostos podem ser encontrados tanto em plantas não comestíveis como em plantas utilizadas na alimentação humana, o que tem despertado ainda mais o interesse da indústria de alimentos porque eles retardam a degradação oxidativa de lipídios e assim melhora a qualidade e valor nutricional dos alimentos, isso se deve principalmente, por agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, supressores de oxigênio singlete, por quelarem metais assim pelo fato de interagirem com proteínas envolvidas na produção de radicais, como citocromo  $P_{450}$ , lipoxigenases, ciclooxigenase e xantine oxidase (Kähkönen et al., 1999; Pereira et al., 2009).

Os compostos fenólicos estão envolvidos tanto no sequestro de radicais livres como também, quelando metais (Ramalho e Jorge 2006). Por exemplo, uma maior quantidade de polifenóis no gel de *Aloe greatheadii* são relacionados a maior eficiência na capacidade de absorção de radicais de oxigênio e na redução do íon férrico (Botes et al., 2008). Contudo, esta relação parece está mais associada os sequestro de radicais livres (Kumari e Kakka, 2008; Ruan et al., 2008; Rufino et al., 2010; Zang et al., 2010) do que ao poder de quelar

metais que parece depender do número e localidade do grupo hidroxil e estarem mais relacionados a compostos que contenham nitrogênio na sua estrutura (Chan et al., 2007; Lim et al., 2007).

Compostos fenólicos podem reagir com radicais livres, radical peroxil (ROO•), por exemplo, os tornando mais estáveis, como consequência o composto fenólico transforma-se em um radical fenoxil (F•) — composto fenólico com elétron livre, relativamente inerte — para posteriormente reagir com outro RL formando um produto não radicalar, servindo desta forma como finalizador, quebrando assim a cadeia de formação de radicais livres (Maestri et al., 2006).



Grupos fenólicos também são considerados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante de óleos essenciais. Esses óleos têm sido alvo de pesquisa sobre sua atividade antioxidante por apresentarem inibição na peroxidação lipídica, eliminando RL e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes (Maestri et al., 2006).

Os taninos também agem como antioxidantes por sua capacidade de ligar-se a proteínas suprimindo sua atividade enzimática, como quelantes de metais e por agirem no sequestro de radicais livres, sendo este último efeito aumentado em compostos com maior número de grupos galoi, peso molecular e presença de estrutura orto-dihidroxi, que são responsáveis pela propriedade quelante e no sequestro de radicais. Estas propriedades fazem com que os taninos estejam envolvidos no mecanismo de doenças com efeito antitrombogênico e anti-inflamatório (Pereira et al., 2009).

Apesar de ainda ser controversa, a função dos flavonóides como antioxidantes está relacionada à sua proteção aos efeitos dos oxigênios reativos (Choi et al., 2002). Eles exercem efeitos protetores contra doenças graves como câncer e doenças cardiovasculares, além de ação anti-inflamatória e inibição enzimática, sendo a sua ação antioxidante um dos atributos mais estudados (Boudet, 2007; Pereira et al., 2009). Alguns flavonóides, como flavononas e antocianidinas, têm sido apontados, em estudos básicos e epidemiológicos, por seus efeitos benéficos no sistema cardiovascular, com particular ênfase nos seus efeitos

vaso relaxante e hipotensor, notável capacidade antioxidante e antiagregante plaquetário (Lopez et al., 2006).

Outro flavonóide, a hiperina, foi associada com a ação anti-inflamatória das raízes de *Acanthopanax chiisanensis* por sua capacidade de suprimir a produção de PGE<sub>2</sub> e óxido nítrico em testes *in vitro* (Lee et al., 2004).

A ação anticâncer dos flavonóides está relacionada a seu efeito no sequestro de radicais livres, evitando a promoção do câncer, assim como agindo na via de regulação no crescimento e proliferação de células e formação do tumor, além de repararem DNA e estimularem o sistema imune (Pereira et al., 2009).

### 2.3 O efeito do ambiente na atividade antioxidante das plantas

Além desta relação entre metabólitos primários e secundários de plantas e sua ação antioxidante, também já é conhecido que a atividade e concentração destes compostos antioxidantes podem variar de acordo com fatores ambientais, genotípicos e fenotípicos (Ksouri et al., 2008; Peltonen et al., 2005; Santos et al., 2006). Efeitos genéticos modulam processos biossintéticos capazes de diversificarem a produção de estruturas químicas que asseguram o sucesso das plantas nos ecossistemas (Chludil et al., 2008). Esta diversificação, principalmente na qualidade de metabólitos secundários, é responsável pela plasticidade dos vegetais a mudanças físicas de ambientes (Gottlieb et al., 1996).

Sob determinadas condições ambientais as EROS podem desempenhar dois papéis muito diferentes nas plantas: causar ou agravar danos ou servir na sinalização da ativação de respostas de defesa, sendo produzido principalmente nos cloroplastos, provindos da cadeia de transporte de elétrons, além de serem produzidas da fotorespiração nos peroxissomos e de oxidases e peroxidases da parede celular (Dat et al., 2000). Para isto, as EROS devem ser rigorosamente controladas por meio do sistema antioxidante da planta (Dat et al., 2000; Ślesak et al., 2007). Esta dupla função talvez seja o motivo das plantas suportarem altas concentrações de EROS, fazendo com que, por exemplo, as plantas pareçam ser mais resistentes a altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que as células animais (Ślesak et al., 2007).

As EROS desempenham papéis na sinalização celular, como regulação na expressão gênica, modificação de proteínas, sinalização hormonal e de  $\text{Ca}^{2+}$ , afetando na regulação do crescimento, gravitropismo, fechamentos dos estômatos e programação da morte celular (Neill et., 2002; Ślesak et al., 2007). Isto e o fato das plantas suportarem relativamente grandes concentrações de determinados EROS, sugere que o sistema antioxidante seja concebido mais para o controle do estado redox celular da planta do que para a eliminação completa de algumas destes elementos (Ślesak et al., 2007). Por exemplo, o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico está relacionado com a adaptação das plantas ao estresse ambiental, e o aumento da atividade antioxidante (Havaux, 1998). Contudo estas EROS também são responsáveis a danos causados nas membranas e em macromoléculas (Wang et al., 2003). O conhecimento de como estes danos são prejudiciais as plantas, são um dos motivos para descoberta e utilização de novos genes, por meio da engenharia genética, a tolerância ao estresse ambiental, especialmente em plantas cultivadas e de alto valor e consumo humano (ver Wang et al., 2003).

As EROS são produzidas tanto em situações de ambientes “estáveis” como em situações de alterações no ambiente. Modificações como disponibilidade hídrica, intensidade luminosa, temperatura e salinidade, por exemplo, podem causar estresse a planta, fazendo com que haja uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, que no caso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por exemplo, sua produção depende do nível e duração do estresse imposto, sendo necessário uma regulação metabólica na produção de compostos antioxidantes (Jaleel et al., 2009; Ślesak et al., 2007).

Por exemplo, Severino e colaboradores (2007) demonstraram que plantas colocadas sob estresse do efeito do ozônio produzem mais substâncias antioxidantes e que um aumento da sensibilidade da planta ao ozônio é acompanhado ou causado por baixas concentrações de ácido ascórbico nas plantas.

A PAL (phenylalanine ammonia-lyase) é a principal enzima da rota dos fenilpropanóides, que é precursora de diversos compostos fenólicos. O aumento da ativação desta enzima é considerado a principal aclimatação a altas temperaturas (Wahid et al., 2007) e como relatado anteriormente, compostos fenólicos estão envolvidos no sistema antioxidante das plantas. Além de compostos fenólicos, a produção de carotenóides, como a xantofila, também é afetada em elevada temperatura ou maior exposição a luz,

interagindo com os lipídios da membrana celular, aumentando a termoestabilidade e diminuindo a peroxidação lipídica, protegendo assim a célula vegetal (Havaux, 1998).

No tomate, a temperatura alta pode causar ao mesmo tempo aumento nas concentrações da enzima superóxido dismutase e diminuição da glutathione redutase e ascorbato peroxidases, sendo esta diminuição relacionada com a desintoxicação do alto nível de  $H_2O_2$  gerado pelo estresse (Rivero et al., 2004). De modo semelhante, estudo realizado com folhas de *Caesalpinia echinata*, pau-brasil, mostrou que tanto a temperatura quanto a umidade relativa estimulam a superóxido dismutase ao longo do ano e que este primeiro fator também age na concentração de glutathione e de peroxidases (Bulbovas et al., 2005).

O sistema antioxidante também é responsável pela aclimação ao frio de gramíneas que ocorrem em uma região temperada alpina, com temperaturas que chegam a  $-30^\circ\text{C}$ . Neste estudo, foi mostrado que a atividade antioxidante nas raízes desempenha um papel importante na limitação da produção de radicais livres e na proteção da integridade da membrana celular (Zhou e Zhao, 2004).

Levando em consideração variações sazonais, a atividade antioxidante, apesar de pequenas, mostraram-se significativas nas flores de *Bellis perennis* L. coletadas em três ambientes em diferentes anos, sugerindo que flutuações na temperatura, chuva, seca e da duração e intensidade da luz do sol interferem no sequestro de radicais livres desta espécie (Siatka e Kašparová, 2010). Em *Picea abies*, variações sazonais interferiram no sistema antioxidante da planta alterando os níveis de ascorbato e glutathione e a atividade de algumas enzimas envolvidas neste sistema (Polle e Rennenberg, 1992).

A disponibilidade hídrica é outro fator que age no sistema antioxidante. O estresse hídrico ativa enzimas como PAL,  $\gamma$ -TMT (tocoferol methyl transferase) e L-GalDH (L-galactose dehydrogenase), afetando a produção de compostos fenólicos, de  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, respectivamente (Ho et al., 2009). O sistema antioxidante do trigo (*Triticum aestivum*) também se mostrou adaptado a variação hídrica, onde em baixa disponibilidade de água há um aumento na atividade da glutathione redutase, contudo, a atividade da catalase não é afetada (Gamble e Burke, 1984).

Como o solo é um dos principais veículos na nutrição e desenvolvimento das plantas ele exerce um papel fundamental na produção de EROS. Solos degradados

aumentam a concentração de compostos fenólicos, sendo este aumento correlacionado a uma maior atividade no sequestro de radicais livres em *Chenopodium album* (Chludil et al., 2008). Entre os elementos que compõem o solo, a salinidade é um dos fatores mais estudados em relação a alteração no sistema antioxidante das plantas. Estudo realizado com *Cakile maritima* coletada em dois diferentes locais de coleta, uma zona árida e outra úmida, mostrou que a atividade antioxidante desta espécie foi maior na zona árida, sendo este resultado associado a menor precipitação, maior radiação e maior salinidade no solo (Ksouri et al., 2008).

A salinidade do solo também mostrou ser um fator que aumenta a atividade no sequestro de radicais livres e ânions superóxidos das folhas de *Tamarix gallica* (Ksouri et al., 2008). Nos frutos de pimenta (*Capsicum annuum* L.), solos mais salinos aumentam produção de licopenos e diminui os níveis de ácido ascórbico alterando a atividade antioxidante desta espécie, uma vez que tais substâncias foram altamente correlacionadas com esta atividade (Navarro et al., 2006).

### 3. ARTIGO- COMO DOIS TIPOS VEGETACIONAIS PODEM INFLUENCIAR NA SELEÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS QUE SUGEREM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE?

## ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

**Revista:** Journal of Ethnopharmacology

### **Como dois tipos vegetacionais podem influenciar na seleção de plantas medicinais que sugerem atividade antioxidante?**

Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>ab\*</sup>, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim<sup>b</sup> e Ulysses Paulino de Albuquerque<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Etnobotânica Aplicada – LEA. Departamento de Biologia, Área Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171–030, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Produtos Naturais – LAPRONAT. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco; Rua Prof. Artur de Sá s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-521, Brasil.

thiagocaruaru@hotmail.com; elba@ufpe.br; upa@db.ufrpe.br .

\* thiagocaruaru@hotmail.com; telefone: +55 81 9104 3531; fax: +55 81 3320 6360.

## Resumo

### Relevância etnofarmacológica

A Caatinga e a Mata Atlântica são as principais fontes de plantas medicinais para povos que vivem no Nordeste do Brasil. Diversas plantas destes dos tipos vegetacionais são usados em doenças ou sintomas relacionados com o aumento do estresse oxidativo nas células.

### Objetivos do estudo

Testar como dois diferentes tipos vegetacionais, influenciam na seleção de plantas medicinais e de como amostras destas plantas se comportam em relação a atividade antioxidante. Além do mais, avaliar se a adaptação do índice de importância relativa pode ser útil na seleção de plantas com boa atividade antioxidante.

### Materiais e métodos

Foram realizadas entrevistas utilizando a técnica de lista livre seguida por um questionário estruturado, em duas comunidades em diferentes regiões do Nordeste do Brasil e selecionadas espécies medicinais relacionadas a doenças que envolvem estresse oxidativo para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH. Os valores da atividade antioxidante foram correlacionados com os valores obtidos pela adaptação do índice de importância relativa.

### Resultados

Os dois diferentes tipos vegetacionais influenciam na seleção de plantas medicinais para enfermidades que envolvem doenças com estresse oxidativo, contudo não foram observadas diferenças na atividade antioxidante nas amostras selecionadas nas duas comunidades. A adaptação do índice de importância relativa se mostrou correlacionado com a atividade antioxidante das plantas coletadas na área de Mata Atlântica.

### Conclusão

Ambas as comunidades apesar de selecionarem plantas de modos diferentes, conhecem espécies que experimentalmente mostraram alta capacidade no sequestro de radicais livres. A alta capacidade antioxidante pode ser devido ao consenso entre os informantes, em especial aos que moram próximos a área de Mata Atlântica devido aos valores obtidos pela análise antioxidante das plantas desta área terem sido correlacionados com os escores estabelecidos pela adaptação do índice de importância relativa.

Palavras chaves: Caatinga, Mata Atlântica, DPPH, Etnobotânica quantitativa, estresse oxidativo.

## 1. Introdução

Fatores ambientais têm sido discutidos por interferirem e serem limitantes no conhecimento e uso de plantas, principalmente no que diz respeito ao tipo vegetacional disponível para as comunidades tradicionais (Albuquerque et al., 2008; Inta et al., 2008; Ladio et al., 2007). No caso do semiárido do Nordeste do Brasil, por exemplo, o alto uso de casca de árvores no preparo de medicamentos tradicionais parece ser influenciado pela disponibilidade perene deste recurso, uma vez que o clima sazonal interfere na disponibilidade de ervas que não resistem ao longo período de seca na região (Albuquerque et al., 2005; Albuquerque, 2006).

Além de parecerem influenciar no conhecimento de plantas medicinais, as condições ambientais interferem no metabolismo das plantas, as quais se adaptam as situações impostas pelo ambiente, sendo um dos principais fatores da diversificação na qualidade de metabólitos secundários, os quais são responsáveis pela plasticidade dos vegetais a mudanças físicas dos ambientes (Gottlieb et al., 1996).

Estes metabólitos podem ser afetados de modo qualitativo e/ou quantitativo pelos mais diversos fatores bióticos e abióticos do ambiente onde a planta vive, contudo estudos que enfocam a relação da variação de metabólitos com tais fatores são predominantemente em regiões temperadas e acabam por não ser representativos de plantas selvagens de outros tipos de habitat (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Os metabólitos secundários são relacionados a diversos efeitos terapêuticos, entre eles pela ação antioxidante das plantas (Lima et al., 2004; McCune e Johns, 2007). Esta atividade torna-se importante, principalmente, em situações de doenças, como câncer, diabetes e inflamações, as quais envolvem uma maior produção de compostos oxidantes, causando um estresse oxidativo (Govindarajan et al., 2005; Olszewer, 1995).

Com isso, a atividade antioxidante das plantas pode ser alterada de acordo com variações ambientais uma vez que esta atividade é influenciada pela presença e quantidade de metabólitos secundários. Dentro de uma perspectiva etnobotânica, raramente o pesquisador encontrará uma indicação de informantes de plantas medicinais recomendadas como antioxidante. Então, um dos caminhos para selecionar plantas que sugerem esta atividade, é escolher espécies relacionadas com indicações com doenças ou sintomas que

envolvem estresse oxidativo e que possivelmente deve exercer efeito antioxidante nestas situações.

Este caminho parece ser promissor na busca de plantas com grande poder antioxidante, pois leva em consideração o conhecimento botânico tradicional a respeito de plantas medicinais e os conceitos da medicina ocidental para determinados sintomas e/ou doenças. Além do mais, acreditamos que se aliarmos estes conhecimentos a técnicas quantitativas que levem em consideração o consenso entre os informantes, e analisarmos estas espécies, ao menos, com testes *in vitro*, podemos obter maior sucesso na prospecção de futuros medicamentos.

Contudo, também entendemos que espécies com baixo consenso entre os informantes também podem ter potencial para pesquisas farmacológicas e que testes *in vitro*, por si só, são limitados e não podem ser extrapolados para sistemas mais complexos como o *in vivo* (Houghton et al., 2007; Moerman, 2007). Mas este pode ser um caminho para avaliarmos se as ferramentas quantitativas podem responder, pelo menos em parte, se estamos indo no caminho certo ao priorizar as plantas e para que possamos ter uma maior efetividade na descoberta de novos medicamentos por meio de estudos etnodirigidos.

Porém, apesar das inúmeras ferramentas quantitativas criadas pelos etnobotânicos nas últimas duas décadas e de trabalhos que priorizaram plantas com potencial para estudos de bioprospecção, poucos correlacionam os valores dos índices atribuídos as plantas com valores obtidos em testes farmacológicos *in vitro*.

Com isso, a partir de levantamentos etnobotânicos realizados em duas comunidades do Nordeste do Brasil, tentaremos entender três aspectos relacionados as plantas que sugerem atividade antioxidante. O primeiro é se o conhecimento a respeito de plantas medicinais difere entre comunidades localizadas próximas a diferentes tipos vegetacionais, levando em consideração as indicações terapêuticas e a origem biogeográfica e hábito das espécies. O segundo é se há diferença na atividade antioxidante das espécies selecionadas a partir do etnodirecionamento das duas comunidades. E o terceiro aspecto é a respeito de se a adaptação do índice de importância relativa proposto por Bennett e Prance (2000), levando em consideração a porcentagem de citação pelos informantes, pode ser útil na seleção de espécies com alta capacidade antioxidante.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Áreas de estudo

Os levantamentos etnobotânicos foram realizados em duas áreas do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, uma localizada em uma região de Caatinga com vegetação hipoxerólifa e outra localizada em uma região de Mata Atlântica com vegetação Ombrofila Densa. Estas duas localidades estão a cerca de 170 Km de distancia uma da outra.

A comunidade localizada na Caatinga é conhecida como sítio Carão (08° 35' 16.1" S x 36° 05' 36.1" W), uma comunidade rural localizada a 16 Km do centro do seu Município, Altinho (8° 29' 32" S x 36° 03' 03" W). No período do levantamento moravam na localidade 189 habitantes, sendo 112 maiores de 18 anos, compreendendo 67 mulheres e 45 homens. Esta população é assistida por uma escola de ensino fundamental e um posto de saúde que dispõe de dois agentes comunitários de saúde (ACS) e um médico que faz atendimentos mensais (Araújo et al., 2008). A economia é sustentada pela agricultura de subsistência, pelo pequeno comércio local e por uma pecuária restrita a criação de bovinos, caprinos, aves e em menor quantidade por suínos, responsáveis pela complementação alimentar e geração de renda familiar (Araújo et al., 2008).

Assim como ocorre em outras populações humanas que moram em regiões rurais de Caatinga, esta comunidade tem – principalmente durante o período de estiagem – dificuldade de acesso a água limitando-se a poços artesanais domiciliares (Araújo et al., 2008) e a um reservatório coletivo, chamado localmente de “açude da emergência”. Segundo dados da estação do IPA — Instituto Agrônomo de Pernambuco — do município, no ano de 2010, choveu 520,5 mm<sup>3</sup> na região. A preocupação com a falta de chuvas faz com que exista uma grande preocupação por parte destes habitantes em manter determinados recursos vegetais medicinais em períodos de estiagem, sendo um dos principais locais de coleta de ervas exóticas, as quais cultivam nos quintais. O manejo destes recursos se dá, em muitas residências, com a reutilização da água que é utilizada na cozinha.

Além dos quintais, as pessoas têm como outra principal zona de recursos para coleta de plantas medicinais uma serra, chamada de Serra do Carão onde existem fragmentos de mata nativa e/ou em regeneração a mais de 50 anos.

A outra comunidade, localizada na Mata Atlântica, é conhecida como Canaã (07°45' 25.9" S x 35° 02' 44.8" W), um vilarejo que foi loteado da década de 50, pertencente ao município de Araçoiaba (07°47'24" S x 35°05'27" W). Canaã dista em 9 Km do centro do município, e segundo levantamento realizado no posto de saúde comunitário existem cerca de 770 habitantes, sendo 463 maiores de 18 anos – 229 homens e 234 mulheres – residindo em 208 residências. Existe na comunidade uma escola de ensino até o 5º ano e também do EJA (educação de jovens e adultos). Também existe um posto médico que conta com sete funcionários: uma médica, uma enfermeira, uma auxiliar de enfermagem e quatro agentes comunitárias de saúde (ACS), que atendem tanto a comunidade de Canaã quanto a comunidade adjacente, Vinagre.

Apesar da região apresentar níveis pluviométricos bem mais altos, com mais de 1600 mm anuais (dados da usina São José), essa comunidade também tem condições precárias de acesso a água, pois existe apenas um chafariz no qual os habitantes pegam água em baldes e há pouco tempo recebem água encanada, em pequena quantidade, em suas residências a cada 48 horas.

O acesso as espécies medicinais se dá principalmente por meio de sua manutenção nos quintais. Outra zona de recurso são os fragmentos de mata nos arredores da comunidade. Estes fragmentos são pertencentes, quase na totalidade, a Usina São José que restringe a retirada de produtos vegetais das matas, exceto para as pessoas que estejam de posse de uma “ordem” disponibilizada pela empresa. Esta permissão é principalmente para a retirada de madeira seca para combustível, contudo, os moradores têm receio de entrar na mata quando não dispõem de tal permissão para que não passem por constrangimentos caso sejam vistos pelos seguranças da Usina. Dentre estes fragmentos existem áreas consideradas reservas ecológicas, como a Mata da Usina São José (Lei estadual nº 9.989, de 13/01/87). A Usina também é responsável por empregar, principalmente durante o período de safra da cana-de-açúcar, grande parte da população masculina para o trabalho no campo, especialmente no corte da cana-de-açúcar.

## 2.2 Levantamento etnobotânico

Inicialmente entramos em contato com os representantes legais dos dois municípios – o secretário de agricultura e abastecimento de Altinho e o secretário de Saúde de Araçoiaba – para explicarmos os objetivos do trabalho. Por meio do levantamento nos postos de saúde das comunidades foram adquiridos os tamanhos populacionais e o número de

residências, com o objetivo de estipularmos os tamanhos das amostras em cada comunidade. Por intermédio da associação de moradores de cada uma das comunidades, foram convidados os moradores para participar de uma reunião para explicar as intenções da pesquisa e para esclarecer possíveis dúvidas. Foi solicitado, a cada pessoa envolvida na pesquisa – a partir de 18 anos – a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a coleta, utilização e publicação dos dados. Os agentes comunitários de saúde apoiaram no contato com as pessoas que não estavam na reunião. Este estudo teve aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco sob número 023/09.

Para a coleta das informações a respeito das plantas medicinais conhecidas e/ou usadas pelas comunidades foi utilizada a técnica da lista livre (Albuquerque et al., 2010) seguida de uma entrevista estruturada. Após listadas as plantas, perguntamos aos entrevistados quais sua(s) indicação(ões) terapêutica(s) e a(s) parte(s) usada(s). Também foi utilizada a técnica de checklist-entrevista, utilizando partes frescas de plantas, e *walk-in-the-woods* (passeio no campo) para a identificação de espécies que recebem mais de um nome vernacular (Medeiros et al., 2010).

Na comunidade do Carão foram realizadas entrevistas com 101 informantes, no período de julho/2006 a julho/2007. Como a comunidade apresentava 112 pessoas acima de 18 anos, tentamos entrevistar a totalidade da comunidade, porém, por motivos de mudança residencial, por incompatibilidade de horários para entrevistas ou por não querer participar da pesquisa isso não foi possível. As viagens para entrevistas foram realizadas mensalmente com cinco dias de permanência na comunidade.

Como a comunidade de Canaã apresentava um número maior de habitantes, utilizamos uma amostra por número de residências, onde foram entrevistadas 133 informantes de diferentes casas. As entrevistas foram realizadas no período de abril a junho de 2009, com viagens diárias, três vezes por semana.

Durante e após a etapa de entrevista, o material botânico foi coletado, etiquetado e acondicionado em saco plástico para posterior secagem. As amostras foram identificadas por especialistas. As espécies de área de Caatinga foram incorporadas ao acervo do herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR), do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e as da área de Mata Atlântica ao herbário da

UFP do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco e do Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA.

### 2.3 Classificação das doenças e seleção das espécies

Após o levantamento etnobotânico e identificação das espécies foi construído um banco de dados. As indicações terapêuticas foram relacionadas com as enfermidades e/ou sintomas relacionados a maior produção de agentes oxidativos, como inflamações, cicatrização e câncer. Posteriormente estas indicações foram classificadas nos seguintes grupos: cicatrizantes, anti-inflamatórias, diabetes, câncer, envelhecimento e problemas relacionados ao sistema sanguíneo e ósseo. Estes grupos foram estabelecidos de acordo com estudos que relacionam doenças e sintomas com o estresse oxidativo e formados levando em consideração a semelhança nos mecanismos que agem no corpo quando determinados processos se desencadeiam e/ou por estarem envolvidos no mesmo sistema corpóreo (Bianchi e Antunes, 1999; Boudet, 2007; Cheeseman e Slater, 1996; Choi et al., 2002; Desmarchelier et al., 1999; Esterbauer et al., 1996; Ferreira e Matsubara, 1997; Govindarajan et al., 2005; Mccune e Johns, 2002 e 2007; Olszewer, 1995).

Para a formação dos grupos foram consideradas doenças e/ou sintomas citados tanto de modo direto quanto indireto pelos entrevistados (Araújo et al., 2008). Indicações diretas são termos, palavras e/ou características ligadas diretamente a fins relacionados ao estresse oxidativo, dentro do sistema médico ocidental, como exemplo gastrite, reumatismo ou inflamação na bexiga, de acordo com estudos prévios. As citações indiretas são termos, palavras e/ou características cujos sintomas, indicações terapêuticas locais e/ou termos são, consideradas pelo pesquisador dentro do contexto local, como relacionadas aos grupos estabelecidos anteriormente, como por exemplo: fortalecer o osso, afinar o sangue ou olho vermelho (Araújo et al., 2008).

Sintomas e/ou doenças como dor de dente, erisipela, corrimento vaginal e cabeça de prego, foram classificados no grupo anti-inflamatório pelo fato das plantas citadas para tais situações tratarem as inflamações causadas nestes processos, uma vez que também poderiam ser relacionadas a outros efeitos como analgésico e antimicrobiano. Esta classificação foi realizada segundo observações e relatos durante as entrevistas e levando em consideração que características como dor, inchaço e vermelhidão, são os aspectos que mais caracterizam popularmente uma inflamação (Ferreira Junior et al., 2011) e que por isso as pessoas podem usar plantas para amenizar ou cessar estes aspectos.

O termo hipoglicemiante apesar de poder estar associado à diabetes não foi enquadrado como tal pelo fato do informante indicar o uso da planta independente do quadro de diabetes, sendo incluído na categoria sistema sanguíneo.

Adotamos como critério de inclusão plantas que obtiveram três ou mais citações (Araújo et al., 2008), pois partimos do princípio de que quanto maior a concordância maior pode ser a efetividade biológica de uma planta. Porém, como dito antes, estamos cientes que uma planta com promissora atividade biológica pode não ter necessariamente alto valores de consenso entre os entrevistados (Moerman, 2007).

Após a seleção, as espécies foram classificadas como nativas ou exóticas levando em consideração a origem e o domínio fitogeográfico das espécies de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (Flora do Brasil, 2012). Para as espécies que não tinham tais informações, foi realizado um levantamento utilizando o nome da espécie + nativa (native) ou (exótica) exotic + Caatinga ou Mata Atlântica (Atlantic Forest). Estas classificações foram usadas para entender como as plantas nativas e exóticas estão envolvidas na seleção de espécies e se há diferença entre as comunidades.

#### 2.4 Priorização das espécies

Foram selecionadas as espécies que obtiveram mais de três citações por diferentes informantes. Para estas espécies foi calculada a importância relativa baseado na porcentagem de citação (IR%). Este cálculo é uma adaptação do índice proposto por Bennett e Prance (2000). O cálculo da importância relativa (IR) foi escolhido pelo fato de levar em consideração a versatilidade de uma espécie que é avaliada pelas diferentes indicações terapêuticas e os diversos sistemas corporais que podem ser associados a planta. Estas características são, do nosso ponto de vista, apropriadas para a busca de espécies que estão relacionadas com doenças e/ou sintomas que envolvem estresse oxidativo, pelo fato deste poder estar envolvidos em diferentes eventos nosológicos podendo causar danos nos mais diversos sistemas corporais (Boudet, 2007; Ferreira e Matsubara, 1997).

O IR é calculado levando em consideração o número de sistemas corporais (NSC) e número de propriedades (NP), sendo dois (2) o valor máximo que uma espécie pode obter.

$IR = \frac{NSC + NP}{\text{NSC tratados pela espécie} + \text{NP atribuídas a espécie}}$ ; onde: NSC = NSC tratados pela espécie/ NP atribuídas a espécie mais versátil.

Contudo, em nosso estudo estes fatores foram adaptados. Para o valor de NSC foi levado em consideração o número de grupos de doenças e/ou sintomas relacionados com estresse oxidativo (cicatrização, câncer, por exemplo) e para o valor de NP o número de doenças e/ou sintomas que a espécie trata dentro de cada grupo (ferimento, queimadura, verruga, por exemplo).

Além do mais, pelo fato deste índice não levar em consideração nenhum fator relacionado ao consenso entre os informantes e com isso uma planta pode ter uma alta importância relativa sendo conhecida por um informante (Albuquerque et al., 2006), nós fizemos uma pequena adaptação onde multiplicamos o valor de IR da espécie pela porcentagem de informantes que a citaram. Esta adaptação leva em consideração que espécies medicinais que são mais compartilhadas entre os informantes possam ter maior sucesso em estudos de bioprospecção.

## 2.5 Análise da atividade antioxidante

### 2.5.1 Extratos

Para a análise da atividade antioxidante foram escolhidas as 10 espécies com o maior valor de IR%. Destas espécies foram coletadas, com o apoio de moradores das localidades, as partes mais citadas nas entrevistas.

Obteve-se o material de pelo menos três indivíduos, que foram reunidas para compor uma amostra única. As partes coletadas foram secas a sombra, em ambiente arejado com temperatura em torno de 26° C. Em seguida foram trituradas e padronizadas por tamisação.

Para a preparação do extrato foi realizado uma maceração de seis dias, a uma proporção de 1:20 p/v utilizando metanol a 80%. Após a maceração o material foi filtrado em papel-filtro e evaporado por pressão reduzida até a produção de um extrato seco (Araujo et al., 2012).

### 2.5.2 Quantificação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

A quantificação da atividade antioxidante das vinte espécies (10 de cada área) foi realizada utilizando o ensaio de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) segundo protocolo adaptado de Souza et al. (2007). Foram preparadas três amostras independentes com uma concentração de 500 µg/mL, em metanol. A partir destas amostras foram feitas seis diluições obtendo-se concentrações que variaram entre 500 e 10 µg/mL, dependendo do

poder antioxidante do extrato. Quando as espécies apresentavam maior poder antioxidante, concentrações menores foram utilizadas a fim de obter uma curva exponencial, pois concentrações maiores saturavam a solução do DPPH, obtendo assim valores de absorbância semelhantes.

Em seguida, foi preparada uma solução de DPPH a 100  $\mu\text{M}$  em metanol. De cada uma das concentrações foi retirado 0,5 ml do extrato da planta e misturado com 3,0 ml da solução de DPPH em um tubo de ensaio. Após 30 minutos esta solução foi lida em absorbância a 517 nm. De cada concentração realizou-se uma leitura em duplicata.

O ácido ascórbico foi usado como controle positivo utilizando concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Estas concentrações passaram pelos mesmos procedimentos anteriormente explicados para os extratos.

Com estas diferentes concentrações foram calculadas a concentração eficiente ( $CE_{50}$ ) que significa a concentração requerida para inibir ou decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Para o cálculo da  $CE_{50}$  usa-se as concentrações do padrão positivo ou das amostras como a variável independente ( $\mu\text{g/mL}$ ) e a porcentagem de DPPH remanescente ( $\% \text{DPPH}_{\text{REM}}$ ) como dependente para que possamos obter uma curva exponencial de primeira ordem e uma equação da qual calculamos a concentração eficiente (Sousa et al., 2007).

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = ([\text{DPPH}]_{\text{T=t}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}}) \times 100$$

Onde,  $[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}$  corresponde à concentração de DPPH após a reação com o extrato e  $[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}$  é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40  $\text{mg/mL}$  (100  $\mu\text{mol/mL}$ ) (Sousa et al., 2007).

### 2.5.3 Análise dos dados

Para testar se o conhecimento a respeito de plantas medicinais difere entre comunidades localizadas próximas a diferentes tipos vegetacionais, utilizamos dois testes. O primeiro foi o índice de Jaccard para comparar o grau de similaridade a respeito das plantas associadas nos tratamentos de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e a similaridade entre os grupos de doenças e/ou sintomas entre as duas comunidades. E o segundo foi o teste de qui-quadrado (independência) para analisar se a localização das

comunidades influencia na seleção de plantas relacionadas com estresse oxidativo a respeito do hábito e origem das mesmas.

Para saber se há diferença na atividade antioxidante, levando em consideração os valores de  $CE_{50}$ , das 10 espécies com maior IR% coletadas nos dois tipos vegetacionais, foi inicialmente testado a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Após, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para calcular a variância dos valores.

Além do mais, adotamos os critérios estabelecidos por Melo et al. (2010) para classificar os valores de  $CE_{50}$  em boa atividade antioxidante (de  $CE_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$ ) e baixa atividade antioxidante ( $CE_{50} > 165 \mu\text{g/mL}$ ). Esta classificação foi utilizada para analisar, por meio do teste de qui-quadrado (independência), se a proporção de plantas com boa atividade antioxidante e baixa atividade antioxidante está associada ao local de coleta.

Para testar se existe correlação entre os valores da atividade antioxidante ( $CE_{50}$ ) e os escores estabelecidos pelo IR% foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

Para todos os testes estatísticos foram utilizados o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

### 3. Resultados

#### 3.1 Levantamento Etnobotânico

De modo geral, as categorias e suas respectivas indicações que aparecem nas duas comunidades são bem semelhantes, com exceção apenas da categoria envelhecimento que obteve uma indicação para catarata na comunidade situada na Caatinga (Tabela 1). A categoria que obteve maior destaque foi a anti-inflamatória pelo fator de ter o maior número de diferentes indicações assim como pelo maior número de citações peculiares em cada comunidade (Tabela 1). Apesar de ter um maior número de indicações peculiares, a categoria com menor similaridade entre as indicações foi a sistema ósseo, com similaridade de 0,25, seguida por sistema sanguíneo com 0,4.

As categorias com maior similaridade, em ordem decrescente, foram: diabetes (1,00); cicatrizante (0,70); câncer (0,66) e anti-inflamatório (0,46). Apenas para a categoria envelhecimento não foi possível realizar o cálculo devido ser citada apenas para a comunidade da Caatinga. A categoria diabetes teve maior similaridade pelo fato de serem

citadas de modo direto, não havendo outros sintomas /ou indicações relacionadas a tal grupo nas duas comunidades.

Após os agrupamentos das doenças, selecionamos as espécies com mais de três citações e calculamos para cada espécie o índice de importância relativa baseado na porcentagem de citação (IR%) (Tabela 2). Foram listadas 34 espécies para a comunidade da Caatinga e 33 para a comunidade de Mata Atlântica. As espécies que obtiveram maiores valores de IR% na Caatinga: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), *Anacardium occidentale* L (Anacardiaceae) e *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae); na Mata Atlântica: *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. (Mimosaceae), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). A família Anacardiaceae obteve destaque em relação as plantas com maiores valores de IR%, além do mais, como pode ser visto na Tabela 2, *A. occidentale* aparece nas duas comunidades com altos valores de IR%.

Como esperado, houve uma baixa similaridade entre as espécies listadas nas duas comunidades (0,08), sendo as espécies que ocorrem nas listas das duas comunidades: *A. occidentale*, *Aloe vera*, *Punica granatum*, *Boerhavia diffusa* e *Schinus terebinthifolius*. Contudo, apesar de citada, *S. terebinthifolius* não é encontrada na comunidade de Caatinga, sendo suas cascas adquiridas pelos informantes por meio da compra em feiras ou trazidas de outras áreas. Isto mostra que há uma grande diferença no repertório de plantas conhecidas para terapias associadas com estresse oxidativo entre as duas comunidades.

Na comunidade da Caatinga das 34 espécies, 67,64% são consideradas nativas e 67% são árvores, mostrando a importância deste porte na seleção de plantas citadas em terapias relacionadas com estresse oxidativo, estando 11 espécies arbóreas entre as 15 espécies com maiores valores de IR%. Entre as exóticas (26,47%), apenas três estão entre as 15 que obtiveram os maiores valores de IR%, contudo algumas espécies (14,70%) não puderam ser identificadas a respeito de sua origem e domínio fitogeográfico.

Entre as plantas listadas na comunidade da Mata Atlântica apenas 33,33 % são consideradas nativas e 54,54 % são exóticas, sendo que quatro espécies não foram identificadas. As árvores representam 40% destas espécies, enquanto as ervas apresentaram valores maiores, 51,51%. Ao contrário dos resultados obtidos na área de Caatinga, das quinze espécies da área de Mata Atlântica que obtiveram maior IR%, a maioria são exóticas (oito) e de porte herbáceo (sete).

Existe diferença na seleção de plantas entre as duas comunidades, levando em consideração a origem ( $X^2 = 20,06$ ;  $p < 0,001$ ) e a forma de vida das espécies ( $X^2 = 23,73$ ;  $p < 0,001$ ). Mostrando que há um maior conhecimento de plantas nativas e de árvores pela comunidade da área de Caatinga.

### 3.2 Atividade antioxidante

Não houve diferença entre a atividade antioxidante das 10 espécies selecionadas nas duas comunidades ( $H = 0,2057$ ;  $p > 0,05$ ), mostrando que este conjunto de espécies apresentam o mesmo potencial no sequestro de radicais livres. Entre as espécies da Caatinga, *J. molissima* e *M. urundeuva* apresentaram os menores valores de  $CE_{50}$ , sendo assim consideradas as espécies com maior atividade antioxidante. Já para as amostras da Mata Atlântica, tiveram destaque *P. granatum*, *P. cochliacarpum* e *A. occidentale*, as quais apresentaram os melhores resultados de  $CE_{50}$ . Estas espécies das duas áreas tiveram resultados muito próximos do composto padrão (ácido ascórbico  $19,84 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ ), revelando muita eficiência, visto que o ácido ascórbico é uma substância pura e de referência em relação ao seu poder de sequestro de radicais livres.

Para ambas as áreas, *Aloe vera* obteve os piores resultados de atividade antioxidante, mostrando eficiência muito baixa no sequestro de radicais livres, quando comparada com as demais (Tabela 3). Este fato torna-se curioso, pois esta espécie obteve altos valores de IR% nas duas comunidades e levando em consideração a premissa que espécies que são mais conhecidas e/ou usadas pelas populações têm maior potencial de estudo para bioprospecção, esta mostrou ser uma exceção em termos de atividade antioxidante no sequestro de radicais livres.

Levando em consideração a classificação de Melo et al. (2010), o grupo de espécies coletado na Caatinga apresentou uma maior proporção de plantas com boa atividade antioxidante (70%) quando comparado com as de Mata Atlântica (40%), sendo estas proporções diferentes estatisticamente ( $X^2=13,58$ ;  $p<0,001$ ) (Tabela 3). Estes dados mostram que apesar de não ter sido visto diferença entre o conjunto de amostras coletadas nos dois ambientes, a Caatinga obteve um maior número de plantas com melhor atividade antioxidante, o que sugere que este ambiente pode ter grande potencial na coleta de plantas com maior atividade antioxidante.

### 3.3 Priorização das espécies e correlação com o IR%

Das 10 espécies selecionadas pelo maior IR% nas duas comunidades para avaliar a correlação deste índice com os valores de  $CE_{50}$  da atividade antioxidante destas espécies, observamos que houve correlação entre os valores da atividade antioxidante com os valores de IR% das amostras coletadas na área de Mata Atlântica ( $r_s = -0,69$ ;  $p < 0,05$ ), porém esta mesma correlação não foi significativa para as amostras de Caatinga ( $r_s = -0,28$ ;  $p > 0,05$ ). A correlação negativa e significativa observada para as espécies de Mata Atlântica demonstra que quanto maior o valor de IR%, menor é a concentração necessária para inibir ou decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, sendo assim considerada com melhor atividade sequestradora de radicais livres.

Quando correlacionamos os valores de  $CE_{50}$  com os valores de IR, sem a multiplicação da porcentagem de citação (dados não apresentados), não houve correlação tanto para os dados de Caatinga ( $r_s = 0,01$ ;  $p > 0,05$ ) quanto para os dados das espécies de Mata Atlântica IR ( $r_s = -0,54$ ;  $p > 0,05$ ).

## 4. Discussão

### 4.1 Levantamento etnobotânico

As diferenças observadas nas duas comunidades em relação ao grupo de doenças classificadas na categoria anti-inflamatório devem-se principalmente a particularidades locais. Entre elas podemos destacar inflamações relacionadas ao sistema ocular, uma vez que não apareceu na comunidade da Caatinga e apresentou quatro sintomas na comunidade da Mata Atlântica. Esta segunda comunidade foi acometida por um surto de conjuntivite durante o período de entrevista, fato que influenciou na citação de plantas relacionadas a este problema. Isto sugere que populações acometidas por surtos durante o período de entrevistas podem enviesar os dados coletados, uma vez que plantas que são conhecidas para tratar o problema em questão podem ter um aumento no número de citações devido ao período em que os dados foram coletados, devendo o pesquisador estar atento a estes fatos, documentando a prevalência epidemiológica e saliência das condições de saúde da população do estudo e as razões que levam ao uso particular de determinadas espécies (Berlin e Berlin, 2005; Browner et al., 1998).

Além do mais, a categoria anti-inflamatório foi o que obteve a maior diversidade de sintomas e/ou doenças nas duas comunidades. Para Ferreira Junior et al. (2011) a

inflamação trata-se de uma categoria complexa pelo fato de apresentar diversas subcategorias em um sistema médico tradicional. Esta complexidade deve-se ao fato dos processos inflamatórios terem como características a formação de eritema, causados pela vasodilatação, edema e dor que envolvem diversos mediadores químicos e podem afetar diversos órgãos (Costa et al., 2009; Dummer et al., 2007; Voltarelli, 1994), fazendo com que as pessoas usem as plantas para os mais diversos tipos de situações e características inflamatórias (Ferreira Junior et al., 2011).

Algumas revisões sobre o uso de plantas conhecidas por populações do Nordeste do Brasil (Agra et al., 2007, 2008; Albuquerque et al., 2007) mostram que dezenas de plantas nativas e exóticas são citadas para os mais diversos tipos de inflamações. Ferreira Junior (2011) ao analisar a revisão de Albuquerque et al. (2007) a respeito do uso de plantas da Caatinga, verificaram a indicação de 123 diferentes espécies relacionadas a algum tipo de inflamação, mostrando a versatilidade de plantas que podem ser utilizadas por povos da Caatinga. Mais especificamente, em estudo anteriormente realizado na comunidade do Carão, foram identificadas 24 espécies nativas da Caatinga que são utilizadas em processos inflamatórios, mostrando a diversidade de espécies que podem ser utilizadas nesses processos (Ferreira Junior et al., 2011).

Entre os grupos de doenças relacionados ao estresse oxidativo, diabetes obteve a maior similaridade entre as comunidades. Apesar de diversos sintomas poderem ser relacionados a tal doença, como aumento de sede, inchaço, inflamação, artrite, diarreia, entre outros (Leduc et al., 2006), para as duas comunidades estudadas existem um consenso em relação ao termo e outros sintomas não foram relatados como associados a diabetes. O termo hipoglicemiante exemplifica este achado, pois poderia ser fortemente relacionado a esta doença, contudo, foi relatado como sendo independente do quadro de diabetes.

Como esperado, houve uma baixa similaridade entre as espécies conhecidas pelas duas comunidades. Um dos principais fatores que influenciam nesta diferença são as condições ambientais as quais influenciam na formação dos tipos vegetacionais e conseqüentemente nos recursos vegetais disponíveis em cada região (Albuquerque et al., 2008; Inta et al., 2008; Ladio et al., 2007). A similaridade em nosso estudo foi menor do que o observado por Ladio et al. (2007), que ao estudarem comunidades que vivem em zonas áridas e florestas úmida na Patagônia Argentina, encontram 40% de similaridade

entre as espécies conhecidas por estas comunidades, sendo estes valores atribuídos a fato das comunidades estarem situadas a diferentes ambientes ecológicos.

Uma baixa similaridade do conhecimento de plantas também foi vista entre povos Akha que vivem em diferentes localidades da Tailândia e China e que foram separados a cerca de 120 anos (Inta et al., 2008). Neste estudo, das 95 plantas conhecidas, apenas 16 são similares entre as cinco vilas estudadas, evidenciando que mesmo tendo uma origem étnica comum, o conhecimento a respeito de plantas medicinais é fortemente influenciado pelo contexto ambiental onde a população está inserida.

Todavia, nos dois estudos anteriormente mencionados, foram relatados que apesar da baixa similaridade entre as plantas conhecidas pelas comunidades que vivem em ambientes diferentes, há um padrão parecido entre estas comunidades quando é levado em consideração o hábito e a origem biogeográfica das espécies. Estes dados vão de encontro aos nossos uma vez que a comunidade da Caatinga conhece mais espécies arbóreas e nativas, que é um padrão muito diferente da comunidade da Mata Atlântica. Uma explicação para nossos dados não corroborarem com os outros estudos pode ser devido a estes levarem em consideração comunidades de mesma identidade cultural e/ou origem étnica e o nosso não. Isto sugere que o ambiente influencia fortemente no conhecimento a respeito das espécies disponíveis em cada localidade, porém o hábito e a origem geográfica das mesmas parecem ser mais influenciados pela origem étnica das comunidades.

Nossos dados a respeito desse padrão de conhecimento das duas comunidades são apoiados por outros estudos realizados no Brasil. Em relação a Caatinga, nossos achados apoiam as afirmações encontradas por alguns trabalhos (Almeida et al., 2005; Cartaxo et al., 2010), sumarizados por Albuquerque (2010), de que povos tradicionais que moram em áreas de Caatinga preferem plantas que são perenes, no caso árvores, e nativas mesmo quando as ervas são mais abundantes, uma vez que é sugerido que as pessoas preferem ter sempre o recurso que é mais disponível do que mesmo o recurso que seja mais eficiente.

Entre as plantas da Caatinga que tiveram destaque em nosso levantamento, *M. urundeuva*, *A. occidentale*, *M. rigida* apresentaram altos valores de consenso entre os informantes em outros estudos etnobotânicos neste ambiente (Albuquerque et al., 2006, 2007; Araújo et al., 2008; Silva e Andrade, 2004). Estes dados sugerem que estas espécies são importantes para pessoas vivem nesta região, uma vez que estes estudos são levantamentos realizados também em outras comunidades. Esta ideia pode ser reforçada

pelo fato destas espécies apresentarem grandes valores de consenso tanto quando são relacionadas a várias terapias (Albuquerque et al., 2006, 2007; Silva e Andrade, 2004) como também quando são pautadas para usos terapêuticos mais específicos, como uso cicatrizante e anti-inflamatório (Araújo et al., 2008) e como abordado em nosso estudo, mostrando que estas espécies nativas são importantes tanto pela sua diversidade como também por suas determinadas especificidades terapêuticas.

Em relação aos resultados a respeito da comunidade da área de Mata Atlântica, dados apresentados por alguns trabalhos realizados em diversas comunidades que utilizam recursos deste ambiente para fins medicinais corroboram com os nossos achados, pois também mostram que plantas de porte herbáceo e de origem exótica foram mais conhecidas e/ou usadas que plantas de porte arbóreo e de origem nativa (Almeida et al., 2012; Begossi et al., 2002; Di Stasi et al., 2002; Gazzaneo et al., 2005).

Em dois trabalhos realizados em outra comunidade próxima a nossa área de estudo (ver Gazzaneo et al., 2005; Almeida et al., 2012), os autores encontraram que espécies exóticas são mais conhecidas do que as espécies nativas e receberam altos valores de Importância Relativa (IR) e Valor de Uso (VU), o que confirma que além de serem a maioria entre as espécies, as plantas exóticas também são prioritárias em determinados tratamentos terapêuticos. Contudo, as espécies exóticas que tiveram maiores valores diferem das espécies encontradas em nosso estudo, sugerindo que elas têm funções mais específicas, uma vez que nos estudos anteriores não foram feitas distinções a respeito de usos terapêuticos, sendo estes dados contrários ao que sugerimos para os dados da Caatinga a respeito das plantas que tem maior consenso de uso (Gazzaneo et al., 2005; Almeida et al., 2012)

Por outro lado, as espécies que obtiveram maior consenso e diversidade de uso entre nossos informantes foram as árvores nativas, *P. cochliocarpum*, *S. terebinthifolius* e *A. occidentale*. Estas espécies também apresentaram altos valores de IR e de VU nos estudos citados anteriormente, confirmando, assim, a importância destas espécies para as pessoas desta região do ponto de vista medicinal.

Três possíveis fatores, em consonância ou em separado, podem explicar estes resultados sobre o conhecimento das espécies nativas de cada região, sendo eles relacionados ao acesso de recursos. Uma das possíveis explicações para estes resultados esta na disponibilidade de acesso aos recursos florestais e consequentemente nativos, visto

que, apesar da comunidade de Canaã ser servida por fragmentos de mata, estas matas são pertencentes a uma empresa agroaçucareira (Usina São José) que restringe e proíbe a retirada de determinados recursos. Em Carão apesar de existir propriedades privadas, os moradores de forma geral não proíbem a retirada de plantas medicinais de suas áreas por parte de outros. Relato sobre como a restrição por parte da usina pode afetar no uso de plantas nativas da região também foram apresentados por Gazzaneo e colaboradores (2005). Estes autores afirmam que a proibição de uso de plantas nativas dos fragmentos pode representar perda de conhecimento a respeito destas espécies em longo prazo.

Uma segunda explicação é que apesar das duas comunidades serem compostas por famílias de agricultores, a de Canaã trabalha na monocultura da cana-de-açúcar, restringindo seu trabalho a locais específicos, sem nenhuma riqueza floral e o acesso ao campo de trabalho se faz de ônibus. Em Carão, os agricultores trabalham tanto em roçados próximo a casa quanto na serra, onde tem uma diversidade e proximidade com uma maior riqueza florestal e o acesso ao campo de trabalho é a pé tendo maior contato com as espécies da região.

Por último, os tamanhos das propriedades que nas duas comunidades são bem distintas, sendo na Mata Atlântica caracterizadas por casas cercadas de pequenos quintais, os quais não têm muita área para manter árvores no local, restringindo mais a espécies de pequeno porte. De modo contrário, na área de Caatinga, grande parte das residências tem disponibilidade de grandes áreas de quintais e terrenos, tendo com isso um acesso de recursos mais próximo.

Estas observações podem ser explicadas pela ideia de que "recursos vegetais mais acessíveis são mais úteis para as pessoas, não só a nível de espécies de plantas individuais, mas também para comunidades vegetais inteiras" (Thomas et al., 2009).

#### 4.2 Atividade antioxidante

De modo contrário ao que se esperava, não foram observadas diferenças entre as atividades antioxidantes das amostras das duas áreas de coleta. Vários estudos mostram que espécies coletadas em diferentes condições ambientais tem sua capacidade antioxidante alterada (Araújo et al., 2012; Dat et al., 2000; Mccune e Johns, 2007; Silva et al., 2007).

Levando em consideração a premissa que em florestas úmidas existe uma maior disponibilidade de luz, temperatura, oxigênio e água que em florestas secas (Gottlieb et al., 1996), era de se esperar que houvesse diferença entre os grupos das amostras. Esta diferença poderia ser esperada uma vez que, por exemplo, em *Fagus sylvatica* compostos com função antioxidante como ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol têm suas concentrações alteradas quando esta espécie exposta a maior incidência de luz (Wieser et al., 2003).

Em *Caesalpinia echinata*, a variação da concentração e porcentagem de glutathione reduzida foram relacionadas negativamente com a temperatura, por outro lado a atividade das enzimas peroxidases e superóxido dismutase apresentaram relação positiva com este fator (Bulovas et al., 2005), mostrando que todas estas substâncias que estão envolvidas no sistema antioxidante das plantas são afetadas pela alteração da temperatura. Os níveis de glutathione reduzida também foram afetados pelo estresse hídrico, onde a redução de água aumenta a produção de glutathione em *Triticum aestivum* (Glamber e Burke, 1984).

Resultados semelhantes a estes foram apresentados por McCune e Johns (2007), os quais concluíram que locais com maior exposição ao sol, mais secos ou com solo mais pobres apresentaram espécies com melhor atividade antioxidante no sequestro de radicais livres, relatando que esta diferença de atividade encontrada em diferentes condições dos locais de coleta podem ser percebido pelos conhecedores da localidade.

#### 4.3 Correlação dos índices

Das análises entre os índices e a  $CE_{50}$  da atividade antioxidante, apenas os valores de IR% se correlacionaram com as amostras da área de Mata Atlântica. O trabalho de Bennett e Prance (2000) que propõe o Índice de Relatividade, tem como características o seu grau de originalidade e novidade a partir de um ponto de vista teórico, sendo citado por 81 artigos indexados no banco de dados do SCOPUS. Destes artigos, aproximadamente 38% fazem a replicação da técnica quantitativa apresentada por estes estudos, sendo estas técnicas mais consideradas nos estudos do que o aspecto teórico que estes trabalhos abordam (Ramos et al., 2012). O grande uso de ferramentas quantitativas pode ser devido a ideia de que alguns autores tem de que a quantificação trás maior qualidade aos trabalhos em etnobotânica (Albuquerque, 2009) e, neste caso, por se tratar de cálculos simples e fáceis de serem realizados.

Contudo, este índice tem suas limitações, pois caso apenas uma pessoa cite um grande número de usos ou várias indicações terapêuticas esta planta pode ter sua importância relativa superestimada, sendo muito influenciada pela diversidade de usos relacionados a planta (Albuquerque et al., 2006) não sendo levado em consideração o quanto o conhecimento desta espécie é compartilhado entre os outros membros da comunidade.

Com isso, fica claro que uma espécie poderia ser prioritária para testes em laboratório, mesmo não sendo uma espécie conhecida pela comunidade em geral, mas por ter um maior IR, mesmo que apenas para um informante. Isto se deve ao fato deste índice não levar em consideração no seu cálculo nenhum fator relacionado ao consenso entre os informantes, uma vez não usa o número de informantes relacionados no levantamento dos dados, podendo uma planta ter alta importância relativa sendo conhecida por uma pequena parcela de informantes (Albuquerque et al., 2006).

Nossa proposta vem justamente para diminuir o que consideramos ser uma limitação do índice de Importância Relativa, uma vez que acreditamos que espécies que tenham maior consenso entre os informantes tenham maior chance de sucesso na busca de medicamentos. Esta adaptação mostrou a princípio ser uma boa forma para selecionar plantas coletadas na Mata Atlântica que estão relacionadas com doenças e/ou sintomas que envolvem estresse oxidativo, uma vez que houve correlação entre os valores de IR% e  $CE_{50}$ , não havendo correlação para os valores de IR sem a multiplicação pela porcentagem de citação.

Estes achados são importantes, pois diversos trabalhos tem usados índices como o IR para classificar plantas medicinais com os mais diferentes focos (Aburjai et al., 2007; Albuquerque e Oliveira 2007; Albuquerque et al., 2008; Gazzaneo et al., 2005;), contudo nenhum deles, pelo nosso conhecimento, teve como foco correlacionar os valores deste índice com valores obtidos em testes *in vitro*. Apenas o trabalho de Araújo et al. (2008) correlaciona teores de taninos e flavonoides com técnicas de priorização de plantas com indicação cicatrizante e/ou anti-inflamatória utilizando ferramentas quantitativas (VIS e Saliência), mostrando que estas técnicas foram eficientes na seleção das espécies, sendo ainda escassos trabalhos com este foco.

## 5. Conclusão

Como esperado, as duas comunidades selecionam de modos distintos plantas usadas para sintomas e/ou doenças relacionados com estresse oxidativo, sendo esta distinção atribuída a localização destas comunidades em diferentes tipos vegetacionais. Ao contrário do que intuímos, comunidades que dispõem de maior diversidade de recursos vegetais em áreas nativas não necessariamente conhecem mais espécies nativas.

As atividades antioxidante do conjunto de amostras selecionadas nas duas comunidades não diferiram estatisticamente, mostrando que os efeitos ecogeográficos foram decisivos apenas na seleção das espécies para as duas comunidades. Isso mostra que ambas as comunidades apesar de selecionarem plantas de modos diferentes, conhecem espécies com alta capacidade no sequestro de radicais livres.

Estas seleções de plantas, com alta capacidade antioxidante, podem ser devido ao consenso entre os informantes, em especial aos que moram próximos a área de Mata Atlântica devido aos valores obtidos pela análise antioxidante das plantas desta área terem sido correlacionados com os escores estabelecidos pela adaptação do índice de importância relativa.

## 6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à comunidade de Carão e de Canaã para aceitarem e nos ajudarem a realizar este estudo. Ao Dr. Ernani Machado de Freitas Lins Neto, o Dr. Joabe Gomes de Melo, a bióloga Flávia dos Santos Silva, ao Msc. Alyson Luiz Santos de Almeida, a bióloga Luciana Gomes de Sousa, a Dra. Viviany Teixeira do Nascimento, a Msc. Lucilene Lima dos Santos e ao Dr. Nelson Leal Alencar do Laboratório de Etnobotânica Aplicada (LEA) para a sua assistência na coleta de dados etnobotânicos na área de Caatinga, a bióloga Victoria Duarte Lacerda e ao biólogo Miguel Santana de Almeida Neto pelo apoio de campo durante a sua estadia no LEA; Aos Biólogos Daniela Sena, Lucian Leite e André Borba, no auxílio das análises antioxidantes; A prefeitura de Altinho em especial a Secretária de Agricultura e a Prefeitura de Araçoiaba em especial a Secretária de Saúde e aos agentes comunitários de saúde do Carão, Srs. Inaldo e Alexandre e de Canaã, Sras. Mariinha, “Tita” e Maria pelo apoio logístico. Ao

CNPq pelo apoio financeiro ("Edital Universal") e concessão de produtividade atribuído à U.P. Albuquerque, e a Facepe pela Bolsa de Doutorado concedida a T.A.S. Araújo.

## Referências

- Aburjai, T., Hudaib, M., Tayyema, R., Yousef, M., Qishaw, M., 2007. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region. *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 294–304.
- Agra, M.F., Baracho, G.S., Nurit, K., Basílio, I.J.L.D., Coelho, V.P.M., 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 383-395.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., França, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18, 472-508.
- Albuquerque, U.P., 2009. Quantitative ethnobotany or quantification in ethnobotany? *Ethnobotany Research and Applications*. 7, 1–3.
- Albuquerque, U.P., 2010. Implications of Ethnobotanical Studies on Bioprospecting Strategies of New Drugs in Semi-Arid Regions. *The Open Complementary Medicine Journal*. 2, 21-23.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Lins Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 114, 325–354.
- Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., Monteiro, J.M., Florentino, A.T.N., Almeida, C. F.C.B.R., 2006. Evaluating Two Quantitative Ethnobotanical Techniques. *Ethnobotany Research and Applications*. 4, 51-60.
- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., Silva, A.C.O., 2005. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). *Acta Botanica Brasil*. 19, 1-16.
- Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., Alencar, N. L., 2010. Métodos e técnicas para coleta de dados. In: Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., Cunha, L.V.F.C. (Org.). Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. NUPEEA, Recife, 1, pp. 39-64.
- Albuquerque, U.P., Oliveira R.F., 2007. Is the use-impact on native Caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 156–170.
- Albuquerque, U.P., Silva, V.A., Cabral, M.C., Alencar, N.L., Andrade, L.H.C. 2008. Comparisons between the use of medicinal plants in indigenous and rural Caatinga (drylands) communities in NE Brazil. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 7, 156 – 170.
- Almeida, C.F.C.B.R., Lima e Silva, T.C., Amorim, E.L.C., Maia, M.B.S., Albuquerque, U.P., 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of

medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments*. 62, 127 – 142.

Almeida, C.C.B.R., Ramos, M.A., Silva, R.R.V., Melo, J.G., Medeiros, M.F.T., Araújo, T.A.S., Almeida, A.L.S., Amorim, E.L.C., Alves, R.R.N., Albuquerque, U.P., 2012. Intracultural Variation in the Knowledge of Medicinal Plants in an Urban-Rural Community in the Atlantic Forest from Northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1-15.

Araújo, T.A.S., Alencar, N.L., Amorim, E.L.C.; Albuquerque, U.P., 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 120 (1), 72-80.

Araújo, T.A.S., Almeida, V.T.C., Amorim, E.L.C.; Albuquerque, U.P., 2012. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae). *Pharmaceutical Biology*. 50(6): 754–759.

Ayres, M., Ayres, M.J., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2007. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Brasília, Brazil: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq.

Begossi, A., Hanazaki, N., Tamashiro, J.Y., 2002. Medicinal plants in the Atlantic Forest (Brasil): knowledge, use and conservation. *Human Ecology*. 30, 281–299.

Bennett, B.C., Prance, G.T., 2000. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of northern South America. *Economic Botany*. 54(1), 90–102.

Berlin, E.A., Berlin, B., 2005. Some Field Methods in Medical Ethnobiology. *Field Methods*. 17 (3), 2005 235–268.

Bianchi, M.L.P., Antunes, L.M.G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição*. 12(2), 123-130.

Boudet, A.-M., 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 68, 2722–2735.

Browner, C.H., Montellano, B.R.O., Rubel, A.J., Benoist, J., Cerroni-Long, E.L., Charzewska, J., Colby, B.N., Garro, L.C., Gonzalez, N.L., Good, B., Hall, R.L., Janzen, J.M., Kleinman, A., Pollak-Eltz, A., 1998. A Methodology for Cross-cultural Ethnomedical Research. *Current Anthropology*. 29 (5), 681-702.

Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C., Domingos, M., 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica*. 28 (4), 687-696.

Cartaxo, S.L., Souza, M.M.A., Albuquerque, U.P., 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 131, 326-342.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1996. *Radicais livres em medicina*. Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, 260p.

Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 163, 1161-1168.

Costa, C.H., Rufino, R., Lapa e Silva, J.R., 2009. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 55 (3), 347-354.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montagu, M.V., Inzé, D., Breusegem, F.V., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*. 57, 779-795.

Desmarchelier, C., Lisboa Romão, R., Coussio, J., Ciccía, G., 1999. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 67, 69-77.

Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tien, O.S.; Kakinami, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. 73, 69-91.

Dummer, C.D., Thome, F.S., Veronese, F.V., 2007. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 53 (5), 446-450.

Esterbauer, H., Wäg, G., Puhl, H., 1996. Peroxidação lipídica e seu papel na aterosclerose. In: Cheeseman, K. H., Slater, T. F., Radicais livres em medicina. Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, pp. 87-96.

Ferreira, A.L.A., Matsubara L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista de Assistência Médica Brasil*. 43(1), 61-87.

Ferreira Júnior, W.S., Ladio, A.H., Albuquerque, U.P., 2011. Resilience and Adaptation in the Use of Medicinal Plants with Suspected Anti-Inflammatory Activity in the Brazilian Northeast. *Journal of Ethnopharmacology*. 138, 238-252.

Ferreira Júnior, W.S. Plantas medicinais na Caatinga: extrativismo, resiliência e redundância utilitária. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, 126 pgs.

Flora do Brasil. Lista de Espécies da Flora do Brasil 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/index>. Acessado em: 20 de janeiro de 2012.

Gazzaneo, L., Lucena, R.P., Albuquerque, U.P., 2005. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 1, 1-8.

Gamble, P.E., Burke, J.J., 1984. Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System: I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiology*. 76, 615-621.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 30 (2), 374-381.

- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C., Borin, M.R.M., 1996. Biodiversidade – um enfoque químico-biológico. Editora UFRJ, Rio de Janeiro.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of ‘Rasayana’ herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 165–178.
- Houghton, P.J., Howesb, M.-J., Lee, C.C., Steventon, G., 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 391–400.
- Inta, A., Shengji, P., Balslev, H., Wangpakapattanawong, P., Trisonthi, C., 2008. A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence? *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (3), 508-517.
- Ladio, A., Lozada, M., Weigandt, M., 2007. Comparison of traditional wild plant knowledge between aboriginal communities inhabiting arid and forest environments in Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments*. 69( 4), 695-715.
- Leduc, C., Coonishish, J., Haddad, P., Cuerrier, A., 2006. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *Journal of Ethnopharmacology*. 105, 55- 63.
- Lima, V.L.A.G., Mélo, E.A., Maciel, M.I.S., Silva, G.S.B., Lima, D.E.S., 2004. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). *Revista de Nutrição*. 17 (1), 53-57.
- Mccune, L.M., Johns, T., 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *Journal Ethnopharmacology*. 82, 197-205.
- Mccune, L.M., Johns, T., 2007. Antioxidant activity relates to plants part, life form and condition in some diabetes remedies. *Journal Ethnopharmacology*. 112, 461-469.
- Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Lucena, R.F.P., Albuquerque U.P., 2010. Uso de estímulos visuais na pesquisa etnobotânica. In: Albuquerque U.P., Lucena, R.F.P., Cunha, L.V.F.C. (Org.). Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. NUPEEA - Recife. 1, 151-170.
- Melo, J.G., Araújo, T.A.S., Castro, V.T.N.A., Cabral, D.L.V., Rodrigues, M.D., Nascimento, S., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2010. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. *Molecules*. 15, 8534-8542.
- Moerman, D.E., 2007. Agreement and meaning: Rethinking consensus analysis. *Journal of Ethnopharmacology*. 112, 451–460.
- Olszewer, E., 1995. Radicais livres em medicina. 2ed. São Paulo.
- Ramos, M.A., Melo, J.G., Albuquerque, U.P., 2012. Citation behavior in popular scientific papers: what is behind obscure citations? The case of ethnobotany. *Scientometrics*. 1-9.

Silva, V.A., Andrade, L.H.C., 2004. O significado cultural das espécies botânicas entre indígenas de Pernambuco: o caso Xucuru. *Biotemas*. 17 (1), 79 – 94.

Silva, F.G., Oliveira, C.B.A., Pinto, J.E.B., Nascimento, P.V.E., Santos, S.C., Seraphind, J.C., Ferri, P.H., 2007. Seasonal Variability in the Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera* *Journal Brazilian Chemistry Society*. 18 (5), 990-997.

Sousa, C.M.M., Rocha e Silva, H., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.

Thomas, E., Vandebroek, I., Van Damme, P., Goetghebeur, P., Douterlungne, D., Sanca, S., Arrazola, S., 2009. The relation between accessibility, diversity and indigenous valuation of vegetation in the Bolivian Andes. *Journal of Arid Environments*. 73 (9), 854-861.

Voltarelli, J.C., 1994. Febre e inflamação. *Medicina*. 27 (1/2), 7-48.

Wieser, G., Hecke, K., Tausz, M., Hberle, K.-H., Grams, T.E.E., Matyssek, R., 2003. The influence of microclimate and tree age on the defense capacity of European beech (*Fagus sylvatica* L.) against oxidative stress. *Annals of Forest Science*. 60, 131- 135.

Tabela 1- Categorias de doenças, em duas comunidades do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, com suas respectivas indicações terapêuticas locais, citadas de forma diretas ou indiretas, relacionadas a estresse oxidativo. Indicações entre parênteses são variações de termos locais para a mesma indicação.

Comunidade do Carão – Caatinga (101 informantes)		Comunidade de Canaã – Mata Atlântica (133 informantes)	
<b>Cicatrizantes</b>	<b>Anti-inflamatórias</b>	<b>Cicatrizantes</b>	<b>Anti-inflamatórias</b>
Cicatrizante	Anti-inflamatório	Cicatrizante	Anti-inflamatório
Corte	Corrimento vaginal (corrimento de mulher, inflamação feminina, inflamação de mulher, inflamação vaginal ou remédio de mulher)	Corte	Corrimento vaginal (doença de mulher, ou inflamação vaginal, inflamação de mulher, lavagem de mulher)
Úlcera	Inflamação	Úlcera	Inflamação
Queimadura	Inflamação no dente (dente inflamado)	Queimadura	Inflamação no dente (dente inchado)
Ferimento	Inflamação na garganta	Ferimento	Inflamação na garganta (garganta inflamada)
Ferida	Inflamação uterina (problema uterino)	Ferida	Inflamação uterina (útero)
Sanativo	Inflamação ovariana	Ferida de boca	Inflamação ovariana (inflamação no ovário)
Corte inflamado	Inflamação urinária (problema urinário)		Inflamação urinária
	Inflamação renal (rins ou problemas renais)		Inflamação renal (rins ou rins inflamado)
<b>Sistema sanguíneo</b>	Cabeça de prego	<b>Sistema sanguíneo</b>	Cabeça de prego (furúnculo ou caroço)
AVC	Inchaço	AVC	Inchaço
Baixar o colesterol	Sinusite	Baixar o colesterol (colesterol)	Sinusite

Afinar o sangue	Eczema	Hipoglicemiante	Eczema
Sangue pisado	Dor de dente		Dor de dente
	Gastrite		Gastrite
<b>Diabetes</b>	Inflamação na uretra	<b>Diabetes</b>	Erisipela (vermelhão ou má vizinho)
	Inflamação dos pés		Inflamação no olho
<b>Câncer</b>	Inflamação na bexiga	<b>Câncer</b>	Inflamação intestinal
Próstata	Inflamação na coluna	Próstata	Inflamação bucal
Câncer	Dor de garganta	Câncer	Olho inflamado
Verruga	Perna inchada		Dor nos rins
	Perna vermelha	<b>Sistema ósseo</b>	Olho remelando
<b>Sistema ósseo</b>		Artrite	Olho vermelho
Reumatismo	<b>Envelhecimento</b>	Reumatismo	Conjuntivite
Osteoporose	Catarata	Fortalecer o osso	Cistite

Tabela 2- Valores de Importância relativa baseada na porcentagem (IR%) de espécies medicinais, conhecidas e/ou usadas pelas comunidades de Carão (Caatinga, Altinho-PE) e Canaã (Mata Atlântica, Araçoiaba-PE) para fins relacionados a atividade antioxidante.

Caatinga					Mata Atlântica				
Espécie/ Família	Nome local	Origem	Hábito	IR%	Espécie/ Família	Nome local	Origem	Hábito	IR%
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão / Anacardiaceae	Aroeira	N	Arv	1,12	<i>Pithecellobium cochliacarpum</i> (Gomes) J.F. Macbr / Fabaceae	Barbatenom	N	Arv	0,58
<i>Anacardium occidentale</i> L./Anacardiaceae	Caju roxo	N	Arv	0,53	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi/ Anacardiaceae	Aroeira	N	Arv	0,57
<i>Maytenus rigida</i> Mart./Celastraceae	Bom nome	N	Arv	0,21	<i>Anacardium occidentale</i> L./ Anacardiaceae	Caju	N	Arv	0,53
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir./Euphorbiaceae	Jurema preta lisa	N	Arv	0,20	<i>Punica granatum</i> L./ Punicaceae	Romã	E	Arv	0,41
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f./Liliaceae	Babosa	E	Her	0,18	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f./ Liliaceae	Babosa	E	Her	0,37
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill./Euphorbiaceae	Pião bravo	N	Arb	0,17	<i>Rosmarinus officinalis</i> L./ Lamiaceae	Alecrim	E	Her	0,08
<i>Croton conduplicatus</i> Kunth / Euphorbiaceae	Velame	E	Arb	0,16	<i>Boerhavia diffusa</i> L. Nyctagenaceae	Pega pinto	E	Her	0,07
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda / Anacardiaceae	Umbu	N	Arv	0,13	<i>Tillandsia usneoides</i> (L.) L. / Bromeliaceae	Salambaia	N	Her	0,04
<i>Gossypium hirsutum</i> L./ Malvaceae	Algodão	E	Arb	0,09	<i>Averrhoa carambola</i> L./	Carambola	E	Arv	0,04

<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan/ Mimosaceae	Angico	N	Arv	0,07	Oxalidaceae	Não identificada	Mulungu	NI	Arv	0,03
<i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud./ Fabaceae	Mororó	N	Arv	0,07	<i>Ocimum basilicum</i> L./ Lamiaceae	Manjerição	E	Her	0,04	
<i>Cereus jamacaru</i> DC./ Cactaceae	Mandacaru	N	Arv	0,07	<i>Cnidioscolus urens</i> (L.) Arthur / Euphorbiaceae	Urtiga	N	Her	0,03	
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl./ Anacardiaceae	Baraúna	N	Arv	0,06	<i>Musa paradisiaca</i> L. / Musaceae	Banana pão	E	Arv	0,03	
<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P.Queiroz / Fabaceae	Jucá	N	Arv	0,04	<i>Peperomia pellucida</i> H.B.K./ Piperaceae	Língua de sapo	N	Her	0,03	
<i>Handroanthus impetiginosus</i> Mattos / Bignoniaceae	Pau d'arco roxo	N	Arv	0,04	<i>Persea americana</i> Mill./ Lauraceae	Abacate	E	Arv	0,02	
<i>Syagrus cearensis</i> Noblick / Arecaceae	Coqueiro catolé	E	Arv	0,04	<i>Costus</i> sp./Costaceae	Cana de macaco	NI	Her	0,02	
<i>Euphorbia tirucalli</i> L/ Euphorbiaceae	Avelóz	E	Arv	0,04	<i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Delile) Sch. Bip. ex Walp. / Asteraceae	Alcachofra	N	Arb	0,02	
<i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Roem. & Schult.) T.D.Penn. / Sapotaceae	Quixaba	N	Arv	0,04	<i>Smilax siphilitica</i> Humb. & Bonpl. ex Willd./ Smilacaceae	Japocanga	N	Cipó	0,02	
<i>Erythrina velutina</i> Willd./ Fabaceae	Mulungu	N	Arv	0,03	<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg ./ Moraceae	Fruta pão	E	Her	0,02	

<i>Hyptis suaveolens</i> Poit./ Lamiaceae	Alfazema	N	Her	0,03	<i>Pimpinella anisum</i> L. / Apiaceae	Erva doce	E	Her	0,02
<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Sm ./ Fabaceae	Imburana açu	N	Arv	0,03	<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey./ Rubiaceae	Vassorinha de botão	N	Her	0,02
<i>Jatropha curcas</i> L./ Euphorbiaceae	Pião manso	N	Arb	0,03	<i>Capsicum frutescens</i> L./ Piperaceae	Pimenta	E	Arb	0,01
Croton sp3 / Euphorbiaceae	Velame branco	NI	Arb	0,03	<i>Phyllanthus</i> sp. / Phyllanthaceae	Quebra-pedra	NI	Her	0,01
<i>Cedrela odorata</i> L./ Meliaceae	Cedro	N	Arv	0,03	<i>Elaeis guineensis</i> L./ Arecaceae	Dendê	E	Arv	0,01
<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum./ Rubiaceae	Quina quina	N	Arv	0,03	<i>Foeniculum vulgare</i> Gaertn./ Apiaceae	Endio	E	Her	0,01
Mimosaceae sp / Mimosaceae	Barbatimão	NI	Arv	0,02	<i>Mentha piperita</i> L./ Lamiaceae	Hortelã miúda	E	Her	0,01
<i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P.Queiroz / Fabaceae	Catingueira	N	Arv	0,02	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand/ Burseraceae	Mescla	N	Arv	0,01
<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J.B.Gillett/ Burseraceae	Imburana	N	Arv	0,02	<i>Mangifera indica</i> L./ Anacardiaceae	Manga espada	E	Arv	0,01
<i>Passiflora foetida</i> L./ Passifloraceae	Maracujá de estralo	N	Her	0,02	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels ./ Myrtaceae	Azeitona	E	Arv	0,01
<i>Boerhavia diffusa</i> L. Nyctagenaceae	Pega pinto	E	Her	0,02	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. / Apocynaceae	Boa noite	E	Her	0,01
<i>Punica granatum</i> L./ Punicaceae	Romã	E	Arv	0,02	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haw./ Crassulaceae	Corona	E	Her	0,01

<i>Maranta divaricata</i> Roscoe/ Marantaceae	Cana de macaco	E	Her	0,02	<i>Luffa operculata</i> L. Cong./ Cucurbitaceae	Cabacinha	N	Her	0,01
<i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi / Anacardiaceae	Aroeira da china	E	Arv	0,01	<i>Bauhinia</i> sp.	Pata de vaca	NI	Arv	0,01
<i>Manihot dichotoma</i> Ule/ Euphorbiaceae	Maniçoba	N	Arb	0,01					

N=nativa; E= Exótica; NI= não identificado. Arv = Arbóreo; Her =Herbáceo; Arb = Arbusto.

Tabela 3 - Valores da Atividade Antioxidante expressa em CE<sub>50</sub> de plantas medicinais com maior porcentagem de IR% em duas regiões do Nordeste do Brasil. Valores médios seguidos por erro padrão.

Caatinga			Mata Atlântica		
Espécie	Parte	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Espécie	Parte	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Jatropha mollissima</i>	Látex	17,28 ± 0,98 <sup>a</sup>	<i>Punica granatum</i>	Casca do fruto	12,61 ± 0,16 <sup>a</sup>
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Casca	17,74 ± 0,01 <sup>a</sup>	<i>Anacardium occidentale</i>	Casca	16,67 ± 0,19 <sup>a</sup>
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Casca	22,23 ± 0,23 <sup>a</sup>	<i>Pithecellobium cochliacarpum</i>	Casca	21,26 ± 0,26 <sup>a</sup>
<i>Anacardium occidentale</i>	Casca	23,51 ± 1,60 <sup>a</sup>	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Casca	31,47 ± 0,78 <sup>a</sup>
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Casca	23,72 ± 0,26 <sup>a</sup>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folha	80,91 ± 2,02
<i>Spondias tuberosa</i>	Casca	32,10 ± 0,10 <sup>a</sup>	<i>Boerhavia diffusa</i>	Raiz	106,14 ± 4,44
<i>Gossypium hirsutum</i>	Folha	64,91 ± 1,40 <sup>a</sup>	<i>Averrhoa carambola</i>	Folha	158,54 ± 1,44
<i>Maytenus rigida</i>	Casca	77,12 ± 1,82	<i>Tillandsia usneoides</i>	Folha	232,60 ± 1,64 <sup>b</sup>
<i>Croton conduplicatus</i>	Folha	424,09 ± 10,19 <sup>b</sup>	Mulungu	Casca	386,96 ± 22,78 <sup>b</sup>
<i>Aloe vera</i>	Folha	7950,0 ± 678,29 <sup>b</sup>	<i>Aloe vera</i>	Folha	1776,12 ± 42,44 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> espécie com boa atividade antioxidante; <sup>b</sup> espécie com baixa atividade antioxidante. Classificação segundo Melo et al. (2010).

#### 4. ARTIGO - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS EM DOIS BIOMAS DO NORDESTE DO BRASIL

## ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

**Revista:** Farmacognosia

### COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS EM DOIS TIPOS VEGETACIONAIS DO NORDESTE DO BRASIL

*Thiago A. S. Araújo<sup>12\*</sup>, Danielle C. A. Lima<sup>2</sup>, Elba L. Cavalcanti de Amorim<sup>2</sup> e Ulysses P. Albuquerque<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Laboratório de Etnobotânica Aplicada – LEA. Departamento de Biologia, Área Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP: 52171-030, Brasil.*

<sup>2</sup> *Laboratório de Produtos Naturais – LAPRONAT. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Universidade Federal de Pernambuco; Rua Prof. Artur de Sá S/N; Cidade Universitária; Recife-PE; CEP: 50740-521. Brasil.*

**Resumo:** Diferentes efeitos ambientais têm sido apontados como precursores das diferenças da atividade antioxidante encontradas em plantas medicinais. O objetivo do trabalho é avaliar se há diferenças na atividade antioxidante em relação á capacidade de sequestrar radicais livres e de quelar o íon ferroso em nove espécies medicinais coletadas em duas diferentes comunidades no Brasil, uma localizada na Mata Atlântica e outra na Caatinga e se estas plantas agem através de mecanismos distintos. Para isso foram utilizados, respetivamente, os métodos de DPPH e FIC na quantificação da atividade antioxidante. Não foram observadas diferenças entres os dois conjuntos de plantas analisados pelos dois métodos utilizados. Não houve correlação entre os dois métodos de atividade antioxidante, mostrando que estas duas ações parecem agir de modos independentes nas espécies. Os extratos foliares de *Psidium guajava* apresentaram bons resultados tanto no sequestro de radicais livres quanto como quelante do ion de ferroso nos dois ambientes. Com isso, os efeitos ambientais que atuam nas duas áreas de coleta não afetaram significativamente nas espécies analisadas, de modo conjunto, e os mecanismos de ação antioxidante agem de modo independente nestas espécies, sendo *P. guajava* a espécie que apresentou chances mais promissoras para prospecção de medicamentos com efeito antioxidante.

**Palavras chaves:** Caatinga; DPPH; FIC; Mata Atlântica; Radicais livres; *Psidium guajava*

## Introdução

Tanto no metabolismo dos animais como no das plantas, o oxigênio está envolvido em dois processos distintos: por um lado no crescimento e desenvolvimento do organismo e por outro na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem desregular processos celulares normais e provocar morte da célula (Bianchi e Antunes, 1999; Govindarajan et al., 2005; Ślesak et al., 2007) em especial quando ocorre o estresse oxidativo, isto é, quando há um aumento das substâncias pró-oxidantes ao ponto dos antioxidantes endógenos e/ou exógenos não inibirem a oxidação dos substratos (Betteridge, 2000; Govindarajan et al., 2005). Este aumento pode ser causado em situações patológicas (Betteridge, 2000).

A regulação das EROS se dá por meio de compostos antioxidantes que podem ser enzimáticos – catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase – ou não-enzimáticos – retinol, tocoferóis, ácido ascórbico e metabólitos secundários (Desmarchelier et al., 1999; Moreira e Mancini-Filho, 2004; ). Os não-enzimáticos são produzidos especialmente pelos vegetais, servindo de fonte de produto antioxidante para os seres humanos que os consomem por meio da alimentação ou como recurso terapêutico (Chiang et al., 2004). Estudos sobre o uso terapêutico de plantas medicinais com ação antioxidante as relacionam com o tratamento de doenças como arteriosclerose, câncer, diabetes e inflamações (Cheeseman e Slater, 1996; Choi et al., 2002) entre outras.

Alguns compostos secundários podem agir como antioxidantes tanto no sequestro de radicais livres como quelando íons ferroso (Ramalho e Jorge 2006; Chan et al., 2007; Lim et al., 2007). Isto faz com que haja por vezes a necessidade da quantificação desta atividade por diferentes métodos, uma vez que cada um destes tem princípios diferentes

e avaliam distintos aspectos da atividade antioxidante (Wang et al., 2009; Lima et al., 2010; Rufino et al 2010).

Os metabólitos secundários podem ser alterados de acordo com fatores edafoclimáticos como temperatura, tipo de solo, umidade, disponibilidade hídrica e de nutrientes, os quais podem influenciar o cultivo e o conteúdo de princípios ativos nas plantas (Silva et al., 2007) podendo alterar o potencial antioxidante da espécie.

Alguns estudos vêm sendo realizados a respeito de como fatores e condições ambientais podem influenciar tanto na variação quali-quantitativa dos metabólitos secundários, em especial os fenólicos, assim como no poder antioxidante das plantas (Peltonen et al., 2005; Araújo et al., 2012). Contudo, muitos destes trabalhos usam como modelos para estas avaliações uma ou poucas espécies as quais são avaliadas sob diferentes condições, sejam de modo controlado (Malenčić et al., 2007; Ruhland et al., 2007 ) ou em condições de campo (Chludil et al., 2008; Anli e Vural 2009; Araújo et al., 2012), sendo poucos os trabalhos que comparam como um mesmo conjunto de espécies se comportam em ambientes diferentes de modo natural (Lalli et al., 2008).

Gottlieb et al. (1996), por exemplo, afirmam que aspectos ecogeográficos são responsáveis pela diversificação na qualidade de metabólitos secundários, os quais são responsáveis pela plasticidade dos vegetais a mudanças físicas de ambientes. Estes mesmos autores sugerem que a interação do meio ambiente com os compostos vegetais podem ser avaliadas por meio do estudo comparativo das propriedades e ocorrência da atividade química em plantas ecogeograficamente relacionadas.

Com isso, o objetivo do trabalho é avaliar a atividade antioxidantes em relação a capacidade de sequestrar radicais livres e de quelar o íon ferroso, em espécies

medicinais selecionadas por meio de levantamentos Etnobotânicos e coletadas em duas diferentes comunidades no Brasil, uma localizada na Mata Atlântica e outra na Caatinga.

Para isto pretendemos responder as seguintes perguntas: Existe diferença na atividade antioxidante de espécies coletas na Caatinga e Mata Atlântica? Existe diferença no mecanismo de ação antioxidante destas plantas?

## **Materiais e Métodos**

### *Áreas de estudo*

As coletas das espécies foram realizadas em duas áreas do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, uma localizada em uma região de Caatinga hipoxerólifa e outra localizada em uma região de Mata Atlântica Ombrofila Densa. Estas duas áreas têm características bem distintas.

A Caatinga é principal vegetação do Nordeste do Brasil, com uma extensão aproximada de 844.453 quilômetros quadrados, cerca de 11% do país e mais de 50% da região Nordeste (Figura 1). É um bioma exclusivamente brasileiro e tem como características o clima semiárido, a seca, a luminosidade e o calor característicos de áreas tropicais com entrada de energia extremamente alta e elevadas taxas de temperaturas, evaporação e evapotranspiração (Araújo et al., 2007; Brasil, 2011). A vegetação é xerófila, classificada como savana estépica ou floresta seca, apresentando plantas com espinhos, decíduais (quando as folhas caem em determinada época) e suculentas. Existem neste Bioma dois períodos secos anuais: um de longo período de estiagem, seguido de chuvas intermitentes e um de seca curta seguido de chuvas torrenciais (que podem faltar

durante anos) (Araújo et al., 2007; Brasil, 2011). Existem diversos estudos que mostram a importância das plantas medicinais para os povos que vivem nesta área (Almeida et al., 2006; Araújo et al., 2008; Alencar et al., 2010 Almeida et al., 2010; Cartaxo et al., 2010; Albuquerque et al. 2011; Silva et al., 2011), o que faz com que exista uma grande preocupação por parte destas pessoas em manter recursos vegetais medicinais em especial em períodos mais secos, principalmente ervas exóticas que cultivam nos quintais.

A Mata Atlântica é um dos cinco principais hotspots com cerca de 8.000 plantas e 567 animais endêmicos (Myers et al., 2000). Este bioma vem sendo alvo da ação antrópica desde a colonização do Brasil, com destaque para o plantio da cana de açúcar para a produção de álcool e açúcar que há décadas desempenha grande importância na economia local (Kimmel et al., 2008). Com uma extensão aproximada de 1.110.182 quilômetros quadrados ela ocupa toda a faixa continental brasileira onde vivem 62% da população brasileira, cerca de 110 milhões de pessoas (Brasil, 2011; SOS Mata Atlântica 2011) (Figura 1). Os índices pluviométricos são bem mais altos que na área de Caatinga com mais de 1600 mm<sup>3</sup> anuais (dados da usina São José). Assim como na Caatinga diversos estudos tem relatado a diversidade e importância das plantas medicinais em comunidades tradicionais que moram neste bioma (Begossi et al., 2002; DI Stasi et al., 2002; Gazzaneo et al., 2005; Almeida et al., 2012).

#### *Seleção e coleta das espécies*

A escolha das espécies foi realizada por meio de um banco de dados provindo de dois levantamentos etnobotânicos obtidos por Araújo et al. (dados ainda não divulgados) os

quais realizaram entrevistas semi-estruturadas em duas comunidades. A comunidade do sítio Carão (Caatinga), no município de Altinho e Comunidade de Canaã (Mata Atlântica), município de Araçoiaba, ambas no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Destes bancos foram selecionadas nove espécies vegetais. As espécies coletadas para as análises foram: *Anacardium occidentale* L. (caju), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim santo), *Psidium guajava* L. (goiaba), *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (colônia), *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (hortelã grande), *Ruta graveolens* L. (arruda), *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (erva cidreira), *Boerhavia diffusa* L. (pega pinto) (Tabela 1).

Estas espécies foram escolhidas pela disponibilidade e facilidade de coleta nas duas comunidades e pelo consenso entre as partes da planta usada para preparar os remédios locais, pois estas partes são as que obtiveram o maior número de citação entre os entrevistados.

A coleta das amostras das partes mais utilizadas como medicinal foi realizada em julho/2009 e para que houvesse menor influência climática sobre os indivíduos, as amostras foram coletadas com apenas dois dias de diferença, por isso a necessidade do critério da disponibilidade e facilidade de coleta. Foram coletadas e misturadas partes das plantas de pelo menos três indivíduos de cada espécie compondo uma amostra única para que diminuísse o efeito idiossincrático. As amostras das plantas foram coletadas com o apoio de moradores das localidades.

### *Preparação dos extratos*

As partes coletadas foram secas a sombra, em ambiente arejado com temperatura em torno de 26° C. Em seguida trituradas em moinho de facas e as partículas homogeneizadas por tamisação.

Para a preparação do extrato foi realizado uma maceração de seis dias, a uma proporção de 1:20 p/v utilizando metanol 80%. Após a maceração o material foi filtrado e evaporado por pressão reduzida para se obter o extrato seco (Araújo et al., 2012). Estes extratos foram utilizados para avaliação antioxidante por dois distintos métodos, análise de sequestro de radicais livres e atividade quelante do íon ferroso.

### *Análise da atividade antioxidante- sequestro de radicais livres (DPPH)*

A quantificação da atividade antioxidante foi feita utilizando o ensaio de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) segundo protocolo adaptado de Sousa et al. (2007). Alíquotas dos extratos secos foram diluídas em seis concentrações que variaram entre 250 e 10 µg/mL, dependendo do poder antioxidante do extrato de modo que fosse obtida uma curva para o cálculo da CE<sub>50</sub> segundo Sousa et al. (2007) (concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH). De cada concentração foi retirado 0,5 mL e acrescentado 3 mL de solução metanólica do radical livre DPPH a 100 µM. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância a 517 nm (Sousa et al., 2007). Todas as leituras foram feitas em duplicata. Foi utilizado ácido ascórbico como controle positivo utilizando concentrações que variaram de: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL.

Para determinação da concentração eficiente foi primeiramente calculado os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH<sub>REM</sub>), conforme a equação:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T=t}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}} \times 100$$

Onde: [DPPH]<sub>T=t</sub> corresponde à concentração de DPPH no meio após a reação com o extrato ou controle e [DPPH]<sub>T=0</sub> é a concentração inicial de DPPH (40 µg/mL).

Em seguida, com os valores do DPPH<sub>REM</sub> construiu-se um gráfico para o cálculo da CE<sub>50</sub>, onde na abscissa estavam as concentrações dos padrões positivos ou das amostras e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente. A CE<sub>50</sub> foi determinada a partir de uma curva exponencial obtida com o gráfico.

#### *Análise da Atividade antioxidante - atividade quelante do íon ferroso (FIC)*

A metodologia utilizada foi adaptada de Chew et al. (2009) e Santos et al. (2007). Com o extrato seco foi preparada, uma solução de 5mg/mL em metanol 75% em duplicata. Desta solução foram realizadas diluições, em triplicata, com as seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL.

Em seguida retirou-se 1 mL de cada diluição do extrato e adicionou 1mL de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) a 0,1 mM. Após 10 min foi adicionado 1 mL de ferrozina a 0,25 mM. A mistura reacional permaneceu em repouso por 10 min antes da absorbância ser mensurada a 562 nm. Para cada ponto foi realizado o branco com 1 mL de cada concentração e 2 mL de metanol 75% (v/v).

Para este teste foi utilizado o EDTA como padrão positivo, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e o controle

foi preparado com 1 mL de cada reagente (metanol 75% (v/v), sulfato ferroso e ferrozina) seguindo a mesma ordem de adição e intervalo de tempo.

Para cada concentração foi calculada a porcentagem da amostra capaz de quelar o íon ferroso, conforme a equação:

$$\% \text{ Atividade Quelante} = \frac{A_{\text{controle}} - (A - Ab)}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde:  $A_{\text{controle}}$  corresponde à média das absorvâncias do controle,  $A$  é a absorvância da amostra em análise e  $Ab$  a absorvância apenas da solução na referida concentração (branco).

Com isso elaborou-se um gráfico com a concentração no eixo das abscissas e a porcentagem da atividade quelante nas coordenadas obtendo uma curva de característica logarítmica. A partir da equação gerada, determinou-se a  $CE_{50}$ .

#### *Análise dos dados*

Para os valores de  $CE_{50}$  de ambos os métodos para o conjunto de amostras de cada local foi analisado a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste de Wilcoxon para calcular se há diferença entre os valores de  $CE_{50}$  tanto pelo método de DPPH quanto pelo FIC das amostras obtidas nos dois locais de coleta. O teste de Spearman foi utilizado para testar se há correlação entre os valores de  $CE_{50}$  dos dois métodos para cada local de coleta. Foi utilizado significância de 0,05. Para todos os testes estatísticos foram utilizados o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

## Resultados

As amostras coletadas na área de Mata Atlântica apresentaram, em média, melhor atividade sequestrado de radicais livres quando comparado as amostras coletadas na área de Caatinga ( $147,67 \pm 42,99$  e  $325,81 \pm 140,31$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), porém esta diferença não é estatisticamente significativa ( $t = 12$ ;  $p > 0,05$ ). Os extratos metanólicos das cascas de *A. occidentale* e os das folhas de *P. guajava* coletado nas duas regiões apresentaram os menores valores para a  $\text{CE}_{50}$ , mostrando serem as mais eficientes no sequestro de radicais livres, enquanto os extratos de *C. ambrosioides* apresentaram os piores resultados. Apenas 1/3 das espécies (*P. guajava*, *A. zerumbet* e *P. amboinicus*) apresentaram resultados melhores na área de Caatinga do que na área de Mata Atlântica (Tabela 1).

A atividade quelante também não revelou diferença significativa entre as amostras coletadas nos dois ambientes ( $t = 11$ ;  $p > 0,05$ ). Contudo, ao contrário da atividade sequestradora de radicais livres, as plantas coletadas na área de Caatinga obtiveram uma concentração eficiente média menor do que as plantas coletadas na comunidade de Mata Atlântica ( $0,592 \pm 0,22$  e  $0,898 \pm 0,26$   $\text{mg/mL}$ , respectivamente), mostrando mais eficiência como quelante do íon ferroso. Os extratos de *A. zerumbet* ( $0,13 \pm 0,02$ ) e *P. guajava* ( $0,19 \pm 0,02$ ) coletadas na comunidade da Caatinga obtiveram, em média, resultados melhores do que o controle positivo ( $0,26 \pm 0,001$  - EDTA). *C. citratus* coletado na Mata Atlântica e *A. occidentale* coletado nas duas áreas apresentaram os maiores valores de  $\text{CE}_{50}$ , sendo assim consideradas, entre as amostras analisadas, as que apresentaram pior atividade quelante.

Não foi observado correlação entre os valores de  $\text{CE}_{50}$  do método de DPPH com os valores da  $\text{CE}_{50}$  da atividade quelante tanto para os dados da área de Caatinga ( $r_s = -$

0,4108;  $p > 0,05$ ) como para os de Mata Atlântica ( $r_s = -0,4582$ ;  $p > 0,05$ ), mostrando que estas duas ações parecem agir de modos independentes nas espécies. Apesar dos dados não se mostrarem estatisticamente correlacionados, os dados mostram uma relação inversa para as amostras analisadas pelo fato de amostras como as *A. occidentale*, *A. zerumbet* e *B. difusa* quando apresentam alta atividade por um método foram as mais baixas em outro.

### **Discussão**

Era esperado que fossem encontradas diferenças entre a atividade antioxidante das amostras coletadas nestes dois ambientes, uma vez que os locais têm características distintas, sendo um próximo a uma área de floresta úmida e a outra próxima a uma floresta seca, de climas diferentes e onde o aporte de luz, temperatura, oxigênio e água são maiores para o primeiro tipo de vegetação (Gottlieb et al., 1996).

Esta nossa expectativa era devido a diversos estudos indicarem que diferentes condições ambientais alteram a atividade antioxidante das plantas (Polle e Rennenberg 1992; Wieser et al., 2003; Mccune e Johns 2007; Chludil et al., 2008; Hofer et al., 2008). Nestes estudos as abordagens de como fatores ambientais inferem nesta atividade focam aspectos específicos como luz, altitude, tipo de solo, entre outros, levando em consideração uma espécie ou um conjunto delas submetidas a condições climáticas controladas (casa de vegetação) ou coletadas em áreas com tipos vegetacionais semelhantes. Isto torna difícil a comparação de nossos resultados com outros estudos, pois levamos em consideração o conjunto e não cada espécie de modo isolado, não

controlando nenhum fator ambiental, coletando as espécies onde as pessoas das comunidades costumam colher para o preparo dos seus remédios.

Pelo nosso conhecimento, apenas o trabalho de Araújo et al. (dados ainda não publicados) aborda como espécies coletadas nestes dois tipos de ambientes, próximo a floresta úmida e a floresta seca, se comportam em relação a atividade antioxidante. Neste trabalho também não foi observado diferenças entre a atividade sequestradora de radicais livres do conjunto de espécies analisadas.

Contudo isso não quer dizer que fatores ambientais não interfiram na atividade antioxidante de cada planta que são comuns nestas duas regiões, pois como pode ser visto em nossos resultados existem valores discrepantes em algumas espécies como *Cymbopogon citratus*, o qual obteve valores bem distintos entre os dois locais de coleta para os dois testes da análise antioxidante. Esta espécie obteve bons resultados como sequestrado de radicais livres na área de Mata Atlântica e de quelante do íon de ferroso na área de Caatinga, sugerindo que para esta planta, os fatores ambientais destas duas regiões agem de modo distinto nestas duas atividades antioxidante.

Vale ressaltar que o fato de ser visto vários valores diferentes entre algumas plantas para o mesmo teste antioxidantes e mesmo assim não haver diferença estatística sugere que do elenco de plantas analisados pode ter existido uma “compensação” de valores, ou seja, uma área que apresentou uma espécie com atividade antioxidante muito melhor que a outra área, também obteve uma espécie com atividade muito baixa, havendo uma “compensação” valores da atividade antioxidante entre as espécies de cada área, o qual pode ter afetado o teste estatístico. Isto pode ser notado quando levamos em consideração apenas os valores das seis espécies com melhor atividade para a área de Caatinga para o teste de atividade quelante do íon ferroso. O teste estatístico

demonstrou diferença significativa entre as espécies desta área para esta atividade, mostrando que com a entrada das demais espécies esta diferença significativa não aparece.

A não correlação entre os métodos antioxidantes utilizados corroboram com os achados da literatura, uma vez que diversos trabalhos mostram a importância de se quantificar a atividade antioxidante por mais de um método (Wang et al., 2009; Lima et al., 2010; Rufino et al., 2010). Isto demonstra que os conjuntos de espécies medicinais analisadas agem de modos diferentes nas terapias ou doenças as quais as pessoas utilizam, sendo umas com maior poder em sequestrar radicais e outras em quelar metais.

Os agentes quelantes podem ser considerados como antioxidantes secundários, pois não agem diretamente inibindo os radicais livres (Gülçin et al., 2005). Eles têm como função quelar íons ferroso, os quais estão envolvidos nas reações de Haber-Weiss, onde na presença de  $H_2O_2$  podem produzir radicais hidroxilas. Apesar de este radical livre ter vida média curta, eles são muito reativos, podendo causar danos ao organismo como aumentar a permeabilidade da membrana, inativar enzimas e proteínas de transportes e causar o rompimento do DNA (Olszewer, 1995). Com isso, as amostras quando agem como quelantes ajudam na não produção de radicais livres, fato que está relacionado aos compostos secundários presentes na planta.

Entre os compostos secundários que podem agir como quelantes, os que apresentam nitrogênio em sua estrutura estão mais relacionados com esta ação do que os compostos fenólicos que apesar também estarem relacionados como quelantes de metais parecem está mais associado no sequestro de radicais livres (Ramalho & Jorge 2006; Chan et al., 2007; Lima et al., 2007; Kumari & Kakka, 2008; Ruan et al., 2008; Rufino et al., 2010; Zang et al., 2010).

Por isso os compostos fenólicos são antioxidantes primários por serem responsáveis no sequestro de radicais livres, bloqueando as reações em cadeia, isto devido às suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, e supressores de oxigênio singlete (Kähkönen et al., 1999; Dias et al., 2004), agindo assim de modo direto com os radicais livres. Estes radicais livres podem causar danos oxidativos em lipídios e proteínas podendo levar a mutagênese, sendo seu aumento uma característica de pessoas com apresentam câncer ou diabetes, por exemplo (Govindarajan et al., 2005).

De todas as amostras analisadas, o extrato das folhas de *P. guajava* apresentaram destaque pelo fato de terem bons efeitos antioxidantes para os dois métodos nos dois ambientes. Isto mostra que o extrato desta espécie pode ter uma boa ação como agentes primários e secundários no sistema antioxidante. As folhas desta espécie apresentam diversos tipos de compostos secundários como: taninos, flavonoides, saponinas, esteroides, terpenóides, citoquininas (Gutiérrez et al., 2008; Adeyemi et al., 2009; ), sendo os fenólicos os que apresentam maior quantidade, como visto no extrato hidroalcoólico que apresentou alto conteúdo fenólico  $575,3 \pm 15,5$  mg GAE/g de matéria de peso seco (He & Venant, 2004), tendo estes compostos ação tanto na redução do íons ferroso quanto no sequestro de radicais livres (Tachakittirungrod et al., 2007). Entre eles, os flavonoides tem destaque, principalmente pela quantidade de quercetina (Kamath et al., 2008). Esta característica, de ser rica em flavonoides, faz do extrato das folhas de *P. guajava* um potente antioxidante, uma vez que, dependendo da estrutura, os flavonóides podem reagir como agente doador de hidrogênio e elétrons, como também ter a capacidade de quelar metais de transição (Barreiros et al., 2006) e estão envolvidos em doenças relacionadas ao estresse oxidativo como diabetes, câncer e inflamações (Gutiérrez et al., 2008; Wu et al., 2008).

Com isso, não foram observadas diferenças entre o conjunto de plantas analisados para ambos os métodos, sugerindo que os fatores ambientais que caracterizam os locais de coleta não interferem significativamente neste conjunto de plantas. Os mecanismos de ação antioxidante destas plantas agem de modo não diretamente correlacionado, mostrando serem reciprocamente independentes.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à comunidade de Carão e de Canaã para aceitarem e nos ajudarem a realizar este estudo. Ao Dr. Ernani Machado de Freitas Lins Neto, o Dr. Joabe Gomes de Melo, a bióloga Flávia dos Santos Silva, ao Msc. Alyson Luiz Santos de Almeida, a bióloga Luciana Gomes de Sousa, a Dra. Viviany Teixeira do Nascimento, a Msc. Lucilene Lima dos Santos e ao Dr. Nelson Leal Alencar do Laboratório de Etnobotânica Aplicada (LEA) para a sua assistência na coleta de dados etnobotânicos na área de Caatinga, a bióloga Victoria Duarte Lacerda e ao biólogo Miguel Santana de Almeida Neto pelo apoio de campo durante a sua estadia no LEA; A prefeitura de Altinho em especial a Secretária de Agricultura e a Prefeitura de Araçoiaba em especial a Secretária de Saúde e aos agentes comunitários de saúde do Carão, Srs. Inaldo e Alexandre e de Canaã, Sras. Mariinha, “Tita” e Maria pelo apoio logístico. Ao Msc. Valerium Thijan de Castro, pelo auxílio na análise antioxidante pelo método de DPPH. Ao CNPq pelo apoio financeiro ("Edital Universal") e concessão de produtividade atribuído à U.P. Albuquerque, e a Facepe pela Bolsa de Doutorado concedida a T.A.S. Araújo.

## Referências

- Adeyemi OS, Akanji MA, Oguntoye SA 2009. Ethanolic leaf extract of *Psidium guajava*: Phytochemical and trypanocidal activity in rats infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(5): 420-423.
- Albuquerque UP, Soldati GT, Sieber SS, Ramos MA, SA JC, Souza FLC 2011. The use of plants in the medical system of the Fulni-ô people (NE Brazil): a perspective on age and gender. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 866-873.
- Alencar NL, Araújo TAS, Amorim ELC, Albuquerque UP 2010. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias evidence in support of the diversification hypothesis. *Economic Botany* 64:68-79.
- Almeida CFCBR, Amorim ELC, Albuquerque UP, Maia MBS 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingó region - a semi-arid location in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2(15): 1-9.
- Almeida CFCBR, Ramos MA, Amorim ELC, Albuquerque UP 2010. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 674-684.
- Almeida CFCBR, Ramos MA, Silva R, Melo JG, Medeiros MFT, Araújo TAS, Almeida ALS, Amorim ELC, Alves RRN, Albuquerque UP 2012. Intracultural Variation in the Knowledge of Medicinal Plants in an Urban-Rural Community in the Atlantic Forest from Northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1-15.
- Anli RE, Vural N 2009. Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules* 14, 289-297
- Araújo EL, Castro CC, Albuquerque UP 2007. Dynamics of Brazilian Caatinga a Review Concerning the Plants, Environment and People. *Functional Ecosystems and Communities* 1:15-29.
- Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 120(1): 72-80.
- Araújo TAS, Almeida VTC, Amorim ELC, Albuquerque UP 2012. Habitat Influence on Antioxidant Activity and Tannin Concentrations of *Spondias tuberosa* Arruda. *Pharmaceutical Biology* 50(6): 754-759.
- Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos AAS, 2007. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Brasília, Brazil: Sociedade Civil Mamiará, CNPq.

Barreiros ALBS, David JM, David JP 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29(1): 113-123.

Begossi A, Hanazaki N, Tamashiro JY 2002. Medicinal plants in the Atlantic Forest (Brasil): knowledge, use and conservation. *Human Ecology* 30: 281–299.

Betteridge DJ 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2): 3-8.

Bianchi MLP, Antunes LMG 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta *Revista Nutrição*, 12(2):123-130.

Brasil 2011. Geografia. Biomas e vegetação: Biomas brasileiros. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/sobre/geografia/biomas-e-vegetacao/biomas-brasileiros>. Acesso em 30/11/2011.

Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 131: 326-342.

Chan EWC, Lim YY, Omar M 2007. Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etilingera species* (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chem* 104: 1586-1593

Chew YL, Goh JK, Lim YY 2009. Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem* 116: 13-18.

Cheeseman KH, Slater, T. F., Radicais livres em medicina. Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, 260p, 1996.

Chiang YM, Chuang DY, Wang SY, Kuo YH, Tsai PW, Shyur LF 2004. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 95:409–419.

Chludil HD, Corbino GB, Leicach SR 2008. Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. *J. Agric. Food Chem* 56 5050–5056.

Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, LEE MY, PARK SH, KIM SK 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163: 1161-1168.

Desmarchelier C, Lisboa Romão R, Coussio J, Ciccio G 1999. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 69–77.

Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73: 69-91.

- Gazzaneo L, Lucena RP, Albuquerque UP 2005. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 1, 1–8.
- Gottlieb OR, Kaplan MAC, Borin MRMB 1996. Biodiversidade: um enfoque quimico-biologico. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 297p.
- Govindarajan R, Vijayakumar M, Pushpangadan P 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of ‘Rasayana’ herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology* 99:165–178.
- Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 1–27.
- Gülcin I, Berashvili D, Gepdiremen A 2005. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 287-293.
- Hofer N, Alexou M, Heerd C, Löw M, Werner H, Matyssek R, Rennenberg H, Haberer K 2008. Seasonal differences and within-canopy variations of antioxidants in mature spruce (*Picea abies*) trees under elevated ozone in a free-air exposure system. *Environmental Pollut* 154: 241–253.
- Lalli JYY, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Viljoen AM 2008. In vitro biological activities of South African Pelargonium (Geraniaceae) species. *South African Journal of Botany* 74:153–157
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 47(10): 3954-3962.
- Kamath JV, Rahul N, Ashok Kumar CK, Lakshmi SM 2008. *Psidium guajava* L: A review. *Int J Green Pharm* 2:9-12
- Kimmel TM, Piechowski D, Gottsberger G 2008. The history of fragmentation of the lowland Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil. *Biorem. Biodiv. Bioavail.* 2: 1–4.
- Kumari A, Kakkar P 2008. Biomedical and Screening of Antioxidant Potential of Selected Barks of Indian Medicinal Plants by Multiple in vitro Assays. *Environmental Sciences* 21: 24-29.
- Lim YY, Lim TT, Tee JJ 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem* 103: 1003-1008.
- Lima AR, Pereira RGFA, Abrahão SA 2010. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Quim Nova* 33 (1): 20-24.

- Malenčić D, Popović M, Miladinović J 2007. Phenolic Content and Antioxidant Properties of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Seeds Molecules* 12: 576-581.
- McCUNE LM, Johns T 2007. Antioxidant activity relates to plants part, life form and condition in some diabetes remedies. *Journal Ethnopharmacology* 112: 461-469.
- Moreira AVB, Mancini-Filho J 2004. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. *Rev. Nutr.* 17(4):411-424.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Olszewer E 1995. Radicais livres em medicina. 2ed. São Paulo 204p.
- Peltonen P, Vapaavuori E, Julkunen-Tiitto R 2005. Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. *Global Change Biology* 11, 1305-1324
- Polle A, Rennenberg H 1992. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes: II. Defence systems against oxidative stress in needles. *New Phytol.* 121, 635-642.
- He Q, Venant N 2004. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University - Science* 5( 6).
- Ramalho VC, Jorge N 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova* 29(4): 755-760.
- Ruan ZP, Zhang LL, Lin YM 2008. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves. *Molecules*, 13, 2545-2556.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 121, 996-1002.
- Ruhland CT, MJ Fogal, Buyarski CR, Krna MA 2007. Solar Ultraviolet-B Radiation Increases Phenolic Content and Ferric Reducing Antioxidant Power in *Avena sativa*. *Molecules* 12:1220-1232.
- Silva FS, Ramos MA, Hanazaki N, Albuquerque UP 2011. Dynamics of traditional knowledge of medicinal plants in a rural community in the Brazilian semi-arid region. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21: 382-391.
- Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica polonica* 54 (1): 39-50.
- Sousa CMM, Rocha e Silva H, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH 2007. Fenóis

totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* 30(2) 351-355.

Santos MH, Batista BL, Duarte SMS, Abreu CMP, Gouvêa CMP 2007b. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Quim Nova* 30 (3): 604-610.

Silva FG, Oliveira CBA, Pinto JEB, Nascimento PVE, Santos SC, Seraphind JC, Ferri PH 2007. Seasonal Variability in the Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera*. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 18 (5): 990-997.

Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry* 103: 381–388.

Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem* 116: 240-248.

Wieser G, Hecke K, Tausz M, Haberle K-H, Grams TEE, Matyssek R 2003. The influence of microclimate and tree age on the defense capacity of European beech (*Fagus sylvatica* L.) against oxidative stress. *Annals of Forest Science* 60 131- 135.

Wu J-W, Hsieh C-L, Wang H-Y, Chen H-Y 2009. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chemistry* 113(1): 78-84.

Zhang L, Chen J, Wang Y, Wu D, Xu M. Phenolic Extracts from *Acacia mangium* Bark and Their Antioxidant Activities 2010. *Molecules* 15: 3567-3577

#### \*Correspondência

Thiago Antônio de Sousa Araújo  
Laboratório de Etnobotânica Aplicada – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Laboratório de Etnobotânica Aplicada – LEA. Departamento de Biologia, Área Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171–030, Brasil.  
thiagocaruaru@hotmail.com  
Tel. +55 (81) 3320-6350  
Fax: +55 (81) 3320-6350

.....

Tabela 1 – Avaliação da atividade antioxidante de plantas medicinais comuns em duas regiões do Nordeste do Brasil. Valores médios seguidos por erro padrão.

Espécie / Família	Parte	CE <sub>50</sub> DPPH (CE <sub>50</sub> em µg/mL)		FIC (CE <sub>50</sub> em mg/mL)	
		Caatinga	Mata Atlântica	Caatinga	Mata Atlântica
<i>Anacardium occidentale</i> / Anacardiaceae	Casca	23,5 ± 1,60	16,67 ± 1,27	2,33 ± 0,33	1,54 ± 0,15
<i>Cymbopogon citratus</i> / Poaceae	Folha	267,79 ± 8,18	56,23 ± 17,98	0,35 ± 0,01	2,64 ± 0,20
<i>Psidium guajava</i> / Myrtaceae	Folha	20,18 ± 1,12	29,58 ± 1,55	0,19 ± 0,01	0,37 ± 0,01
<i>Alpinia zerumbet</i> / Zingiberaceae	Folha	99,33 ± 1,23	313,85 ± 8,29	0,13 ± 0,01	0,47 ± 0,02
<i>Plectranthus amboinicus</i> / Lamiaceae	Folha	241,30 ± 7,38	290,65 ± 3,58	0,29 ± 0,07	0,60 ± 0,001
<i>Ruta graveolens</i> / Rutaceae	Folha	410,70 ± 26,94	69,08 ± 3,12	0,46 ± 0,02	0,41 ± 0,02
<i>Chenopodium ambrosioides</i> / Amaranthaceae	Folha	1387,52 ± 33,95	333,39 ± 13,16	0,41 ± 0,01	0,50 ± 0,02
<i>Lippia alba</i> / Verbenaceae	Folha	135,96 ± 5,24	122,82 ± 0,43	0,87 ± 0,02	1,27 ± 0,02
<i>Boerhavia diffusa</i> / Nyctaginaceae	Raiz	354,98 ± 23,66	106,14 ± 4,44	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,01
Controle positivo	Ácido Ascórbico		15,86 ± 1,66	EDTA	0,26 ± 0,001

5. ARTIGO - RAINFALL EFFECT  
ON THE ANTIOXIDANT  
CAPACITY AND PRODUCTION  
OF PHENOLIC COMPOUNDS  
FROM *ANADENANTHERA*  
*COLUBRINA* (VELL.) BRENNAN IN  
A SEASONAL DRY FOREST (NE  
BRAZIL)

**ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**

**Revista:** Environmental and Experimental Botany

**Rainfall effect on the antioxidant capacity and production of phenolic compounds from *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in a seasonal dry forest (NE Brazil)**

Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>ab</sup>, Valerium Thijian Nobre de Almeida e Castro<sup>b</sup>, Lilian Grace da Silva Solon<sup>c</sup>, Gabriel Araújo da Silva<sup>c</sup>, Maria das Graças Almeida<sup>c</sup>, Elba Lucia Cavalcanti de Amorim<sup>b</sup>, Ulysses Paulino de Albuquerque<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Etnobotânica Aplicada – LEA. Departamento de Biologia, Área Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-030, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Produtos Naturais – LAPRONAT. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Rua Prof. Artur de Sá S/N; Cidade Universitária; Recife, PE; CEP: 50740-521. Brasil.

<sup>c</sup>Laboratório Multidisciplinar– LABMULT. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av: General Cordeiro de Faria s/n. Petrópolis, Natal, RN, CEP 59012-570. Brasil.

Corresponding author:

Thiago Antônio de Sousa Araújo: thiagocaruaru@hotmail.com

Fone: +55 (81) 3320-6350

## Abstract

The variation in water availability can cause oxidative stress in plant species, which respond by producing antioxidants. This is due in part to changes in metabolic pathways that produce compounds capable of reducing or terminating such stress. Among the main compounds responsible for antioxidant activities are included the phenolic compounds. Thus, the aim of this study was to evaluate whether rainfall in a dry forest in Brazil affects the antioxidant activity and the majority phenolic compounds in the stem bark of *Anadenanthera colubrina*. Monthly samplings were performed during one year for the analysis of free radicals sequestration - by the DPPH method - and for the identification and quantification of major phenolic compounds by HPLC. These data were correlated with each other and monthly rainfall. Three major phenolic compounds were identified and one of these was identified as hyperin. The stem barks showed high capability in scavenging free radicals. The antioxidant activity and the three compounds varied little over the year despite the significant difference among a few months. These differences are apparently not related to rainfall. There was also no correlation between the major compounds and free radicals scavenging. Our results suggest that rainfall was not the environmental factor responsible for monthly differences in antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds from the barks of *A. colubrina*.

Keywords: dry forest, oxidative stress, water stress; DPPH; hyperin; flavonoid.

## 1. Introduction

The antioxidant activity has been the subject of several studies by being related to several pathological processes such as cancer, inflammation, cardiovascular disease and diabetes (Choi et al., 2002), processes that have in common the increase of reactive species oxygen (ROS) that cause oxidative stress. Thus, one of the research targets in search of new antioxidant sources are plants by having developed their own antioxidant mechanisms against stress. This stress may be related to environmental factors such as water availability, light intensity, temperature and salinity, causing the plants to adapt to these situations by producing compounds that act on the antioxidant mechanism (Jaleel et al., 2009).

Phenolic compounds such as tannins and flavonoids are responsible for the plant antioxidant defense when it goes through environmental stress or even by different morphological stages of development causing increased ROS (Pourcel et al., 2007) helping the plant to chemically adapt to these situations. This adaptation occurs by

means of genes that activate the biosynthesis of antioxidant mechanisms, in particular genes of secondary metabolism which aid in plant development (Oh et al., 2009).

Among these metabolites, phenolic compounds are highlighted due to many studies relating them with the highest antioxidant power of plants (Lee et al., 2004, McCune & Johns, 2007, Ramirez et al. 2009, Zhang et al. 2010) especially for their ability to sequester free radicals (Kumari and Kakka, 2008, Zang et al., 2010).

However, there are few papers focusing on the medicinal plants and secondary metabolites acting in the antioxidant mechanism in situations of environmental stress (Yong et al., 2006) and the understanding of this process is important, since the secondary metabolic compounds, in particular those phenolic, play among other roles, the function of making free radicals into more stable molecules, and can break the chain forming new radicals (Darling et al., 2006), very important function in both conditions of oxidative stress in plants and humans.

Thus, our objectives aim at correlating the three factors, namely: available rainfall, antioxidant activity in free radicals scavenging and majority concentration of phenolic compounds of *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan. These factors will test three hypotheses: 1 - The antioxidant activity and/or concentrations of the major phenolic compounds of extracts from the bark of *A. colubrina* vary throughout the year; 2 - If varying, this variation is associated with rainfall; 3 - There is a correlation between the concentration of major phenolic compounds and the antioxidant power of extracts from *A. colubrina*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sampling site

The plant material was collected in the municipality of Altinho (8 ° 29 '32 "S x 36 ° 03' 03" W) Pernambuco, Northeastern Brazil. The specific sampling area was the Carão site (08 ° 35 '16.1 "S x 36 ° 05' 36.1" W), a rural community located 16 kilometers from the city center. This community is located in a Caatinga area characterized by a xerophytic vegetation, showing plants with thorns and deciduous, and a semi-arid climate, with a long dry period followed by intermittent rains and a short drought period followed by torrential rains (Araújo et al., 2007, Brasil, 2011). Among the species

occurring in this region, *A. colubrina* has been highlighted, since studies show its therapeutic potential by the diversity of diseases in which it can be used (healing, injury, cancer and inflammation), as well as its phytochemical characteristic for presenting large amounts of phenolic compounds, especially in the barks which is the most used part in the preparation of medicines by the community (Albuquerque et al., 2007, Miller et al., 2006a, 2006b; Araujo et al., 2008, Albuquerque and Soldati, 2010).

## 2.2 Sampling the Plant material

Monthly collections (January to December 2010) were performed from the barks of 12 individuals of *A. colubrina* for 12 months in order to evaluate the antioxidant activity and the contents of major phenolic compounds. Time samples ranged between 9:30 h and 13:00 h to reduce the effect of circadian variation (Tausz et al., 2003).

## 2.3 Extract Preparation

The collected material was dried under shade at temperature around 26° C, ground in a knife mill and homogenized by sieving particles. With the dried and ground powder was performed the maceration of six days at 1:20 w/v using 80% methanol. After maceration, the material was filtered and evaporated under reduced pressure to obtain the dried extract (Araujo et al., 2012).

## 2.4 Antioxidant Analysis

The quantification of the antioxidant activity was performed using the assay of DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) according to the protocol adapted from Sousa et al. (2007). Aliquots of the dried extracts were diluted at six concentrations ranging between 100 and 10 mg/mL, so that a curve was obtained for the calculation of EC<sub>50</sub>, according to Souza et al. (2007) (sample concentration or standard which causes 50% inhibition of the initial DPPH concentration). From each concentration was removed 0.5ml and added 3 ml methanol solution of DPPH free radical to 100 µM. After 30 minutes was performed the absorbance reading at 517 nm (Sousa et al., 2007). Analyses

were performed in triplicate and from each concentration readings were made in duplicate. Ascorbic acid was used as positive control at concentrations ranging from 5 to 50 mg/ $\mu$ L (Figure 1).

To determine the effective concentration was firstly calculated the percentage of remaining DPPH (% DPPH<sub>REM</sub>), according to the equation:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T=t}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}} \times 100$$

Where: [DPPH]<sub>T=t</sub> is the DPPH concentration in the medium after the reaction with extract or control and [DPPH]<sub>T = 0</sub> is the initial DPPH concentration (40  $\mu$ g/mL).

With the DPPH<sub>REM</sub> values was constructed a graph for the EC<sub>50</sub> calculation, being concentrations of the positive standard or samples the independent variable and the percentage of remaining DPPH the dependent variable. The EC<sub>50</sub> was determined from an exponential curve obtained with the graphic.

## 2.5 Analysis on High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Extracts analyses were performed on a Varian ProStar HPLC system with quaternary pump (Model ProStar 240), PDA detector (ProStar model 335), and autoinjector and Varian Galaxie Chromatography Data System software, version 1.9.302.530

The chromatographic separation was performed by reverse phase column Phenomenex C18 (Phenomenex, 4.6 x 100 mm, 2.6 mM) at room temperature and monitored at 280 nm. The eluent system gradient consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with 1.3 mL/min flow rate (Aznar et al., 2011).

As reference material for characterization of the major compounds was used gallate of (-)- epigallocatechin with 95% purity and Hyperin with 96% purity, both from Sigma-Aldrich. The solvents used in the analysis were HPLC grade and for mobile preparation was used water in Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA).

These analyzes were performed every two months with the same dry extract used for testing the antioxidant activity, totaling six samplings during the year, beginning with February and finishing in December.

For samples preparation, the dried bark extracts collected in these months were dissolved in methanol at 5 mg/ml. After filtration at 0.22  $\mu$ M, Allcrom, 9  $\mu$ L of each sample was injected into the HPLC system. The relative amount of phenolic compounds of the extracts was calculated considering the spectrum similarity, and the results were expressed as equivalents of epigallocatechin gallate (ppm) and extract hyperin (ppm).

The compounds identified with the highest concentrations were regarded as major compounds. Concentrations of these compounds have been analyzed separately and their concentrations were summed in combination.

## 2.6 Data Analysis

To analyze the  $EC_{50}$  values' normality and concentrations of phenolic compounds was used the Shapiro-Wilk test. The Kruskal-Wallis test was used to test for variation in  $EC_{50}$  values and phenolic compounds among the sampling months, since data were not normal (Ayres et al., 2007).

To determine whether a correlation exists between the average monthly  $EC_{50}$  values and the rainfall rates; the  $EC_{50}$  values and the phenolic compounds; and the rainfall values and the average phenolic compounds, it was used the test of correlation coefficient of Spearman (Ayres et al., 2007).

The locality's rainfall was obtained at the headquarters of the experimental station of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) in Altinho, Pernambuco. The rainfall was used to correlate with the values of antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds. This comparison was performed for two periods taking into account the accumulated rainfall in the last 30 and 60 days prior to the bark samplings. These two levels were analyzed to understand if the rainfall availability influences the antioxidant power and concentrations of phenolic compounds from the barks in immediate or delayed way.

### 3. Results

#### 3.1 Annual variation of antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds

The average annual value of the antioxidant activity was  $22.41 \pm 0.75$   $\mu\text{m/ml}$ , varying a little during the years analyzed (Table 1, Figure 4a). The annual average, despite having high values, differed in relation to the standard compound ( $H = 14.05$ ,  $p < 0.05$ ). Table 1 shows that this difference was due to the values obtained in March and May, which had the highest  $EC_{50}$  values and differed significantly compared with the annual average ( $H = 11.21$ ,  $H = 11.61$ ;  $p < 0.05$ ) and all other months. Some months exhibited antioxidant activity statistically similar to the standard, especially August that showed the best activity.

Three major phenolic compounds in terms of concentration (Figure 2a) identified by comparing the spectra of external standards and the retention times (RT) were observed. Compound 2 was identified as hyperin by showing the same RT and UV spectrum. Compounds 1 and 3 were measured in equivalent of epigallocatechin gallate by having the UV spectra more similar to the standard (Figure 3).

The compound 1 concentration showed statistically significant variation among each other only for April and December, which represent the highest and lowest concentration of this compound, respectively. The compound 2 concentration, identified as hyperin, also exhibited significant variation between the initial and final months showing a slight decrease over the year with February showing the highest concentration. Compound 3, unlike the others, did not vary significantly among the analyzed months. When analyzed in combination, the concentration of the three compounds did not vary over the year (Table 1, Figure 4b). Thus, when analyzing each of the concentrations of the major phenolic compounds, discrepancy there may be with respect to annual variation, since two compounds had varied and one remained stable. This stability throughout the year can also be seen when concentrations are analyzed in combination, by adding them; suggesting that there may be a tradeoff among these three

compounds during this period, once the compounds vary when analyzed in isolation but remain stable when analyzed in combination

### 3.2 Correlation of the variation on the antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds with the rainfall

The rainfall data showed that in the year when the study was conducted there was an atypical rainfall distribution than the expected for this region, once months like February, March and April had very low rainfall levels (Table 1, Figure 4a). There was no relationship between the accumulated rainfall (30 and 60 days) and the antioxidant activity measured by the EC<sub>50</sub> ( $r_s = -0.43$ ,  $p > 0.05$  and  $r_s = -0.32$ ,  $p > .05$ , respectively).

Although there being no correlation between rainfall and antioxidant activity, the highest EC<sub>50</sub> values (lower antioxidant power) were observed in months with less rainfall (as February, March, May and October). Thus, although being an unusual year on the rainfall distribution, there seems to be a tendency lower antioxidant activity in the months with less rainfall (Figure 4a).

Similarly to the results of antioxidant activity, concentrations of the major phenolic compounds 1, 2 and 3, as well as the concentration of their combination are uncorrelated with the cumulative rainfall in 30 days (0.08; -0.37; -0.65; -0.60,  $p > 0.05$  respectively) or 60 days (-0.31; -0.08; -0.60; -0.65,  $p > 0.05$  respectively).

### 3.3 Correlation between the concentration of major phenolic compounds and antioxidant activity

The antioxidant activity does not correlate with the concentrations of each of the three phenolic compounds, as well as their combined concentration (Table 2). Only compound 1 showed significant correlation with EC<sub>50</sub> values in three months, two of them being a negative and one positive correlation. These data are unusual since on two occasions (February and December) the increased concentration of this compound is correlated with increased antioxidant activity and on another (in June) the reverse is true. Thus, our results show that the major phenolic compounds are not the major components responsible for antioxidant activity directly for *A. colubrina* or by changes

in the EC<sub>50</sub> values that occurred during the months analyzed, with the exception of compound 1 for a few months.

#### 4. Discussion

##### 4.1 Annual variation of antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds

As expected, the antioxidant activity varied during the year and this finding corroborates other studies that showed that this activity may vary during a given period and that months with less activity can be interspersed with months with higher activity (Bulovas et al., 2005; Siatka and Kašparová, 2010).

This fluctuation can be partly explained by the antioxidant system becomes complex by involving different mechanisms of plant metabolism. Thus, some compounds involved in the antioxidant system may have alteration in their concentrations throughout the year and not others (Bulovas et al., 2005, Munné-Bosch and Cela, 2006). In leaves of *Camellia sinensis* the major catechins (epigallocatechin gallate, epicatechin and epigallocatechin gallate) varied during the year, and such variation associated with the following environmental factors: day length, sunlight, and/or temperature, which can act combined or isolate (Yao et al., 2005). This work identified that while the production of epigallocatechin gallate and epigallocatechin gallate are positively influenced by warmer months, the production of epigallocatechin are positively influenced by the colder months, showing that similar compounds can be changed by the same factor simultaneously, presenting fluctuations throughout the year.

The major phenolic compounds varied throughout the year, with the exception of compound 3, which remained stable. Some environmental factors may affect certain phenolic compounds and do not influence the production of others (Laitinen et al., 2000; Lavola et al., 2003).

##### 4.2 Correlation of the variation in antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds with the rainfall

Although studies show that the water availability affects the production of compounds involved in the antioxidant activity (Gamble and Burke 1984; Dat et al., 2000), due to these compounds being generally responsible for the acclimation of plants to drought, once the low levels of ROS are kept (Dat et al., 2000), the rainfall in our study was not a factor related to the antioxidant activity and concentration of phenolic compounds.

A previous study on the effect of seasonal variation in the production of tannins performed in a similar area showed that during the dry period barks of *A. colubrina* had higher levels of this compound than in the rainy season, going against our findings (Miller et al., 2006a). However, in this study the method used quantifies the total content of tannins, without distinguishing between molecules, and this may suggest that the seasonal variation may not correlate with phenolic compounds as found in isolation, but it may affect a broader group of compounds.

#### 4.3 Correlation between the concentration of major phenolic compounds and antioxidant activity

Although phenolic compounds being known by having antioxidant effects, particularly in free radicals scavenging and, their concentration are correlated with the antioxidant power (Kouakou-Siransy et al. 2010), our data do not support this claim for the compounds examined. Our findings reinforce the results found in other works, such as Araújo et al. (2012), which did not correlate the concentration of tannins in the barks of *Spondias tuberosa* collected in the same area with the change of antioxidant activity. Siatka and Kašparová (2010) when studying the flowers of *Bellis perennis* L. observed a correlation between total phenolic content and antioxidant activity; however, this activity is not correlated with the concentration of flavonoids. This shows that other compounds, including minor components which were identified by HPLC, can be more directly associated with antioxidant activity.

This suggests that in future works on this species, compounds with lower concentrations are analyzed for correlation with antioxidant activity. Overall, due to there being no association between the analyzed phenolic compounds and the antioxidant activity, it does not mean that these metabolites do not play such an activity. Furthermore, in case of compound 1 was observed correlation with antioxidant activity

at two moments, showing that the increased compound concentration was followed by decreased EC<sub>50</sub> of the antioxidant activity. These results lead to two observations. The first is that if we had collected samples only in February or December it would be concluded that compound 1 is correlated with the antioxidant activity and making generalizations about this correlation, fact not observed for the other months. The second is based on a compound that may have a reduced association with the antioxidant activity and have a high correlation with such activity depending on the location of sample collection (Schwartz et al., 2009), this correlation observed with compound 1 can be changed if samples of *A. colubrina* are collected from another environment.

Qualitative and quantitative studies indicate the presence of flavonoids in the stem barks of *A. colubrina* (Alencar et al., 2010, Araújo et al., 2008), and this study a compound was identified as hyperin. No reports on the presence of hyperin for this species were found in the literature. This flavonoid has proven antioxidant activity in some studies and these results may be associated with the popular use of the bark of *A. colubrina*, since hyperin is one of the major compounds of this species. This compound has known action against lipid peroxidation and free radicals scavenging, protecting the organism against myocardial ischemia and stroke, reducing damage to the brain (Chen et al., 2006, Chen et al., 1998, Wang et al., 1996). The hyperin isolated from the root of *Acanthopanax chiisanensis* was the compound responsible for suppressing the PGE<sub>2</sub> production and nitric oxide in *in vitro* tests suggesting the anti-inflammatory activity of this species (Lee et al., 2004). Analgesic effect was also detected, possibly due to this compound reducing the calcium concentration into nerve endings (Chen et al., 1989). The *in vitro* and *in vivo* tests used in these studies may partly explain the use of *A. colubrina* by residents of the region where the species was collected, since this species is used in the preparation of medicine related to diseases associated with oxidative stress, especially for inflammation.

## 5. Conclusion

These results show that the antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds from the barks of *A. colubrina* vary little throughout the year, despite the significant difference among a few months. Among the three phenolic compounds tested, only the compound 3 was stable during the study. Variations of

antioxidant activity and concentrations of major phenolic compounds were not correlated with rainfall, indicating that other(s) study(s) taking into account other environmental factor(s) must be performed(s). Furthermore, the phenolic compounds analyzed were not associated with good antioxidant activity of *A. colubrine*; however, it does not mean that such compounds have no antioxidant function. It is suggested that when analyzing the antioxidant activity of a species in order to correlate with the concentration of their phenolic compounds, samples should be collected at least two periods of the year, since these compounds can vary significantly, allowing the study has only sparse data so that generalizations cannot be made if using only one sampling date.

## 6. Acknowledgements

The Biologists André do Nascimento and Luciane Leite for supporting in extracts preparation and antioxidant analysis. The FACEPE for granting a research fellowship and helping the student mobility of T. A. S. Araújo and the CNPq for financial support ("Universal Call") and granting of productivity attributed to UP Albuquerque.

## References

- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J. M., Lins Neto, E. M.F., Melo J.G., Santos J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 114, 325–354
- Alencar, N.L., Araújo, T.A.S., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2010. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias evidence in support of the diversification hypothesis. *Econ. Bot.* 64, 68–79.
- Araújo, E.L., Castro, C.C., Albuquerque, U.P., 2007. Dynamics of Brazilian Caatinga – A Review Concerning the Plants, Environment and People. *Funct. Ecosyst. Communities* 1 (1), 15–28.
- Araújo, T.A.S., Alencar, N.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 120, 72–80.
- Araújo, T.A.S., Castro, V.T.N.A., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2012. Habitat Influence on Antioxidant Activity and Tannin Concentrations of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae). *Pharm. Biol.* 50(6): 754–759

- Ayres, M., Ayres, M.J., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2007. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Brasília, Brazil: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq.
- Aznar, O., Checa, A., Oliver, R., Hernandez-Cassou, S., Saurina, J., 2011. Determination of polyphenols in wines by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *J. Sep. Sci.* 34, 527–535.
- Brasil. Geografia. Biomas e vegetação: Biomas brasileiros. Available at: <http://www.brasil.gov.br/sobre/geografia/biomas-e-vegetacao/biomas-brasileiros>. Accessed 30/11/2011.
- Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C., Domingos, M., 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Rev. Bras. Bot.* 28 (4), 687–696.
- Chen, H.Y., Wang, J.H., Ren, Z.X., Yang, X.B., 2006. Protective effect of hyperin on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 4 (5), 526–9.
- Chen, Z., Ma, C., Zhao, W., 1998. Protective effect of hyperin against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharm. Sin.* 33 (1), 14–7.
- Chen, Z.W., Ma, C.G., Xu, S.Y., 1989. Mechanism of analgesic action of hyperin. *Acta Pharm. Sin.* 24 (5), 326–30.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161–1168.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montagu, M.V., Inzé, D., Breusegem, F.V., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779–795.
- Gamble, P.E., Burke, J.J., 1984. Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System: I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiol.* 76, 615–621.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inés, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol Plant* 31, 427–436.
- Kouakou-Siransy, G., Sahpaz, S., Irié-Nguessan, G., Datte, Y.J., Kablan, J., Gressier, B., Bailleul, F., 2010. Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. *Food Chem.* 118, 430–435.
- Kumari, A., Kakkar, P., 2008. Screening of Antioxidant Potential of Selected Barks of Indian Medicinal Plants by Multiple in vitro Assays. *Biomed. Environ. Sci.* 21, 24–29.
- Laitinen, M.-L., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M., 2000. Variation in Phenolic Compounds within a Birch (*Betula pendula*) Population. *J. Chem. Ecol.* 26 (7), 1609–1622.
- Lavola, A., Aphalo, P.J., Lahti, M., Julkunen-Tiitto, R., 2003. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Environ. Exp. Bot.* 49, 49–60.
- Lee, S., Jung, S.H., Lee, Y.S., Yamada, M., Kim, B.-K., Ohuchi, K., Shin, K.H., 2004. Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. *Arch. Pharmacol. Res.* 27 (6), 628–632.
- Lima, V.L.A.G., Melo, E.A., Maciel, M.I.S., Silva, G.S.B., Lima, D.E.S., 2004. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). *Rev. Nutr.* 17, 53–57.
- Maestri, D.M., Nepote, V., Lamarque, A.L., Zygadlo, J.A., 2006. Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: Advances in Research.* 105–135.

- Mccune, L.M., Johns, T., 2007. Antioxidant activity relates to plants part, life form and condition in some diabetes remedies. *J Ethnopharmacol.* 112, 461–469.
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Lins Neto, E.M.F., Araújo, E.L., Albuquerque, M.M., Amorim, E.L.C., 2006a. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Brazilian. J. Pharmacogn.* 16(3), 338–344.
- Monteiro, J.M., Almeida, C.F.C.B.R., Albuquerque, U. P., Lucena, R.F.P., Florentino, A.T.N., Oliveira, R.L.C., 2006b. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. *J. Ethnob. Ethnomed.* 2: 6.
- Munné-Bosch, S., Cela, J., 2006. Effects of water deficit on photosystem II photochemistry and photoprotection during acclimation of lyreleaf sage (*Salvia lyrata*L.) plants to high light. *J. Photochem. Photobiol., B.* 85, 191–197
- Oh, M.-M., Trick, H., Rajashekar, C.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *J. Plant Physiol.* 166, 180–191.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I., 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* 12 (1), 29–36.
- Ramirez, M.R., Geracitano, L., Barros, D.M., Henriques, A.T., 2009. Efectos beneficiosos de extractos de frutas rojas y de sus antocianos. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 8 (6), 456–468.
- Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer I., Bar-ya'akov, I., Wiesman, Z., Tripler E., Bar-ilan, I., Fromm, H., Borochoy-neori, H., Holland, D., Amir, R., 2009. Environmental Conditions Affect the Color, Taste, and Antioxidant Capacity of 11 Pomegranate Accessions' Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9197–9209.
- Siatka, T., Kašparová, M., 2010. Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellisperennis* L. Flowers. *Molecules* 15 (12), 9450-9461.
- Soldati, G.T., Albuquerque, U.P., 2010. Impact assessment of the harvest of a medicinal plant (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) by a rural semi-arid community (Pernambuco), northeastern Brazil. *Int. J. Biod. Sci. Ecosyst. Serv. Manage.* 6, 3–4.
- Tausz, M., Wonisch, A., Gril, D., Morales, D., Jiménez, M.S., 2003. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *J. Exp. Bot.* 54 (387), 1505–1510.
- Wang WQ, Ma CG, Xu SY., 1996. Protective effect of hyperin against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 17 (4), 341–344.
- Yao, L., Caffin, N., D'arcy, B., Jiang, Y., Shi, J., Singanusong, R., Liu, X., Datta N., Kakuda, Y., Xu, Y., 2005. Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Australia-Grown Tea (*Camellia sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* 53 (16), 6477–6483.
- Yong, T., Zongsuo, L., Hongbo, S., Feng, D., 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidativeenzymes and osmoregulation among three differentgenotypes of Radix Astragali at seeding stage. *Colloids Surf., B* 49, 60–65.
- Zhang, S-J., Lin, Y-M., Zhou, H-C., Wei, S-D., Lin, G-H., Ye, G.F., 2010. Antioxidant Tannins from Stem Bark and Fine Root of *Casuarina equisetifolia*. *Molecules* 15(8), 5658–5670.

Table 1 - Accumulated rainfall on 30 and 60 days, values of antioxidant activity expressed as EC<sub>50</sub> and concentrations of phenolic compounds 1, 2, 3 from the stem barks of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan collected in a Caatinga area, Northeast Brazil, in 2010. The values of antioxidant activity and concentration of phenolic compounds are expressed as mean ± standard error.

Months (2010)	Rainfall 30 days (mm)	Rainfall 60 days (mm)	EC <sub>50</sub> (µm/ml)	Compound 1 (ppm)	Compound 2 (ppm)	Compound 3 (ppm)	Compound 1+2+3 (ppm)
January	135.5	143.0	23.83 ± 1.19 ac				
February	7.5	143.0	23.92 ± 0.74 c	52.16 ± 7.34 ab	49.18 ± 9.03 a	61.33 ± 8.78 a	162.68 ± 19.83 a
March	22.5	30.0	27.10 ± 0.67 b				
April	51.0	53.5	21.60 ± 0.73 ad	68.02 ± 6.68 a	38.29 ± 6.39 ab	64.28 ± 9.67 a	170.60 ± 21.49 a
May	8.0	59.0	27.29 ± 0.76 b				
June	343.0	351.0	22.18 ± 1.10 acde	53.01 ± 5.34ab	32.13 ± 7.06 ab	55.60 ± 7.07 a	140.75 ± 17.58 a
July	96.0	439.0	20.27 ± 1.04 de				
Augusto	132.5	228.0	19.92 ± 1.02 de	66.41 ± 8.09 a	37.58 ± 10.99 ab	60.42 ± 9.35 a	144.91 ± 21.30 a
September	72.0	204.0	20.29 ± 1.18 ad				
October	9.0	81.0	22.10 ± 0.86 cd	57.91 ± 8.08 ab	21.35 ± 2.87 b	65.64 ± 10.78 a	164.42 ± 27.02 a
November	46.0	55.0	20.19 ± 0.71 de				
December	70.5	116.5	20.17 ± 0.73 cde	48.28 ± 4.21 b	32.54 ± 8.55 b	51.87 ± 7.51 a	132.69 ± 15.61 a
<b>Mean</b>			22.41 ± 0.75 acd				
<b>Ascorbic acid</b>			19.27 ± 0.29 e				

Means followed by the same letter means no statistical difference, using p = 0.05.

Table 2 - Values of Spearman correlation coefficient between the EC<sub>50</sub> values of antioxidant activity and phenolic compounds from the barks of *A. colubrina* collected in a Caatinga area of Pernambuco State, Brazil, in 2010.

	Months (2010)	Phenolic compounds			
		1	2	3	1+2+3
<b>DPPH</b>	February	-0.63 *	0.41	0.04	-0.14
	April	0.02	-0.07	0.09	0.09
	June	0.63 *	0.38	0.39	0.45
	August	-0.20	0.18	-0.18	-0.11
	October	-0.48	-0.34	-0.34	-0.33
	December	-0.64*	0.16	-0.41	-0.36

\* values with  $p < 0.05$

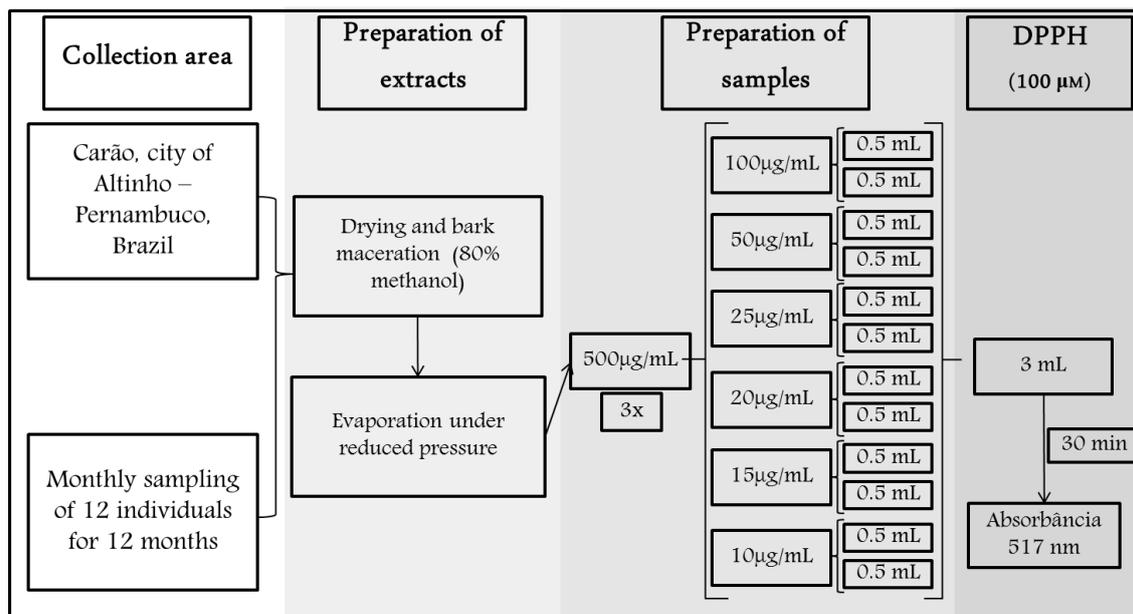
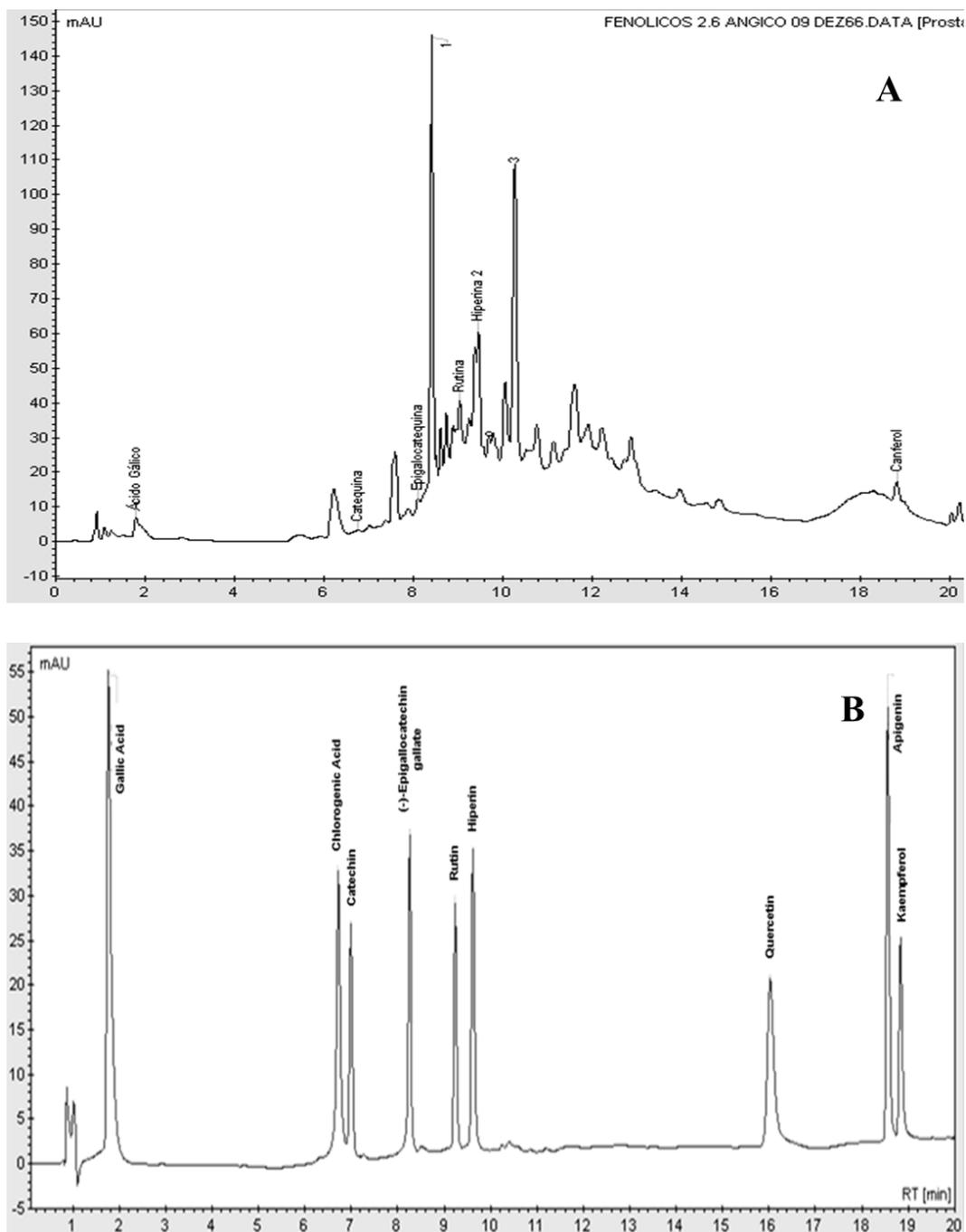
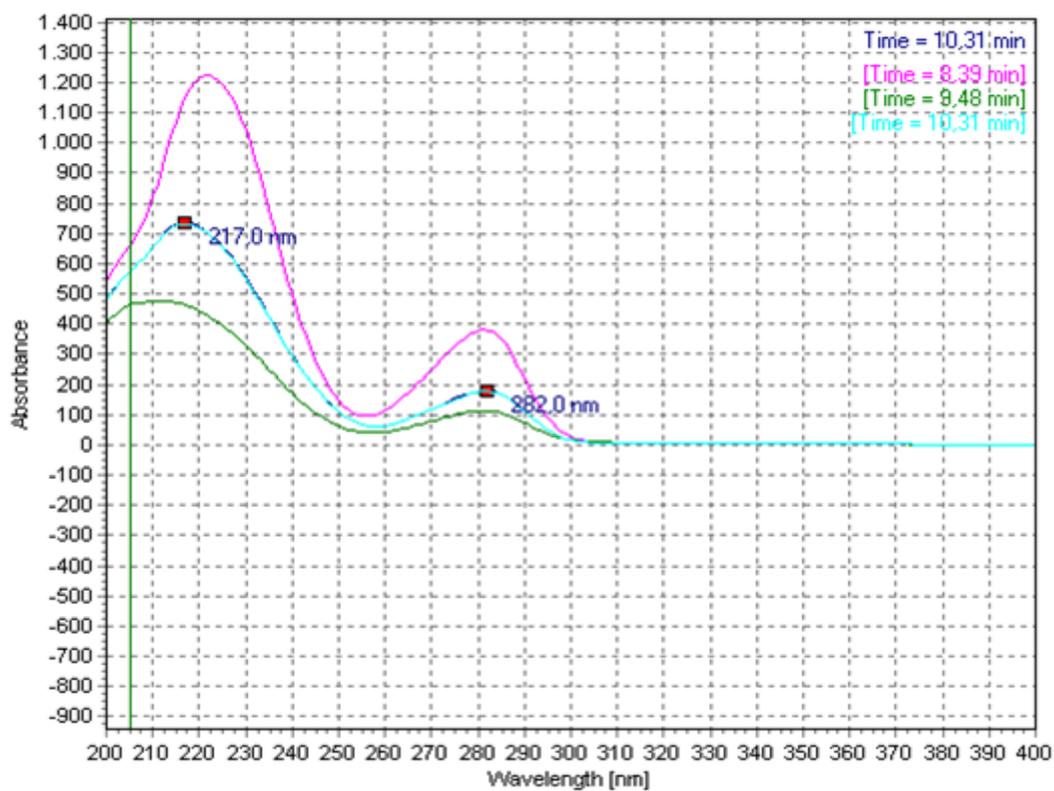


Figure 1 - Experimental Design for the quantification of antioxidant activity in vitro using the DPPH assay (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). Adapted from Araújo et al. (2012).



**Figure 2.** HPLC-UV chromatogram of phenolic compounds from stem bark extract of *Anadenanthera colubrina*. Detection at 280 nm. Peak (1) phenolic compound with similar spectrum to epigallocatechin gallate; (2) phenolic compound with similar spectrum and retention time to hyperin; (3) phenolic compound with similar spectrum to gallate (A). HPLC-UV chromatogram of standard phenolic compounds (B).



**Figure 3.** Spectrum of the epigallocatechin gallate at the time 8.39 minutes and its equivalents, compounds 1 and 3 at the times 9.48 and 10.31 minutes respectively.

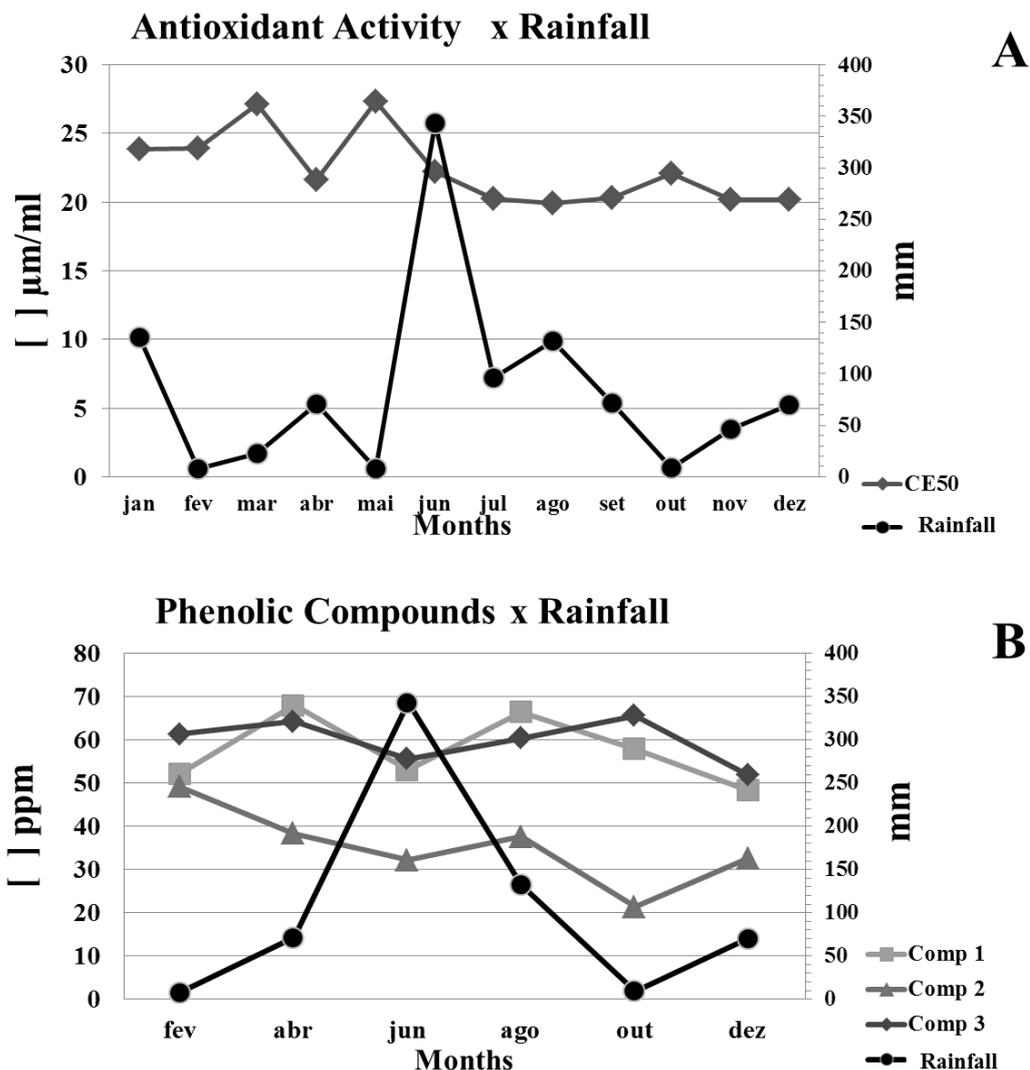


Figure 4 - Variation of antioxidant activity (A) and major phenolic compounds (B) from the barks of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in response to rainfall variation in an area of Caatinga of Pernambuco, Brazil during 2010.

6. ARTIGO - HABITAT INFLUENCE  
ON ANTIOXIDANT ACTIVITY  
AND TANNIN CONCENTRATIONS  
OF *SPONDIAS TUBEROSA*

**ARTIGO PUBLICADO**

Pharmaceutical Biology, 2012; 50(6): 754–759

© 2012 Informa Healthcare USA, Inc.

ISSN 1388-0209 print/ISSN 1744-5116 online

DOI: 10.3109/13880209.2011.630673

**Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa***

Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>1</sup>; Valerium Thijan Nobre de Almeida e Castro<sup>2</sup> Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim<sup>2</sup>; Ulysses Paulino de Albuquerque<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Etnobotânica Aplicada - Departamento de Biologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Produtos Naturais - Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

\*Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Biologia - Laboratório de Etnobotânica Aplicada. Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos. 52.120-050 - Recife-PE-Brazil.

Fone: +55 (81) 33206350

Email: upa@db.ufrpe.br

## Abstract

Context: Different habitat conditions can be responsible for the production of secondary metabolites and for the antioxidant properties of plant products.

Objective: Thus, the aim of this study was to evaluate whether the antioxidant activity and tannin concentrations in the stem bark of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) varied with collection site.

Material and methods: The bark was collected from 25 individual trees, distributed in five different landscape units, as follows: agroforestry gardens, areas of pastures, maize cultivation areas, mountain areas and mountain bases, with the former 3 being considered as anthropogenic habitats, and the latter 2 considered as habitats with native coverage. The study was conducted in the rural area of the city of Altinho, Pernambuco State (northeast Brazil). The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method was used to measure the antioxidant activity and tannin concentrations were evaluated by using the radial diffusion method.

Results: The results demonstrated that there were no significant differences among the tannin concentrations of the individuals from the native ( $6.27\% \pm 1.75$ ) or anthropogenic areas ( $4.63\% \pm 2.55$ ), ( $H = 2.24$ ;  $p > 0.05$ ). In contrast, there were significant differences ( $H = 5.1723$ ;  $p < 0.05$ ) among the  $CE_{50}$  means of the antioxidant activities of the individuals from the native ( $32.10 \mu\text{g/ml} \pm 5.27$ ) and anthropogenic areas ( $27.07 \mu\text{g/ml} \pm 2.29$ ). However, correlations between the tannin concentrations and antioxidant activity of the extracts were not observed in the native ( $r = 0.39$ ;  $p > 0.05$ ) or in the anthropogenic areas ( $r = 0.38$ ;  $p > 0.05$ ).

Discussion and conclusion: Because the variation of the antioxidant capacity of *S. tuberosa* bark was not accompanied by a variation in the tannin concentration, this property may be related to the presence of other metabolite(s).

Keywords: Caatinga; Umbu; DPPH; Radial diffusion method; Free radicals

## Introduction

Environmental, genotypic and phenotypic factors can be responsible for the qualitative-quantitative variations of secondary metabolites and the antioxidant capacity of plants (Wieser et al., 2002, 2003; Peltonen et al., 2005; Santos et al., 2006; Monteiro et al., 2006; McCune & Johns, 2007; Ksouri et al., 2008). Different environmental factors, such as temperature and water availability, characterize different habitats and, consequently, can influence plant metabolism.

The combination of temperature, rainfall index and ozone concentration influences the production of antioxidants, especially ascorbate (Hofer et al., 2008). Many metabolites, especially secondary ones as phenols, can have their production influenced by several factors that act synergistically. For instance, longer periods of rainfall and low fertility in the soil act together in the increase of total phenol and tannin levels in *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Fabaceae) (Jacobson et al., 2005; Santos et al., 2006). However, in relation to tannin concentrations, the rainfall index and seasonal climate are the main factors associated with the increase in the production of this metabolite in the leaves of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) and the bark of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) (Monteiro et al., 2006).

Both age and sun exposure are factors that influence the production of antioxidant compounds in *Fagus sylvatica* L. (Fagaceae) leaves; older individuals and those exposed to more sunlight present a greater photoprotective capacity to the impact of oxidative stress (Wieser et al., 2003). McCune and Johns (2007), when evaluating the medicinal plants used by Canadian indigenous, concluded that locations with greater sun exposure, which tend to be drier or with poorer soil, contained species with enhanced antioxidant activity.

Thus, this study was aimed at evaluating whether the antioxidant activity and tannin levels of the stem bark of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) varied according to the collection sites. To this end, we formulated three questions. Does the antioxidant activity of the stem bark of this species vary according with collection site? If so, is this variation accompanied by a variation in the tannin concentration? Is there a relationship between the tannin levels and antioxidant activity? *S. tuberosa* is a tree, endemic of the Caatinga, known locally as “umbu” and used for various purposes, especially food and medicinal (Lins Neto et al., 2010). Antidiabetic, hypocholesterolemic and anti-inflammatory uses are among the local therapeutic applications of this plant (Albuquerque et al., 2007; Lins Neto et al., 2010).

## Materials and methods

### *Collection site and the selection of specimens*

The collection of the individuals for this study was carried out, in July 2009, in a rural community known as “sítio Carão” (08° 35' 16.1" S x 36° 05' 36.1" W), Altinho – PE, northeast Brazil (8° 29' 32" S x 36° 03' 03" W). This region is characterized by Caatinga vegetation, with a hot, semi-arid climate (Bshs<sup>?</sup>) and an average temperature above 26°C. Rainfall is very irregular; in 2009, it rained 994.5 mm<sup>3</sup> in Altinho (IPA, 2010). The specie was identified by biologist Luciana G. de Sousa and the voucher was incorporated into the Herbarium Vasconcelos Sobrinho of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) under the number 48652.

Similar to other areas of the Caatinga (Sampaio, 2002; Albuquerque & Andrade, 2002; Araújo et al., 2007), the community of Carão has experienced significant changes in the local vegetation due to the conversion of land use to pastures, permanent and/or temporary crops

and timber resources (Almeida et al., 2011). These changes are responsible for the formation of landscape units associated with specific types of management (Lins Neto et al. 2010; Almeida et al., 2011). For the studied region, Almeida et al. (2011) recognized the following landscape units:

Mountain area – a mountain range adjacent to the community (690 m of altitude), with a predominance of shrubs and trees approximately 10 m tall and trees reaching over 50 cm of stem diameter at ground level. Portions of this area were cleared approximately 60 years ago for the planting of subsistence crops, however, in the inclined areas that lead to the flat part of the mountain area, these activities have ceased, and the vegetation has been regenerating for approximately 50 years.

Mountain base – a transitional area between the mountain area and the regions with agriculture and grazing, which are on the flat areas, with altitudes that vary between 460 and 520 m. This area has been regenerating for approximately 15 years, after the abandonment of farming. It is covered with shrubs approximately 3 m in height and some trees.

Pasture – an area used for raising cattle and goats, where the vegetation was cleared approximately 30 years ago. These areas tend to be flat, with herbaceous vegetation and altitudes ranging from 440 to 460 m.

Cultivation areas – these areas differ from the pasture in that they are used for the cultivation of maize, beans and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* Mill (Cactaceae)]. Among the agricultural practices is the preparation of the soil for planting, which consists of yearly plowing and cutting of the few woody and herbaceous elements.

Agroforestry gardens – areas closer to households where, as in the cultivation and pasture units, the individuals of *S. tuberosa* and some other species are cultivated because of their desirable characteristics, such as medicinal, food and shade uses.

Based on this characterization, we classified the landscape units into the native areas (the mountain area and mountain base) and the anthropogenic areas (the pasture, cultivation and agroforestry gardens). From each of these landscape units were randomly selected five individuals, for a total of 25, with 10 being from the native areas and 15 from the anthropogenic areas. The selection was based on 20 individuals previously marked by Lins Neto (2008) in each unit.

Samples of the stem bark were collected from each individual, as this is the part of the plant used to treat diseases in the region (Albuquerque et al., 2007; Lins Neto et al., 2010). All of the plant material was collected on the same day in July, 2009, that occasionally, was the wettest month of the year, with 213.5 mm<sup>3</sup> of rainfall in the city of Altinho (IPA, 2010).

### ***In vitro analysis of the antioxidant activity***

#### **Plant extract**

Dry and pulverized bark was macerated for six days, at a ratio of 1:20 w/v in 80% methanol. The material was then filtered through filter paper, and the extraction alcohol was evaporated under reduced pressure, generating a dry extract. Based on this dry extract, three independent samples were prepared in methanol with a concentration of 500 µg/mL. For each of these 3 samples, 6 dilutions were made, at concentrations of 100, 50, 25, 20, 15 and 10 µg/mL.

#### **Measurement of the antioxidant activity by the DPPH method (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)**

The antioxidant activity was assessed using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay, according to a protocol adapted from Cotelle et al. (1996) and McCune and Johns (2002, 2007). For this purpose, a DPPH solution was prepared at 100 µM in methanol. From each

dilution of the extract (see above), 0.5 mL was added to 3.0 mL of the DPPH solution in a test tube; these analyses were carried out in duplicate. After 30 min of incubation, the absorbance of the solution was determined by a spectrophotometer at 517 nm (Figure 1). Ascorbic acid was used as a positive control at concentrations of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 and 50 µg/mL.

Based on the absorbance readings, the  $CE_{50}$  was obtained, which represents the concentration of extract or ascorbic acid (positive control) required to decrease the initial concentration of DPPH by 50%. To calculate the  $CE_{50}$ , a graphic was prepared where the sample concentrations (µg/mL) or positive control were displayed in the abscissa and the percentage of DPPH remaining (% DPPH<sub>REM</sub>) was placed in the ordinate, obtaining a first order exponential curve and its equation (Sousa et al., 2007). The %DPPH<sub>REM</sub> was calculated according to the following formula:

$$\%DPPH_{REM} = ([DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0}) \times 100,$$

where  $[DPPH]_{T=t}$  corresponds to the concentration of DPPH after reaction with the extract, and  $[DPPH]_{T=0}$  is the initial concentration of DPPH, that is, 40 µg/mL (100 µmol/L) (Sousa et al., 2007).

### *Analysis of tannins*

#### **Plant extracts**

The dry and pulverized bark was standardized by sieving through a 16-mesh (1 mm in diameter) screen. The plant material was extracted for 1 hour at room temperature, using 50% methanol, at a ratio of bark:solvent of 50:1 (mg:mL).

### Preparation of assay plates

The radial diffusion method (Hagerman, 1987), adapted by Cabral et al. (2010), was used to determine the tannin concentrations. This analysis is based on the same principles of immunoassay methods because of the similarity, in some aspects, that exist between the interactions of antigen-antibody and protein-tannin, forming multivalent complexes that precipitate and are visible. The area of the complex, in this case, is linearly proportional to the tannin quantity (Hagerman, 1987; Cabral et al., 2010).

A gel was prepared using a solution of 50 mM acetic acid and 60  $\mu$ M ascorbic acid and adjusting the pH to 5.0 by the addition of sodium acetate. Agarose (type I) (Sigma-Aldrich) was added to 1%, and this mixture was stirred and heated until it boiled for the homogenization of the agarose. After cooling to 45°C, bovine serum albumin (BSA) fraction V, free of fatty acids (Sigma-Aldrich), was added to 0.1%.

Ten milliliters of the solution was distributed into 9.0 cm Petri plates and left on a level surface to obtain a uniform layer of gel until total solidification. Wells of 4 mm in diameter were created, 2.0 cm apart from each other and from the edges of the plates. Three successive portions of 8  $\mu$ L from each extract were applied to the wells of the diffusion gel. All analyses were performed in authentic triplicates.

For the preparation of the standard curve, 2, 4, 8, 12, 16 and 20  $\mu$ L of an aqueous solution of tannic acid (25 mg/mL) was distributed into the wells in triplicate. Portions greater than the capacity of the wells were fractionally added to avoid overflow.

To analyze the size of the obtained diameters, the plates were scanned using a scanner. The diameter of the rings were measured through Corel Draw® X3 program Version 13, by drawing a circle, using the model of the program and taking the average of two perpendicular diameters for each ring. Readings for the standard curve were inserted in a scatter plot to

obtain the line equation through linear regression with aid of Excel software version 2003 (Cabral et al., 2010).

### ***Data analysis***

Because the data were not normally distributed, the Kruskal-Wallis test was used to assess whether or not the collection site (habitat) influenced the antioxidant activity and tannin concentrations of the extracts. The Spearman correlation test was used to determine whether there was a relationship between the tannin concentrations and antioxidant activity. The software BioEstat 5.0 was employed in all tests (Ayres et al., 2007).

### **Results and discussion**

On average, the individuals collected from the anthropogenic areas had the highest values of antioxidant activity (Table 1). Among the landscape units, the area closest to households provided the greatest activity, which presented, on average, smaller  $CE_{50}$  values (25.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Table 1). Statistically, there was a significant difference between the total mean of the  $CE_{50}$  of the antioxidant activity of the individuals from the anthropogenic (27.07  $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0.73$ ) and native areas (32.10  $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 2.82$ ) ( $H = 5.1723$ ;  $p < 0.05$ ). These results corroborated other studies showing that different collection sites is a factor that can influence the antioxidant activity of plants (Wildi & Lütz, 1996; McCune & Johns, 2007; Anli & Vural, 2009).

The soil fertility is another one of these factors. McCune and Johns (2007) noted that medicinal plants collected at sites with lower soil fertility and water availability had the highest antioxidant activities (smallest  $CE_{50}$ ). However, this result disagrees with ours in the sense that the areas with the smallest values of  $CE_{50}$  were those of households and pastures,

which in a previous study conducted by Lins Neto (2008), presented a higher fertility when compared to the other areas (Table 1).

Furthermore, this difference in the antioxidant activity among the collection sites can be explained by the fact that, although environmental factors affect the antioxidant activity of plants, not all of the compounds responsible for this activity necessarily need to be affected: the environment can influence some antioxidant compounds and not others (Wieser et al., 2003). Anli and Vural (2009) observed that some phenolic compounds may be found in significantly different concentrations, while others are not, depending on the collection site, consequently altering the antioxidant capacity.

Although our study evaluated only the bark of *S. tuberosa*, the collection site also has been reported to influence the ascorbic acid concentrations in the fruits of individuals from the same community (Lins Neto, 2008). Ascorbic acid has a known antioxidant activity, and similar to our findings, it was observed that individuals collected in areas near households presented significant differences, with greater concentrations of ascorbic acid, when compared to other collection sites (Lins Neto, 2008).

Overall, the analysis of the tannin concentrations demonstrated that there was no significant difference between the individuals from the native ( $6.27\% \pm 0.46$ ) and anthropogenic areas ( $4.64\% \pm 1.05$ ), ( $H = 2.24$ ;  $p > 0.05$ ). Despite the lack of a statistical difference, it is worthwhile to mention that the highest concentrations of tannin, on average, were found in the native area units. Among them, the Forest area had the highest concentrations (6.73%) and the lowest antioxidant activity (Table 1).

Although some previous studies have demonstrated that environmental effects and collection sites influence the production of phenolic compounds, especially those related to

tannins (Monteiro et al. 2006; Alonso-Amelot et al., 2007; Anli & Vural 2009), our results corroborate other studies, which have reported that abiotic stresses increase the concentration of phenolic compounds, though not necessarily tannins, resulting in an increase in the antioxidant activity (Navarro et al., 2006; Ksouri et al., 2007, 2008).

The difference in tannin concentrations, although not significant, may be related to the differences in the soil fertility found by Lins Neto (2008), given that the most fertile areas presented the smallest values of tannin concentrations in our study. Fertile soils seem not to influence the increase of tannin concentrations, presenting at times an inverse relationship with some compounds that are necessary for plant development, such as nitrogen, phosphorus, sulfur and potassium (Koricheva et al., 1998; Fidelis, 2003; Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Although several studies have correlated phenolic compounds, including tannins, with antioxidant activity (Lima et al., 2004; McCune & Johns, 2007; Ramirez et al. 2009; Zhang et al. 2010), a correlation between the tannin concentrations and the  $CE_{50}$  were observed neither in the native ( $r = 0.39$ ;  $p > 0.05$ ) nor in the anthropogenic areas ( $r = 0.38$ ;  $p > 0.05$ ). These findings substantiate several previous studies (Sousa et al, 2007; Anli & Vural, 2009; Kähkönen et al. 1999). Sousa et al. (2007), when analyzing five medicinal plants, observed that there was no positive correlation between the quantity of total phenols and the antioxidant activity for some species, suggesting that other constituent more effectively contributes to the sequestration of free radicals. Kähkönen et al. (1999) analyzed 92 different plant extracts, sub-grouped into fruits, herbs, vegetables, grains and trees, and observed no significant correlation between the concentration of total phenols and the antioxidant activity in any of the studied subgroups, concluding that antioxidant activity cannot be predicted based on phenolic content. A study on grape varieties from Turkey demonstrated that, although

varieties collected in a given region presented the highest phenolic concentrations and the greatest antioxidant capacities than those from other regions, it does not seem reasonable to claim a direct relationship between the antioxidant capacity and the total phenolic content of the varieties (Anli & Vural, 2009). Other studies have shown that phenolic compounds can differ qualitatively and quantitatively, both among cultivars and among different parts of the plant (Cartea et al., 2011).

The best explanation for the lack of a relationship between the antioxidant capacity and the tannin concentration, under the same conditions, is the fact that certain compounds with antioxidant properties respond differently to these conditions. Lavola et al. (2003), when studying *Pinus sylvestris*, concluded that the environmental factors that positively affect the pathway of the secondary metabolism of flavonoids also negatively affect, or are neutral, in the tannin pathway.

Wieser et al. (2003) studied the leaves of *Fagus sylvatica* in different gradients of exposure to solar radiation, and observed that the individuals that received more exposure to this factor presented a significant increase in the concentration of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol; however, the concentration of glutathione did not differ when compared to plants in the shade, showing that some compounds may be more sensitive to certain factors. Similarly, the collection site was shown to influence the production of antioxidant phenolic compounds, such as catechin, epicatechin, vanillic acid and syringic acid, in grape varieties collected in different regions of Turkey (Anli & Vural, 2009).

This influence can occur within the same group of metabolites, as reported by Siatka and Kašparová (2010). These authors showed that, although there is a correlation between the antioxidant activity and the concentration of total phenols in the flowers of *Bellis perennis* L., a correlation between the concentration between total flavonoids and antioxidant activity was

not observed, showing that not all of the flavonoids were responsible for this activity. Based on this idea, a portion of the tannins of the species studied in this report may not have the same antioxidant capacity, given that the radial diffusion method does not qualitatively distinguish tannins (Hagerman, 1987).

### **Conclusions**

Our results indicate that, for the studied areas, the collection sites did not influence the tannin concentrations of *Spondias tuberosa*, although the collection site was responsible for the differences in the antioxidant activity. Because the variation in the antioxidant capacity of *S. tuberosa* bark was not accompanied by a corresponding variation in the tannin concentration, this variation may be related to the presence of other metabolite(s), whose production and/or accumulation is likely more sensitive to different habitats.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Prof. Msc. Ernani Machado de Freitas Lins Neto for the support in the selection and collection of plant material and Msc. Daniela Lyra de Vasconcelos Cabral for their help in analyzing the tannins. We thank CNPq (“Edital Universal”) and FACEPE for its financial support and grants to U.P. Albuquerque and T. A. S. Araújo.

### **Declaration of interest**

The authors declare they have no conflict of interest.

### **References**

Albuquerque UP, Andrade LHC. (2002). Uso de recursos vegetais da Caatinga: O caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia*, 27, 336-345.

Albuquerque UP, Medeiros M, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol*, 114, 325-354.

Alonso-Amelot ME, Oliveros-Bastidas A, Calcagno-Pisarelli MP. (2007). Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. *Biochem Syst Ecol* 35, 1-10.

Almeida ALS, Albuquerque UP, Castro CC. (2011). Reproductive biology of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), a fructiferous endemic species in caatinga (dry forest), under distinct management conditions in Northeastern, Brazil. *Journal of Arid Environments*, 75, 330-337.

Anli RE, Vural N. (2009). Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules*, 14, 289-297.

Araújo EL, Castro CC, Albuquerque UP. (2007). Dynamics of Brazilian Caatinga: A review concerning plants environment and people. *Funcional Ecosystems and communities*, 1, 1, 15-28.

Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos AAS. (2007). *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Brasília, Brazil: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq.

Cabral DLV, Peixoto Sobrinho TJS, Amorim ELC, Albuquerque UP. (2010). Relationship of biometric parameters on the concentration of tannins in two medicinal plants a case study. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, 368-376.

Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. (2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 16(1), 251-280.

Cotelle N, Bernier J-L, Catteau J-P, Pommery J, Wallet J-C, Gaydou EM. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med*, 20, 35-43.

Fidelis, IDS. (2003). Crescimento, armazenamento, homeopatia, produção de metabólitos secundários e teste biológico do extrato de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski em coelhos diabéticos. Universidade Federal de Viçosa. Available: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/fitotecnia/2003/176815f.pdf>. Accessed on 10 September 2009.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2), 374-381.

Hagerman AE. (1987). Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J Chem Ecol*, 13(3), 437-448.

Hofer N, Alexou M, Heerdt C, Löw M, Werner H, Matyssek R, Rennenberg H, Haberer K. (2008). Seasonal differences and within-canopy variations of antioxidants in mature spruce (*Picea abies*) trees under elevated ozone in a free-air exposure system. *Environ Pollut*, 154, 241-253.

IPA. (2010). Instituto Agrônomo De Pernambuco. Available: [http://www.ipa.br/indice\\_pluv.php#calendario\\_indices](http://www.ipa.br/indice_pluv.php#calendario_indices). Accessed on 10 September 2009.

Jacobson TKB, Garcia J, Santos SC, Duarte JB, Farias JG, Kliemann HJ. (2005). Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 35, 163-169.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J-P, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem*, 47, 3954-3962.

Koricheva J, Larsson S, Haukioja E, Keinänen M. (1998). Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, 83(2), 212-226.

Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol Biochem*, 45, 244-249.

Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Compets Rendus Biologies* 331, 865-873.

Lavola A, Aphalo PJ, Lahti M, Julkunen-Tiitto R. 2003. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 49-60.

Lima VLAG, Melo EA, Maciel MIS, Silva GSB, Lima DES. (2004). Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). *Revista de Nutrição*, 17, 53-57.

Lins Neto EMF. (2008). *Usos tradicionais e manejo incipiente de Spondias tuberosa arruda. no semi-rido do Nordeste do Brasil*. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 100 p.

Lins Neto EMF, Peroni N, Albuquerque UP. (2010). Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): An Endemic Species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. *Economic Botany*, 64(1), 11-21.

Mccune LM, Johns T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J Ethnopharmacol*, 82, 197-205.

Mccune LM, Johns T. Antioxidant activity relates to plants part, life form and condition in some diabetes remedies. (2007). *J Ethnopharmacol*, 112, 461-469.

Monteiro JM, Lins Neto EMF, Araujo EL, Amorim ELC, Albuquerque U P. (2006). The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* and *Anadenanthera colubrina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 338-344.

- Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martinez V. (2006). Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96, 66–73.
- Peltonen PA, Vapaavuori E, Julkunen-tiitto R. (2005). Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. *Global Change Biology*, 11, 1305–1324.
- Ramirez MR, Geracitano L, Barros DM, Henriques AT. (2009). Efectos beneficiosos de extractos de frutas rojas y de sus antocianos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(6), 456 – 468.
- Sampaio EVSB. (2002). Uso das plantas da Caatinga. Pp. 4990. In: Sampaio EVSB, Giuliatti AM, Virgínio J, Gamarra-Rojas CFL. (orgs.). *Vegetação e flora da Caatinga*. Recife, Brazil: APNE /CNIP.
- Santos SC, Costa WF, Batista F, Santos LR, Ferri PH, Ferreira HD, Seraphin JC. (2006). Brazilian Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Journal of Pharmacognosy*, 16(4), 552-556.
- Siatka T, Kašparová M. (2010). Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers. *Molecules*, 15(12), 9450-9461.
- Sousa CMM, Rocha e Silva H, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), 351-355.
- Zhang S-J, Lin Y-M, Zhou H-C, Wei S-D, Lin G-H, Ye G.F. (2010). Antioxidant Tannins from Stem Bark and Fine Root of *Casuarina equisetifolia*. *Molecules*, 15(8), 5658-5670.
- Wieser G, Tegischer M, Tausz M, Haberle K-H, Grams TEE, Matyssek R. (2002). Age effects on Norway spruce (*Picea abies*) susceptibility to ozone uptake: a novel approach relating stress avoidance to defence. *Tree Physiol*, 22, 583–590.
- Wieser G, Hecke K, Tausz M, Häberle K-H, Grams TEE, Matyssek R. (2003). The influence of microclimate and tree age on the defense capacity of European beech (*Fagus sylvatica* L.) against oxidative stress. *Annals of Forest Science* 60, 131- 135.
- Wildi B, Lütz C. (1996). Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell Environ*, 19, 138–146.

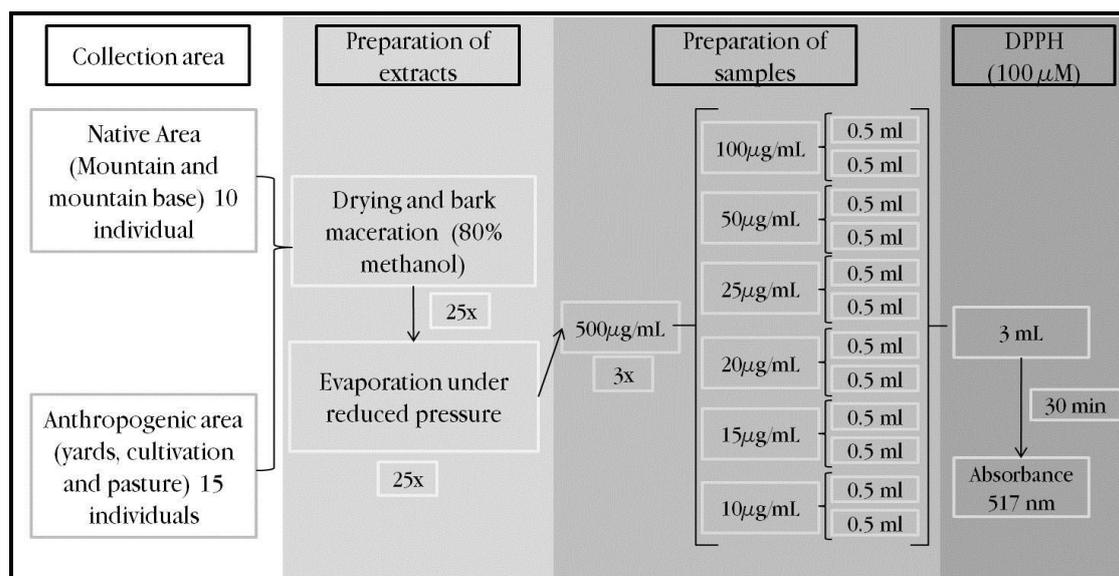


Figure 1- The experimental design of the measurements of the antioxidant activity *in vitro*, using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

Table 1 – The CE<sub>50</sub> of the antioxidant activity (expressed in µg/mL) and the tannin concentration (expressed as the percentage of *Spondias tuberosa* Arruda bark) collected in different landscape units of the Caatinga, Northeast Brazil.

Area	Unit		CE <sub>50</sub> (µg/mL)	CE 50 ascorbic acid (µg/mL)	Tannin concentration
ANTHROPOGENIC	Household	<b>Mean ± error</b>	<b>25.62 ± 1.19</b>	<b>22.16</b>	<b>5.17% ± 1.25</b>
	Cultivation	<b>Mean ± error</b>	<b>27.67 ± 1.17</b>	<b>21.13</b>	<b>2.95% ± 0.32</b>
	Pasture	<b>Mean ± error</b>	<b>27.93 ± 0.32</b>	<b>19.59</b>	<b>5.78% ± 1.32</b>
	<b>Overall mean ± error</b>		<b>27.07 ± 0.73</b>	<b>20.96 ± 0.75</b>	<b>4.64% ± 1.05</b>
NATIVE	Mountain área	<b>Mean ± error</b>	<b>34.93 ± 2.34</b>	<b>19.91</b>	<b>5.81% ± 0.93</b>
	Forest	<b>Mean ± error</b>	<b>29.28 ± 1.75</b>	<b>21.00</b>	<b>6.73% ± 0.63</b>
	<b>Overall mean ± error</b>		<b>32.10 ± 2.82</b>	<b>20.45 ± 0.54</b>	<b>6.27% ± 0.46</b>

## 7. CONCLUSÕES

## 7. Conclusões

Ambas as comunidades apesar de selecionarem plantas de modos diferentes, conhecem espécies com alta capacidade no sequestro de radicais livres.

A alta capacidade antioxidante pode ser devido ao consenso entre os informantes, em especial aos que moram próximos a área de Mata Atlântica devido aos valores obtidos pela análise antioxidante das plantas desta área terem sido correlacionados com os escores estabelecidos pela adaptação do índice de importância relativa (IR%).

Não foram observadas diferenças entre o conjunto de plantas analisados em relação a atividade antioxidante, sugerindo que os fatores ambientais que caracterizam os locais de coleta não interferem significativamente neste conjunto de plantas.

Os mecanismos de ação antioxidante destas plantas agem de modo não diretamente correlacionado, mostrando serem reciprocamente independentes.

A atividade antioxidante e as concentrações dos compostos fenólicos majoritários das cascas de *A. colubrina* variam durante o ano, apesar de haver diferença significativa entre alguns meses.

Os compostos fenólicos majoritários de *A. colubrina*, apenas um manteve-se estável durante o ano de estudo. As variações da atividade antioxidante e das concentrações dos compostos fenólicos majoritários não foram correlacionados aos índices pluviométricos, revelando que outro(s) estudo(s) que levem em consideração outros fatores ambientais deve(m) ser realizado(s).

Os compostos fenólicos analisados não estão associados com a boa atividade antioxidante de *A. colubrina*, contudo não quer dizer que tais compostos não têm função antioxidante. Sugere-se que ao analisar a atividade antioxidante de uma espécie a fim de correlacionar com a concentração de seus compostos fenólicos, deva-se coletar amostras de no mínimo dois períodos do ano, uma vez que tais compostos podem variar significativamente, podendo o estudo ter dados apenas pontuais de modo que não possa fazer generalizações caso use apenas uma data de coleta.

Os locais de coleta não interferem nos teores de taninos de *S. tuberosa*, para as áreas estudadas, porém estes mesmos fatores são responsáveis pela diferença na atividade

antioxidante. Uma vez que a variação do poder antioxidante das cascas de *S. tuberosa* não foi acompanhada pelos teores de taninos, esta variação relaciona-se com a presença de outro(s) metabólito(s) cuja produção provavelmente é mais sensível a diferentes condições de habitats. Contudo torna-se difícil identificar que ou quais fatores interferem nestas modificações visto que o material vegetal foi coletado em ambiente natural não podendo separar a influência multifatorial do ambiente.

## 8. REFERÊNCIAS

## 8. Referências

- Agra, M.F., Baracho, G.S., Nurit, K., Basílio, I.J.L.D., Coelho, V.P.M. (2007). Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 111, pp. 383–395.
- Akerreta, S., Cavero, R. Y., López, V., Calvo, M. I. (2007). Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 3(16).
- Albuquerque, U. P. (2006). Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2, 1-10.
- Albuquerque, U. P., Medeiros, P. M., Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Lins Neto, E. M. F., Melo, J. G., Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114(3), 325-54.
- Almeida, C. F. C. B. R., Amorim, E. L. C., Albuquerque, U. P., Maia, M. B. S.. (2006). Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2(15).
- Begossi, A., Hanazaki, N., Tamashiro, J. Y. (2002). Medicinal Plants in the Atlantic Forest (Brazil): Knowledge, use, and conservation. **Human Ecology**, 30(3).
- Bianchi, M. L. P., Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, 12(2), 123-130.
- Botes, L., Westhuizen, F.H., Loots D.T. (2008). Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of Two *Aloe greatheadii* var. *davyana* Extracts. **Molecules** 13, 2169-2180.
- Boudet, A.-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, 68, 2722–2735.
- Bulbovas, P., Rinaldi, M. C. S., Delitti, W. B. C., Domingos, M. (2005). Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, 28(4), 687-696.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México **Journal of Ethnopharmacology**, 97, 429-439.
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1996). **Radicaes livres em medicina**. Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, 260p.
- Chiang, Y.M., Chuang, D.Y., Wang, S.Y., Kuo, Y.H., Tsai, P.W., Shyur, L. F. (2004). Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, 95, 409–419.

- Chludil, H. D., Corbino, G. B., Leicach, S. R. (2008). Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. **Journal. Agricultural and Food Chemical**, 56, 5050–5056.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., Kim, S. K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, 163, 1161-1168.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montagu, M. V., Inzé, D., Breusegem, F. V. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, 57, 779–795.
- Desmarchelier, C., Lisboa Romão, R., Coussio, J., Ciccía, G., (1999). Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 67, 69–77.
- Di Stasi, L. C., Oliveira, G. P., Carvalhaes, M. A., Queiroz-Junior, M., Tien, O. S., Kakinami, S.H., Reis M. S. (2002). Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia** 73, 69-91,
- Dias, A. P. S., Pina, J. M., Rinaldi, M. C. S., Moraes, R. M. (2007). Atividade de antioxidantes em folhas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ em diferentes estágios de maturação expostas ao ozônio. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(2), 15-17.
- Esterbauer, H., Wäg, G., Puhl, H. (1996). Peroxidação lipídica e seu papel na aterosclerose. In: Cheeseman, K. H., Slater, T. F., **Radicais livres em medicina**. Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, 87-96.
- Falodun, A., Okunrobo, L.O.,Uzoamaka N. (2006). Phytochemical screening and anti-inflammatory evaluation of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (Euphorbiaceae). **African Journal of Biotechnology**, 5(6).
- Ferreira, A.L.A., Matsubara L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica Brasil**, 43(1),61-8.
- Gamble, P. E., Burke, J. J. (1984). Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System: I. Alterations in glutathione reductase activity. **Plant Physiology**, 76, 615-621.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30 (2), 374-381.
- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C., Borin, M.R.M. (1996). Biodiversidade – um enfoque químico-biológico. Editora UFRJ, Rio de Janeiro.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of ‘Rasayana’ herbs of Ayurveda. **Journal of Ethnopharmacology**, 99, 165–178.
- Havaux, M., (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends in Plant Science**, 3, 147–151.

- Hanazaki, N., Souza, V. C., Rodrigues, R. R. (2006). Ethnobotany of rural people from the boundaries of Carlos Botelho State Park, São Paulo State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 20(4), 899-909.
- Jaleel, C. A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inés, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plant**, 31, 427-436.
- Khafagi, I. K., Dewedar A. (2000). The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, 71, 365-376.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. E Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, 47(10), 3954-3962.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui A., Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. **Comptes Rendus Biologies**, 331, 865-873.
- Kumari A., Kakkar P. (2008). Biomedical and Screening of Antioxidant Potential of Selected Barks of Indian Medicinal Plants by Multiple in vitro Assays. **Environmental Sciences** 21, 24-29.
- Lee, S., Jung, S. H., Lee, Y.S., Yamada, M., Kim, B.-K., Ohuchi, K., Shin, K.H. (2004). Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. **Archives of Pharmacal Research**, 27(6), 628-632.
- López, F. A. T., Mondragón, L. V., Hernández, G. P. (2006). Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? **Archivos de Cardiología de Mexico**, 76 (04), 33-45.
- Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L., Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants. In: Imperato F. (Ed.) **Phytochemistry: Advances in Research**. Research Signpost. Kerala, India, 105-135.
- Martini, N.D., Katerere, D.R.P., Eloff, J.N. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 93, 207-21.
- Matsubara, L.S., Ferreira, A.L.A, Tornero, M.T.T., Machado, P.E.A. (1992). Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. **Brazilian Journal Medicinal Biology Research**, 25, 331-5.
- Mccune, L. M., Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. **Journal Ethnopharmacology**, 82, 197-205.
- Mccune, L. M., Johns, T. (2007). Antioxidant activity relates to plants part, life form and condition in some diabetes remedies. **Journal Ethnopharmacology**, 112, 461-469.

- Monteiro J. M., Albuquerque U. P., Lins Neto E. M. F., Araujo E. L., Amorim E. L. C. (2006a). Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, 105, 173-186.
- Monteiro, J. M., Lins Neto, E. M. F., Araujo, E. L., Amorim, E. L. C., Albuquerque, U. P. (2006b). The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* and *Anadenanthera colubrina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, 338-344.
- Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C., Martinez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. **Food Chemistry**, 96, 66-73.
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurs, R.D., Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53, 1237-1247.
- Oh, M.-M., Trick, H. N., Rajashek, C.B. (2009). Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal of Plant Physiology**, 166, 180-191.
- Olszewer, E. 1995. **Radicais livres em medicina**. 2ed. São Paulo 204p.
- Pastene, E. R. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 8 (6).
- Peltonen, P., Vapaavuori, E., Julkunen-Tiitto, R., (2005). Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. **Global Change Biology**, 11, 1305-1324.
- Pereira, R.C., Oliveira, M.T.R., Lemos, G.C.S. (2004). Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 14(01), 37-40.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A., Andrade, P.B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, 14, 2202-2211
- Pinto, E. P. P., Amorozo, M. C. M., Furlan, A. (2006). Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré, BA, Brasil **Acta Botanica Brasilica**, 20(4), 751-762.
- Pilarski, R., Zielinski, H., Ciesiolka, D., Gulewicz, K. (2006). Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, 104, 18-23.
- Polle A., Rennenberg H. (1992). Field studies on Norway spruce trees at high altitudes: II. Defence systems against oxidative stress in needles. **New Phytologist**, 121, 635-642.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L. (2004). Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 79, 560-564.

- Ruan Z. P, Zhang L.L., Lin, Y.M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves. **Molecules**, 13, 2545-2556.
- Rufino M.S.M., Alves R.E., Brito E.S., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., Mancini-Filho J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry** 121, 996-1002.
- Santos, S.C., Costa, W.F., Batista, F., Santos, L.R., Ferri, P. H, Ferreira, H.D., Seraphin, J.C. (2006). Brazilian Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Journal of Pharmacognosy**, 16(4), 552-556.
- Scott, M.D., Lubin, B.H., Zuo, L., Kuypers, F.A. 1991. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **Journal Laboratory Clinical Medical**, 118(1), 7-16.
- Severino, J. F., Stich, K., Soja, G. (2007). Ozone estresse and antioxidant substances in *Trifolium repens* and *Centaurea jacea* leaves. **Environmental Pollution**, 146, 707-714.
- Siatka, T., Kašparová, M. (2010). Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers. **Molecules**, 15(12), 9450-9461.
- Silva, A. C. O., Albuquerque, U. P. (2005). Woody medicinal plants of the Caatinga in the state of pernambuco (Northeast Brazil): floristic and ethnobotanical aspects. **Acta Botanica Brasilica**, 19(01), 17-26.
- Silva, A. J. R., Andrade, L. H. C. (2005). Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 19(1), 45-60.
- Silva, F. G., Oliveira, C. B. A., Pinto, J. E. B., Nascimento, P. V. E., Santos, S.C., Seraphind, J. C., Ferri, P. H. (2007). Seasonal Variability in the Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera*. **Journal Brazilian Chemistry Society**, 18 (5).
- Srinivasan, R., Chandrasekar, M.J.N., Nanjan, M.J., Suresh, B. (2007). Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal of Ethnopharmacology**, 113, 284-291.
- Sligh D.F., Ueda H., Arvigo R., Balick M.J. (1999). Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, 66, 159-165.
- Ślesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Miszalski Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica polonica**, 54 (1), 39-50.
- Velloso, J. C. R., Khalil, N. M., Formenton, V. A. F., Ximenes, V. F., Fonseca, L. M., Furlan, M., Brunetti, I. L., Oliveira, O. M. M. F. (2006). Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, 77, 243-244.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, 61, 199-223.

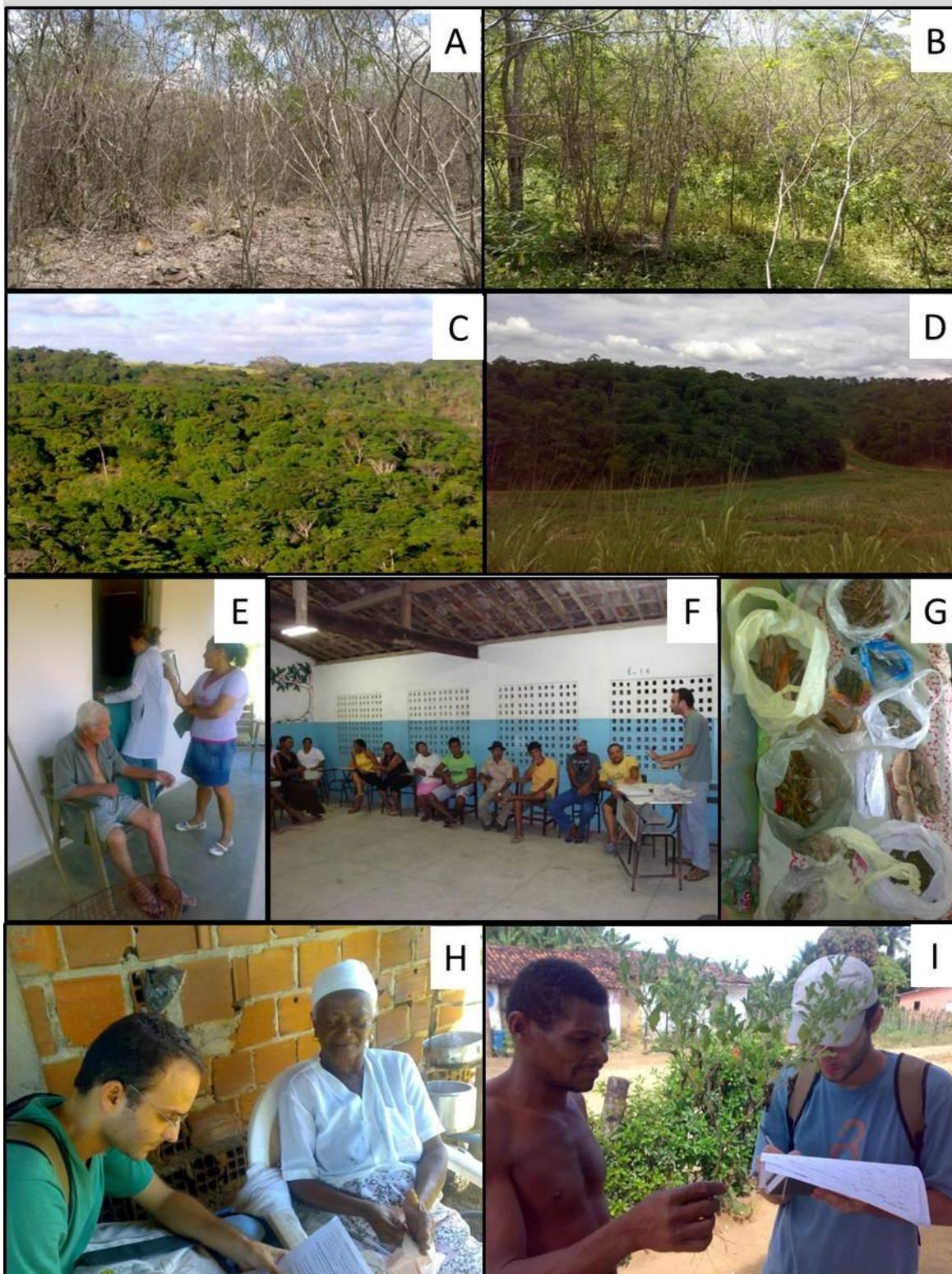
Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, 218, 1–14.

Zhou, R., Zhao, H. (2004). Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in alpine habitat, related to freezing tolerance. **Physiologia Plantarum**, 121, 399-408.

# Apêndice A

Imagens durante o desenvolvimento do  
trabalho

### ÁREAS DE TRABALHO E COLETA DE DADOS



**A e B** – Fragmento de Caatinga em período seco e chuvoso respectivamente; **C e D** – Fragmento de Mata Atlântica mostrando área usada na plantação de cana-de açúcar; **E** – Visita com agentes de saúde; **F** – Reunião com moradores antes do início do trabalho; **G** – Material vegetal armazenado em casa pelo entrevistado; **H** – Entrevista utilizando técnica de lista livre; **I** – Técnica de checklist-entrevista.



**J** – Coleta de cascas de *Spondias tuberosa*; **K e L** – Coleta sazonal das cascas de *Anadenanthera colubrina*; **M** – Coleta do material vegetal no Fragmento de Mata Atlântica; **N e O** – Análise pelo método de DPPH; **P, Q e R** – Análise de compostos fenólicos em CLAE; **S, T e U** – Análise de taninos pelo método de difusão radial.

# Apêndice B

## Termo de consentimento

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do Projeto: **A atividade antioxidante de plantas medicinais da Caatinga e da Mata Atlântica pode ser explicada por aspectos ecológicos e culturais?**

Orientador: Ulysses Paulino Albuquerque

Pesquisador: Thiago Antônio de Sousa Araújo

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife-PE. Fone: (81) 3320 6350

O estudo de que você está prestes a participar é parte de uma série de estudos sobre o conhecimento que você tem e o uso que você faz das plantas de sua região seja para alimentação, construção, lenha, medicinal ou qualquer outra utilidade, e não visa nenhum benefício econômico para os pesquisadores ou qualquer outra pessoa ou instituição. É um estudo amplo, que tem vários participantes, sendo coordenado pelo Laboratório de Etnobotânica Aplicada da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O estudo emprega técnicas de entrevistas e conversas informais, bem como observações diretas, sem riscos de causar prejuízo físicos, sendo o maior risco o de você sentir-se constrangido. Caso você concorde em tomar parte neste estudo, será convidado(a) a participar de várias tarefas, como entrevistas, listar as plantas que você conhece e usa da região, ajudar os pesquisadores a coletar essas plantas, mostrar, se for o caso, como você as usa no seu dia a dia. Todos os dados coletados com a sua participação serão organizados de modo a proteger a sua identidade. Concluído o estudo não haverá maneira de relacionar seu nome com as informações que você nos forneceu. Qualquer informação sobre os resultados do estudo lhe será fornecida quando este estiver concluído. Com base nas informações oferecidas, será possível, no futuro, o desenvolvimento de ações que visem melhorar sua qualidade de vida e das demais pessoas da comunidade. Você tem total liberdade para se retirar do estudo a qualquer momento. Caso concorde em participar, assine, por favor, seu nome abaixo, indicando que leu e compreendeu a natureza do estudo e que todas as suas dúvidas foram esclarecidas.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou impressão dactiloscópica:

Nome:

Endereço:

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Testemunhas

\_\_\_\_\_

# Anexo

Aprovação da pesquisa pelo CEP – UFPE  
/SISNEP

Andamento do projeto - CAAE - 0023.0.172.000-09					
<b>Título do Projeto de Pesquisa</b>					
A atividade antioxidante de plantas medicinais da Caatinga e da Mata Atlântica pode ser explicada por aspectos ecológicos e culturais?					
<b>Situação</b>	<b>Data Inicial no CEP</b>	<b>Data Final no CEP</b>	<b>Data Inicial na CONEP</b>	<b>Data Final na CONEP</b>	
Aprovado no CEP	19/02/2009 12:08:15	17/04/2009 08:59:10			
<b>Descrição</b>	<b>Data</b>	<b>Documento</b>	<b>Nº do Doc</b>	<b>Origem</b>	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	02/02/2009 11:26:13	Folha de Rosto	FR241043	Pesquisador	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	19/02/2009 12:08:15	Folha de Rosto	0023.0.172.000-09	CEP	
4 - Protocolo Aprovado no CEP	17/04/2009 08:59:10	Folha de Rosto	023/09	CEP	
3 - Protocolo Pendente no CEP	03/04/2009 14:44:51	Folha de Rosto	023/09	CEP	

[Voltar](#)