

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

AMANDA DIAS DE ARAÚJO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO
UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa* ARRUDA/ANACARDIACEAE)**

Recife

2016

AMANDA DIAS DE ARAÚJO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO
UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa* ARRUDA/ANACARDIACEAE)**

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^a ^o. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Recife

2016

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Araújo, Amanda Dias de

Estudo fitoquímico e avaliação do potencial bioativo do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda/Anacardiaceae) / Amanda Dias de Araújo. – 2016.

105 f. : il.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2016.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais 2. Caatinga 3. Umbuzeiro (Planta) I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 207

AMANDA DIAS DE ARAÚJO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO
UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa* ARRUDA/ANACARDIACEAE)**

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 01/12/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Alexandre Gomes da Silva (Examinador Externo)
Instituto Nacional do Semiárido

Prof^a. Dr^a. Carolina Barbosa Malafaia (Examinador Externo)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Dedico aos amores da minha vida: Meus pais Francisca e Floriano, por todo amor, incentivo e carinho! Em especial a minha florzinha, minha amada e inesquecível sobrinha Luana (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me dar saúde e força e por sempre atender minhas orações em busca da sabedoria, coragem e serenidade, e a Nossa Senhora por sempre interceder por mim.

Aos meus amados pais Francisca e Floriano, pelas orações, pelos seus ensinamentos, princípios éticos, exemplos de caráter, dedicação e amor.

Às minhas irmãs queridas que sempre torcem por mim, pelo carinho, por estarem sempre ao meu lado e aos meus sobrinhos que me distraem e me dão tanta alegria.

A meu companheiro Paulo, pelo amor, pelo carinho e por estar ao meu lado nesse momento tão especial.

À minha Orientadora Maria Tereza dos Santos Correia por ter aceito me orientar, pela amizade, por toda confiança depositada nesse trabalho, pelos conselhos, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pelo apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases para conclusão desse trabalho.

À minha Coorientadora Márcia Vanusa da Silva pela dedicação, amizade e confiança, pela energia desprendida para superar as adversidades, pelos conselhos, por compartilhar com tanta simplicidade um pouco de sua experiência valiosa e por estar sempre disponível durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Nicácio pelo carinho, amizade e ensinamentos imprescindíveis.

Ao Sr. João pela ajuda valiosíssima e pela amizade.

Aos funcionários Djalma e Miron pela atenção e colaboração, sempre disposto a nos ajudar e pela amizade.

Ao Professor Oleg, que onde estiver estará torcendo por mim.

Aos Doutores da Banca por terem aceitado estar presentes na Defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Aos meus amigos que mesmo na distância do dia a dia estão sempre presentes.

Aos amigos e colegas do Doutorado que sempre faziam de nossos encontros estímulos para continuarmos a luta.

Aos amigos “mestres dos magos”, pela grande amizade e força compartilhada.
A todos do Laboratório de Produtos Naturais, pela amizade, carinho e incentivo.
Aos colegas do Laboratório de Lipídeos por toda amizade e ajuda imprescindível. E especial a minha amiga irmã Thaíse.

Aos meus queridos professores da UFPE, pois sempre me incentivaram a fazer uma Pós-Graduação.

Ao Departamento de Bioquímica por disponibilizar sua infraestrutura.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial à Coordenação e aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pelo esforço e dedicação para o sucesso do programa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e incentivaram para que eu alcançasse o tão sonhado objetivo.

Muito obrigada!

“Ser homem é ser responsável. É sentir que colabora na construção do mundo.
Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.
Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”

SAINT-EXUPÉRY, 1943, p. 34

RESUMO

Nas últimas décadas tem-se verificado avanços significativos envolvendo estudos fitoquímicos e farmacológicos de plantas medicinais. *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), conhecida por “umbu” ou “imbu” é uma planta endêmica da Caatinga utilizada no tratamento de diversas patologias. O presente estudo investigou o perfil fitoquímico (métodos espectrofotométricos, CCD e HPLC), atividades antioxidantes (ABTS, DPPH e fosfomolibdênio), fotoprotetora e hemolítica de extratos metanólicos e acetato de etila dos frutos, folhas e ramos e atividade gastroprotetora *in vivo* do extrato metanólico dos ramos (EMR) utilizando o ensaio de toxicidade aguda e o efeito gastroprotetor contra lesões induzidas por etanol em camundongos Swiss. Os resultados mostraram que EMR apresentou as maiores quantidades de compostos fenólicos ($193,95 \pm 0,01$), flavonoides ($21,61 \pm 0,7$) e taninos ($87,110 \pm 1,5$). O perfil fitoquímico mostrou: (CCD: presença de flavonoides heterosídeos, derivados cinâmicos, triterpenos, esteroides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. HPLC: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido t-ferúlico). Nos ensaios antioxidantes o EMR também apresentou a maior atividade. Para ABTS apresentou porcentagem de inibição do radical livre de $78,05 \pm 0,99$ a $97,33 \pm 0,42$ % após 120 min, equivalentes a TEAC de $1678,89 \pm 24,11$ a $2145,56 \pm 10,18$ μ M trolox. Para o ensaio de DPPH apresentou: $90,29 \pm 0,22$ % de sequestro do radical DPPH e para fosfomolibdênio apresentou uma capacidade antioxidante total de $34,984 \pm 0,06$ %. Na atividade fotoprotetora o extrato de acetato de etila dos ramos apresentou maior fator de proteção solar ($15,50 \pm 0,41$). No teste de toxicidade aguda não houve sinais de intoxicação e nem alterações fisiológicas quanto a ingestão do EMR. Na atividade gastroprotetora os grupos pré-tratados com lansoprazol (30 mg, controle positivo) e o EMR nas doses de 50, 100 e 200 mg / kg protegeram a mucosa gástrica em 73,82%, 73,74%, 72,02% e 72,4%, respectivamente, quando comparados ao grupo pré-tratado com solução de NaCl 0,9% (controle negativo). Os resultados obtidos indicam que o umbuzeiro é fonte de compostos bioativos, sendo promissor em estudos de novos agentes antioxidantes, fotoprotetores e gastroprotetores naturais, servindo de base para o desenvolvimento de novos medicamentos com possível aplicação na prevenção e no tratamento de diversas doenças.

Palavras-chave: Umbuzeiro. Plantas medicinais. Caatinga. Antioxidantes.

ABSTRACT

In recent decades there has been significant progress involving phytochemicals and pharmacological studies of medicinal plants. *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), known as "umbu" and "imbuls" an endemic plant Caatinga used in the treatment of various diseases. This study investigated the phytochemical profile (spectrophotometric methods, TLC and HPLC) and antioxidant (ABTS, DPPH and phosphomolybdenum), photoprotective and hemolytic activities of methanol and ethyl acetate extracts of the fruits, leaves and branches and gastroprotective activity *in vivo* of methanol extracts of branches (MEB) using acute toxicity and the evaluation of the gastroprotective effect out against lesions induced by ethanol in Swiss mice. The results showed that the MEB presented the highest quantities of phenolic compounds (193.95 ± 0.01), flavonoids (21.61 ± 0.7) and tannins (87.110 ± 1.5). The phytochemical profile showed: (TLC: flavonoids, cinnamic derivatives, triterpenes and steroids and condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins. HPLC: gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid-t). In the antioxidant assay the MEB showed highest activities, for ABTS showed inhibition percentage of free radical of 78.05 ± 0.99 to $97.33 \pm 0.42\%$ after 120 min, equivalent to TEAC of 1678.89 ± 24.11 to 2145.56 ± 10.18 μM Trolox. For the DPPH assay showed: 90.29 ± 0.22 % of scavenging DPPH and for phosphomolybdenum showed the total antioxidant capacity of 34.984 ± 0.06 %. For photoprotective activity, the ethyl acetate extract of the branches had higher sun protection factor (15.50 ± 0.41). In acute toxicity test there was not signs of intoxication and or physiological changes. In gastroprotective activity, the group treated with lansoprazole (30 mg, positive control) and the MEB in doses of 50, 100 and 200 mg/kg protected the gastric mucosa in 73.82%, 73.74%, 72.02% and 72.4%, respectively, when compared to the group pre-treated with NaCl 0.9%(negative control). The results indicate that the umbuzeiro is a source of bioactive compounds, being is promising in studies of the new antioxidants, sunscreens and natural gastroprotective, serving as a base for the development of new drugs with potential application in the prevention and treatment of various diseases.

Keywords: Umbuzeiro. Medicinal plants. Caatinga. Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 -	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda.....	26
Figura 2 -	Classificação dos antioxidantes.....	32

Artigo 1

Figura 1 -	Effect of the incubation time on antioxidant activity of <i>S. tuberosa</i> leaves extracts in ABTS assay.....	49
------------	--	----

Artigo 3

Figura 1 -	Effect of the incubation time on antioxidant activity of MEB of <i>S. tuberosa</i>	80
Figura 2 -	Effect of the orally pretreatment of MEB of <i>Spondias tuberosa</i> gastric lesions induced by ethanol in mice. The results are expressed as the mean $\pm$ d.p. ANOVA followed by Dunnet test, *** $p < 0.001$ (n=6).....	82

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 -	Espécies reativas de oxigênio (ROS)	31
Tabela 2 -	Causas envolvidas na lesão da mucosa gástrica induzida por etanol.....	39
Tabela 3 -	Fármacos utilizados no tratamento de úlceras e seus respectivos mecanismo de ação.....	39

Artigo 1

Tabela 1 -	Phytochemical profile of the methanolic and ethyl acetate extracts of the <i>S. tuberosa</i> leaves.....	47
Tabela 2 -	Total phenolic and flavonoids compounds quantification from <i>S. tuberosa</i> leaves extracts. Mean $\pm$ SD (n=3).....	48
Tabela 3 -	Antioxidant activity of methanolic extract of <i>S. tuberosa</i> leaves in different concentrations. Gallic acid was used as standard. Mean $\pm$ SD (n=3)	49

Artigo 2

Tabela 1 -	Phytochemical profile of the ethyl acetate fruits and branches extracts of the <i>S. tuberosa</i> leaves.....	63
Tabela 2 -	Total phenolic content (TPC), total flavonoid (TF) DPPH, ABTS and TAA of extracts from <i>Spondias tuberosa</i> . Mean $\pm$ SD (n = 3).....	64
Tabela 3 -	Major phenolic compounds identified in ethyl acetate extract of <i>S. tuberosa</i> by HPLC.....	66

Artigo 3

Tabela 1 -	Determination of the compounds in methanolic extract of	
------------	---	--

	branches (MEB) of <i>S. tuberosa</i>	78
Tabela 2 -	Compounds identified in MEB of <i>S. tuberosa</i> by HPLC	79
Tabela 3 -	Antioxidant Activity by DPPH in different concentrations.	
	Average $\pm$ S.D. (n = 3)	80

LISTA DE ABREVIações

ABTS	- 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid
AcOEt	- Acetato de Etila
AlCl ₃	- Aluminium chloride
AscAE	- ascorbic acid equivalente
AINES	- Anti-inflamatórios não-esteroides
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
ATP	- Adenosina trifosfato
CCD	- Cromatografia em camada delgada
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DPPH	- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAE	- Ethyl acetate Extract
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
FPS	- Fator de proteção solar
RFS	- Free radical scavenging
GAE	- Gallic acid equivalent
IBP	- Inibidores de bomba de prótons
HPLC	- High-performance Liquid Chromatography
<i>H. pylori</i>	- <i>Helicobacter pylori</i>
MEB	- Methanol extract the branches
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PGs	- Prostaglandinas
PNPMF	- Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas
QE	- Quercetin equivalent
RL	- Radicais livres
ROS	- Reactive oxygen species
RSA	- Radical reduction activity
SUS	- Sistema Único de Saúde
TAC	- Total antioxidant capacity
TAA	- Total activity antioxidant

TGI	- Trato gastrointestinal
TROLOX	- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TEAC	- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TLC	- Thin Layer Chromatography
UVA	- Ultravioleta A
UVB	- Ultravioleta B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	19
1.2	HIPÓTESE.....	19
1.3	OBJETIVOS.....	19
1.3.1	Objetivo Geral.....	20
1.3.2	Objetivos Específicos.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	21
2.2	CAATINGA E SUA DIVERSIDADE.....	23
2.3	<i>Spondias tuberosa</i> ARRUDA	25
2.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	28
2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
2.5.1	Fosfomolibdênio.....	34
2.5.2	Dpph.....	34
2.5.3	Abts.....	35
2.5.4	Antioxidantes como Fotoprotetores.....	35
2.6	ÚLCERAS PÉPTICAS.....	36
2.6.1	Modelo de Indução de Úlceras por Etanol.....	38
2.6.2	Tratamento.....	49
3	RESULTADOS.....	41
3.1	ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF <i>Spondias tuberosa</i> ARRUDA LEAVES EXTRACTS) LEAF EXTRACT.....	41
3.2	PHYTOCHEMICAL SCREENING, <i>IN VITRO</i> ANTIOXIDANT, HEMOLYTIC AND PHOTOPROTECTIVE ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM <i>Spondias tuberosa</i> ARRUDA.....	56
3.3	ANTIOXIDANT ACTIVITY AND EVALUATION OF THE GASTROPROTECTIVE EFFECT <i>IN VIVO</i> OF METHANOLIC EXTRACTS OF THE BRANCHES OF <i>Spondias tuberosa</i>	

	ARRUDA.....	71
4	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	105

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como recurso terapêutico vem sendo descrito ao longo da história da humanidade. O Brasil possui uma grande diversidade vegetal, contando com aproximadamente 46 mil espécies distribuídas em seus biomas, porém apenas 17% dessas espécies são exploradas para pesquisas de compostos biologicamente ativos (POLITI; PIETRO; MOREIRA, 2009; RODRIGUES et al., 2013).

Dentre os ecossistemas do Brasil está a Caatinga, uma das maiores e mais distintas formações vegetacionais exclusivamente brasileira, com grande parte do patrimônio biológico dessa região não sendo encontrada em nenhum outro lugar do mundo. Os resultados do censo demográfico realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), revelaram que a população residente no Semiárido brasileiro alcançou a marca de 22.598.318 habitantes em 2010, totalizando uma extensão territorial de 980.133,079 km, incluindo partes dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Maranhão, Sergipe e Alagoas (MEDEIROS, 2012).

Segundo Forzza et al. (2013) são listadas para o domínio fitogeográfico da Caatinga 4.482 espécies alocadas em 1.133 gêneros e 159 famílias. Dentre as plantas que se destacam nessa formação vegetacional está *Spondias tuberosa*, conhecida popularmente como umbuzeiro ou imbuzeiro. O umbuzeiro é uma planta endêmica da região Semiárida brasileira, adaptada a sobreviver e produzir flores e frutos sob condição de estresse hídrico (NADIA et al., 2011). Além disso desempenha um papel em destaque no Nordeste do Brasil como um importante recurso nutricional (OMENA et al., 2012) de grande importância social, econômica e cultural (BARRETO, 2007).

Segundo Gomes et al. (2010) o “umbu”, o fruto do umbuzeiro, é uma fonte de renda para as famílias dos agricultores da região Semiárida do Nordeste. O extrativismo do umbu é a maneira mais tradicional de sua exploração, sendo os principais estados produtores: Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Piauí e Paraíba. Cerca de 50% da produção do umbu é destinada à produção de polpa, geleias e doces, porém 40% da produção não é aproveitada. O umbu e seus derivados são ricos em compostos antioxidantes, sendo considerados fontes de carotenoides, ácido ascórbico, compostos fenólicos, dentre outros (BORGES et al., 2007). A espécie

também é bastante utilizada como antimicrobiana e anti-inflamatórias, merecendo maiores estudos sobre a comprovação de suas atividades biológicas. E Através do desenvolvimento da ciência e tecnologia, as plantas medicinais estão sendo valorizadas quanto ao seu potencial terapêutico, não só na área da pesquisa, mas também se tornou crescente o seu uso recomendado pelos profissionais da saúde. (CARREIRA, 2010).

Muitas propriedades terapêuticas das plantas são relatadas pela população, que são posteriormente confirmadas, em sua maioria nos estudos farmacológicos, comprovando assim a importância da pesquisa etnofarmacológica. Tais propriedades propiciaram a descoberta de diversos princípios ativos e o desenvolvimento de vários medicamentos, entre eles a procaína, cloroquina ou ainda fármacos como vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) e o taxol (Taxol®) (MACIEL et al., 2002; HOSTETTMANN et al., 2003). A maioria dos princípios ativos de importância farmacológica encontrada nos extratos vegetais, de modo geral, é oriunda de uma variedade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas (FERREIRA; PINTO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que os países devem usar os recursos naturais disponíveis no próprio território para promover a atenção primária à saúde e contribuir para o uso sustentável da biodiversidade nacional. Desta forma, a OMS reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, devido ao seu custo diminuído (SANTOS et al., 2012).

A busca de recursos vegetais na Caatinga como fonte de novas moléculas bioativas visa o desenvolvimento biotecnológico da região do Nordeste. Neste contexto, pesquisas direcionadas a investigar os compostos químicos e avaliar o potencial bioativo de plantas tornam-se oportunos de forma que os resultados possam contribuir com o arsenal terapêutico do Bioma servindo como alternativas para o tratamento de doenças de forma eficaz, natural e de baixo custo para população.

1.1 JUSTIFICATIVA

Atualmente vários grupos de pesquisadores orientados pelo uso popular das espécies nativas estudam as atividades biológicas de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo. Considerando-se a necessidade da busca de novos compostos biologicamente ativos e os promissores resultados mencionados pela sabedoria popular sobre *Spondias tuberosa* Arruda, torna-se relevante estudar seu perfil fitoquímico e avaliar sua atividade antioxidante, fotoprotetora e gastoprotetora. Além disso, a busca de material na Caatinga como fonte de novas moléculas bioativas visa o desenvolvimento biotecnológico da Região Nordeste.

1.2 HIPÓTESE

Spondias tuberosa Arruda é bastante utilizada na medicina popular para diversas patologias necessitando de comprovação científica para tais usos. A planta seria antioxidante, fotoprotetora e gastoprotetora. Assim, pretendemos com o projeto agregar valor ao rico potencial farmacológico da Caatinga e obter conhecimento sobre a riqueza dos compostos extraídos da espécie.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Esse estudo tem como objetivo geral o realizar o estudo fitoquímico e avaliar o potencial bioativo de extratos de *Spondias tuberosa* Arruda.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Obter os extratos acetato de etila e metanólicos de diferentes tecidos da planta;
- Realizar *screening* fitoquímico;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos acetato de etila e metanólicos das folhas frutos e ramos;

- Avaliar atividade hemolítica dos extratos acetato de etila e metanólicos das folhas frutos e ramos;
- Avaliar o efeito fotoprotetor dos extratos acetato de etila e metanólicos das folhas frutos e ramos;
- Avaliar a atividade gastroprotetora *in vivo* do extrato metanólico dos ramos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Durante milênios o homem aprofundou seus conhecimentos empiricamente a fim de melhorar sua alimentação e tratar de suas enfermidades, criando uma inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução (SANTOS, 2008). A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas, talvez, tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Para utilizarem as plantas como medicamentos, os povos antigos usavam de suas próprias experiências e da observação do uso das plantas pelos animais (OLIVEIRA, 2006).

Entre 1880 e 1900 foi desenvolvido o primeiro medicamento sintético, as antipirinas, seguidas pela antifebrina e pela aspirina. Após a II Guerra Mundial, as pesquisas com ervas medicinais foram um pouco esquecidas devido ao grande avanço dos fármacos sintéticos, (FRANCESCHINI FILHO, 2004). Sendo retomadas nos dias atuais (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010). No período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados no Annual Reports of Medicinal Chemistry, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e 9 eram oriundos de produtos naturais (SILVEIRA et al., 2009).

No Brasil, tanto nas zonas rurais como nas grandes cidades as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (CALDERON et al., 2009).

A grande biodiversidade da flora brasileira gera grande potencial terapêutico e leva a um significativo consumo de fitoterápicos e preparações extraídas de plantas que, através do conhecimento tradicional e tecnológico, podem ser validadas cientificamente. Este imenso patrimônio genético encontrado no Brasil tem, na atualidade, um valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades (BRASIL, 2006), mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade, uma vez que existem inúmeros medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações

dos países em desenvolvimento, devido ao seu custo diminuído (SANTOS et al., 2012).

Muitas comunidades rurais dependem quase exclusivamente de plantas medicinais para o tratamento de doenças, e a população urbana começa a retornar para remédios de plantas medicinais, devido aos medicamentos convencionais possuírem custos mais elevados (DERWICH et al., 2011; BOULANOUAR et al., 2013).

Conforme a Resolução da Diretoria Colegiada. RDC nº 14, de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápicos são aqueles medicamentos preparados a partir de plantas ou partes de plantas medicinais que possuem propriedades reconhecidas de cura, diagnóstico, prevenção ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase três.

O aumento do consumo de plantas medicinais nas últimas décadas foi devido a muitas pessoas acreditarem que esses produtos seriam “naturais”, ou seja, não apresentariam “produtos químicos” passando a ser sinônimos de produtos saudáveis, seguros e benéficos à saúde. (VIEIRA et al. 2010). Segundo a ANVISA (2008), uma das grandes preocupações com o uso de plantas medicinais como forma de tratamento ou cura é o seu uso indiscriminado e sem comprovação científica. E todos os medicamentos à base de vegetais assim como qualquer outro medicamento podem causar reações adversas e até mesmo problemas mais sérios de saúde. (VEIGA JÚNIOR, 2008). Então, para se obter compostos bioativos seguros a partir de materiais vegetais é necessário realiza: extração, triagem farmacológica, isolamento, caracterização e avaliação toxicológica e biológica (SASIDHARAN et al., 2011).

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto, ou seja, para cada parte a ser usada, para cada grupo de princípio ativo a ser extraído e para cada doença a ser tratada, existe forma de preparo e uso adequados (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005). E partes da planta como raiz, caule, folha podem fornecer substâncias ativas que serão empregadas na obtenção de um medicamento (ROSA et al., 2012).

O avanço de pesquisas com produtos naturais ocorrido na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, embora ainda falem estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas

(VIEIRA et al., 2010).

Por meio do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais, onde as ações decorrentes desta política são manifestadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF. Uma de suas propostas é inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em conformidade com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (BRASIL, 2006). Esses medicamentos devem ser extraídos de espécies cultivadas no Brasil não ameaçadas de extinção, seguindo a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de que os países devem usar os recursos naturais disponíveis no próprio território para promover a atenção primária à saúde e contribuir para o uso sustentável da biodiversidade nacional (BRASIL, 2011).

Um levantamento bibliográfico cobrindo apenas os primeiros meses de 2012 mostra a eficácia das plantas medicinais no tratamento da doença de Alzheimer (MAHDY et al., 2012; ORHAN et al., 2012), de doenças cardíacas (LANG et al., 2012; XING et al., 2012), malária (SISODIA, et al., 2012), leishmaniose (HAZRA et al., 2012), esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2012), câncer (MALHOTRA et al., 2012), herpes (ASTANI et al., 2012), artrite (LI et al., 2012), como antibiótico (MULAUDZI et al., 2012), anti-inflamatório (NIU et al., 2012), antiúlcera (SILVA et al., 2012), antioxidante (KONRATH et al., 2012), antinociceptivo (LIMA et al., 2012), antidiabético (SOUZA et al., 2012) e antidiurético (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2012).

2.2 CAATINGA E SUA DIVERSIDADE

A Caatinga é uma das maiores e mais distintas regiões fitogeográficas brasileiras, distribuída em uma área de 980.133,079 km², abrangendo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, chegando a ocupar 54% da região Nordeste e 11% das terras brasileiras (ANDRADE et al., 2005).

O nome “Caatinga” é de origem Tupi-Guarani e significa floresta branca, que certamente caracteriza bem o aspecto da vegetação na estação seca, quando as folhas caem (PRADO, 2003). A Caatinga é um tipo de formação vegetal com

características peculiares tais como: árvores baixas e arbustos (que, em geral, perdem as folhas na estação das secas), alta radiação solar, baixa nebulosidade, baixas taxas de umidade relativa, evapotranspiração elevada e sistemas de precipitação irregular de 500 a 800 mm (BARRETO et al., 2007).

Sua paisagem é formada por árvores de troncos tortuosos, recobertos por cortiça e espinhos. As raízes cobrem a superfície do solo, para capturar o máximo de água durante as chuvas leves. As espécies mais comuns são: a umburana, a aroeira, o umbu, a baraúna (braúna), a maniçoba, a macambira, o mandacaru, o xiquexique, o facheiro e juazeiro (MMA, 2010). A flora da Caatinga é bastante utilizada pelas populações locais para os mais variados fins e existe um vasto conhecimento dessa flora que tem contribuído para os cuidados básicos com a saúde dessas populações, visto que grande parte das cidades do Semiárido nordestino não tem acesso aos avanços tecnológicos da medicina.

Diversos estudos relatam a importância biológica que este ecossistema apresenta, com um considerável potencial econômico e ecológico (ALBUQUERQUE, 2002). Levando-se em consideração a influência de fatores externos, como índice pluviométrico, altitude, entre outros, sob o metabolismo das plantas, acredita-se que a região do Semiárido seja uma área que influencie na produção de variados tipos de metabólitos secundários com importantes atividades biológicas, como por exemplo antioxidante (GOBO-NETO & LOPES, 2007). Desse modo, as plantas da Caatinga possuem características singulares, sendo excelentes alvos para a busca de novas substâncias ativas.

A Caatinga é considerada o terceiro bioma brasileiro mais degradado pelo homem, sendo ultrapassada pela Mata Atlântica e pelo Cerrado. Essa situação agrava-se ainda mais pelo número reduzido de publicações relativas à catalogação da flora nativa, em que muitas espécies medicinais estão ameaçadas de extinção sem que tenham sido devidamente estudadas (RÊGO JUNIOR et al., 2011). Diante da velocidade do fenômeno de devastação deste bioma, torna-se mais urgente intensificar os investimentos nessa área (LOIOLA et al., 2012). Portanto, constituem desafios estudos nas áreas de etnobotânica, fitoquímica, agronomia, farmacologia e biotecnologia para estas espécies endêmicas (TABARELLI et al., 2004; SOUZA, 2009).

2.3 *Spondias tuberosa* ARRUDA

A família Anacardiaceae pertence à Ordem Sapindales, que compreende aproximadamente 77 gêneros e 701 espécies e 1056 táxons (THE PLANT LIST 2016), presentes em ambientes secos a úmidos, principalmente em terras baixas nas regiões tropicais e subtropicais, estendendo-se até regiões temperadas (LUZ, 2011). No continente americano existem aproximadamente 32 gêneros nativos, sendo que 77% das espécies são endêmicas do continente americano e apenas os gêneros *Antrocaryon*, *Camptosperma*, *Cotinus*, *Pistacia*, *Rhus*, *Spondias* e *Toxicodendron* possuem representantes também em outros continentes (LUZ, 2011). No Brasil estão catalogados 14 gêneros com 57 espécies de Anacardiaceae, sendo que 14 delas são restritas ao país (SILVA-LUZ; PIRANI, 2010).

Spondias é um gênero tropical da família Anacardiaceae que abrange 18 espécies que são distribuídas mundialmente (MICHELL; DALYSE, 2015), e dentre estas, 4 a 7 espécies são encontradas nas Américas. Na Ásia ocorrem cultivos comerciais de *Spondias mombin* e *Spondias purpurea*, dentre outras 10 espécies nativas (SILVA et al., 2014). No Brasil destacam-se as espécies *S. mombin* L. (Cajá), conhecida em certas regiões como cajá, cajá-mirim ou taperebá; *S. purpurea* L. (Siriguela), *S. tuberosa* Arr. Câmara (Umbu ou imbu); *S. dulcis* ou *S. cytherea* Parkinson (Cajarana ou cajá-manga) e duas espécies taxonomicamente indefinidas, mas consideradas híbridos naturais, cajá-umbu ou umbu-cajá (*S. mombin* × *S. tuberosa*) e umbuguela (*S. tuberosa* × *S. purpurea*) (SILVA, 2009). Dentre as espécies do gênero *Spondias*, podemos destacar a importância comercial do umbu, cajá e cajá-umbu ou umbu-cajá. Seus frutos são comercializados *in natura* ou processados na forma de polpas, sucos e outros produtos alimentícios (Lins Neto, 2010). Devido à utilização comercial destes frutos, vários estudos vêm abordando as suas características de cultivo, assim como as características físico-químicas, maturação e estabilidade, e os constituintes químicos. Além do uso comercial, está descrito na literatura também a utilização de espécies deste gênero na medicina tradicional em diversas regiões do mundo (AGRA et al., 2007).

S. tuberosa é uma espécie da família Anacardiaceae, conhecida popularmente como "umbuzeiro" ou "imbuzeiro", sendo endêmica da Caatinga e nativa do Semiárido

brasileiro, ocorrendo desde o Piauí até o norte de Minas Gerais. O umbuzeiro é uma planta adaptada a sobreviver e produzir sob condição de estresse hídrico (GOMES et al., 2010). Pode ser cultivada em larga escala, tanto para a alimentação humana, quanto para suplementação alimentar de animais. Suas raízes e folhas também podem ser utilizadas como alimento, e a água armazenada nas raízes é utilizada na medicina popular (LOPES, 2007). A planta pode alcançar sete metros, possui tronco curto e copa em forma de guarda-chuva (Figura 1). O extrativismo do umbu é a maneira mais tradicional de exploração, sendo os principais estados produtores Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Piauí e Paraíba.

Figura 1 - *Spondias tuberosa* Arruda



Silva, A.G (2016)

A espécie possui sistema de polinização generalista, sendo polinizada por abelhas e vespas e produz flores e frutos quando a maioria das espécies de plantas permanece decidual (ARAÚJO et al., 2007).

O umbu é fonte de vitaminas (B1, B2, B3, A e C) e minerais (cálcio, fósforo e ferro) (VIDIGAL et al., 2011) e possui atividade antibacteriana (ROCHA et al., 2013) e anti-inflamatória (SIQUEIRA et al., 2016). Sob o ponto de vista etnofarmacológico, S.

tuberosa apresenta diversos usos para o tratamento de patologias, entre estas diabetes, inflamações, cólicas uterinas e dores de estômago (LINS NETO; PERONI; ALBUQUERQUE, 2010) e prisão de ventre (AGRA et al., 2007). O uso desta planta para diversos fins terapêuticos estar relacionado com os constituintes presentes nesta espécie. Conforme Almeida et al., (2011), os frutos do umbuzeiro apresentaram atividade antioxidante pela presença de compostos fenólicos e ácido ascórbico, bem como há relatos da presença de flavonoides, antocianinas e carotenoides. Tradicionalmente, a casca do ramo do umbu é utilizada para a lavagem de olhos infectados, e também é usado como digestivo e laxativo (AGRA et al. 2007).

Pessoa et al., 2006 realizaram um estudo com atividade antitumoral de 72 extratos de espécies do Nordeste brasileiro, nesse estudo; “*S. tuberosa* apresentou atividade inibitória sobre as células malignas do tumor de Walker”.

Estudos recentes demonstraram que o extrato das folhas do umbuzeiro possui atividade antiviral contra o vírus do dengue tipo 2, devido à presença do ácido elágico, quercetina e rutina (SILVA et al., 2011).

Quanto a presença de metabolitos secundários, quando avaliada a presença de compostos fenólicos de baixo peso molecular, ou fenólicos por UFLC, constatou-se a presença de ácido gálico, clorogênico, protocatecuico, p-cumárico, vanílico e ferúlico no extrato dos frutos do umbuzeiro (SILVA et al., 2014). Levando em consideração a presença de flavonoides e taninos nos frutos e casca do caule do umbuzeiro, associado ao conhecimento popular dos seus efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes, esta espécie mostra-se promissora para bioprospecção e descoberta de novos fármacos (ARAÚJO et al., 2008).

Quanto a classificação da espécie, de acordo com The Angiosperm Phylogeny Group (APG) III (2009), a posição taxonômica de *Spondias tuberosa* obedece à seguinte hierarquia:

- **Reino:** Plantae
- **Divisão:** Angiospermae
- **Clado:** Eurosídeas II
- **Ordem:** Sapindales
- **Família:** Anacardiaceae

- **Gênero:** *Spondias*
- **Espécie:** *Spondias tuberosa* Arr
- **Nomes vulgares por Unidades da Federação:** em Pernambuco, imbu, imbuzeiro, umbu e umbuzeiro, em Alagoas, imbu e imbuzeiro; na Bahia, imbu, umbu e umbuzeiro; no Ceará, ambu, embu, imbu, imbuzeiro, ombu e umbuzeiro; na Paraíba, imbuzeiro e umbuzeiro; no Piauí e em Sergipe, imbuzeiro.
- **Etimologia:** o nome genérico *Spondias* significa “ameixa”; o epíteto específico *tuberosa*, é devido a essa planta apresentar túberas ou “batatas” (MAIA, 2004). O nome popular umbuzeiro é de origem indígena y-mb-ú, que quer dizer “árvore que dá de beber”. Uma referência a sua característica de armazenamento de Água, especialmente da raiz, qualidade necessária para sobrevivência nos longos períodos de seca no seu habitat natural, a Caatinga.

2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A utilização de produtos de origem vegetal é crescente em todo o mundo, principalmente devido aos problemas que são atribuídos aos produtos sintéticos que ocasionam danos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011).

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos, sendo divididos em primários, os quais são fundamentais na matéria-viva, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do organismo (DEWICK, 2002) e, secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação organismo e ambiente, podendo ser interpretados como a interface química entre o organismo e os outros seres vivos (KUTCHAN, 2001).

As vias metabólicas vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, terpenóides entre outros, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas. Muitos destes compostos são

de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (OKUNADE; ELVIN-LEWIS; LEWIS, 2004; HAIDA et al., 2007). São de grande importância também nas seguintes áreas: alimentar, agrônômica e cosmética (GAMBETA, 2008).

Entre os compostos bioativos oriundos do metabolismo secundário podemos citar: O grupo dos compostos fenólicos que inclui os ácidos fenólicos (constituídos pelos ácidos hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (por ex. Ácido cafeico), estilbenos (resveratrol), flavonoides (quercetina, cianidina e catequina) e compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas e taninos) (SILVA et al., 2007).

Os flavonoides são constituídos por um número alargado de famílias de compostos como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (RATNAM et al., 2006). Estes compostos estão entre as moléculas com maior atividade antioxidante (ROBARDS et al., 1999). A posição do grupo OH na estrutura da molécula é crucial para as propriedades antioxidantes dos flavonoides. Além da capacidade de doar átomos de hidrogénio (H) ou elétrons aos radicais livres, os flavonoides e, em particular, as isoflavonas, poderão exercer os seus efeitos através de mecanismos como modulação das vias de sinalização celular, interações com a mitocôndria e alterações na expressão genética (HERNANDEZ-MONTES et al., 2006).

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico e tem sido alvo de diversos estudos, pois possuem grande capacidade de interagir com as proteínas salivares, dando origem a complexos insolúveis que provocam a sensação de adstringência (SOARES et al., 2012). De acordo com a sua estrutura química distinguem-se dois grandes grupos de taninos: os hidrolisáveis e os condensados (OKUDA, 2005). Os taninos condensados são muito mais comuns que os taninos hidrolisáveis (SANTOS-BUELGA; 2000).

A variedade e complexidade de metabólitos sintetizados pelas plantas sofrem a influência dos estímulos ambientais, bastante variáveis, de natureza química, fisiológica e biológica, resultando na síntese de moléculas de estruturas complexas e com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (RISSATO; ALMEIDA; SILVA, 2004).

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (NIKI, 2010).

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo a outro e representa uma parte fundamental do metabolismo aeróbio, sendo o oxigênio o último aceptor de elétrons num sistema de fluxo de elétrons que produz energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). (DAL'BELO, 2008).

Os radicais livres são espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, devido a isto eles são altamente instáveis e causam danos a outras moléculas através da captação de elétrons, a fim de alcançar a estabilidade. As células geram espécies reativas de oxigênio (ROS) como resultado das alterações fisiológicas e processos bioquímicos. (DEEPA et al., 2012).

A formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular nas mitocôndrias. Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (CASTROGIOVAN; CASTROGIOVANNI; IMBESI, 2012).

No sistema imunológico, os radicais livres têm papel importante, pois apresentam ação bactericida, fungicida e virótica, agindo como uma barreira de defesa do organismo frente à presença de microrganismos (RAHMAN, 2007). Além disso, são encontrados envolvidos na fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (SILVA et al 2011).

Segundo Sun et al. (2011), a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reações que levam a produção de radicais livres podem levar ao estresse oxidativo celular, podendo causar doenças degenerativas e outras patologias. Radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e o radical peroxila ($ROO^\cdot$) são particularmente reativos e conhecidos por serem produtos biológicos na redução molecular do oxigênio (BIGLARI; ALKARKHI; EASA, 2008).

O estresse oxidativo induzido por radicais livres é considerado um fator primário no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012), câncer (BARNETT et al., 2006), doenças cardiovasculares como a aterosclerose (VOKURKOVA et al., 2007; BHATTACHARYA et al., 2011), processos inflamatórios e envelhecimento (WANG et al., 2009), sendo também a causa principal da morte celular e lesões tecidulares resultantes de infarto do miocárdio (IDE et al., 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que o estresse oxidativo também pode ser a causa da diabetes tipo II (DOGRU et al., 2012). Exemplos de espécies reativas de oxigênio são mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Espécies reativas de oxigênio (ROS)

ROS	Espécies reativas de oxigênio
$O_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxila
NO	Óxido nítrico
$ONOO^-$	Peroxinitrito
Q	Radical semiquinona
O_2	Oxigênio singlete
$HO_2^{\cdot}$	Radical peridroxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$RO^{\cdot}$	Radical alquila

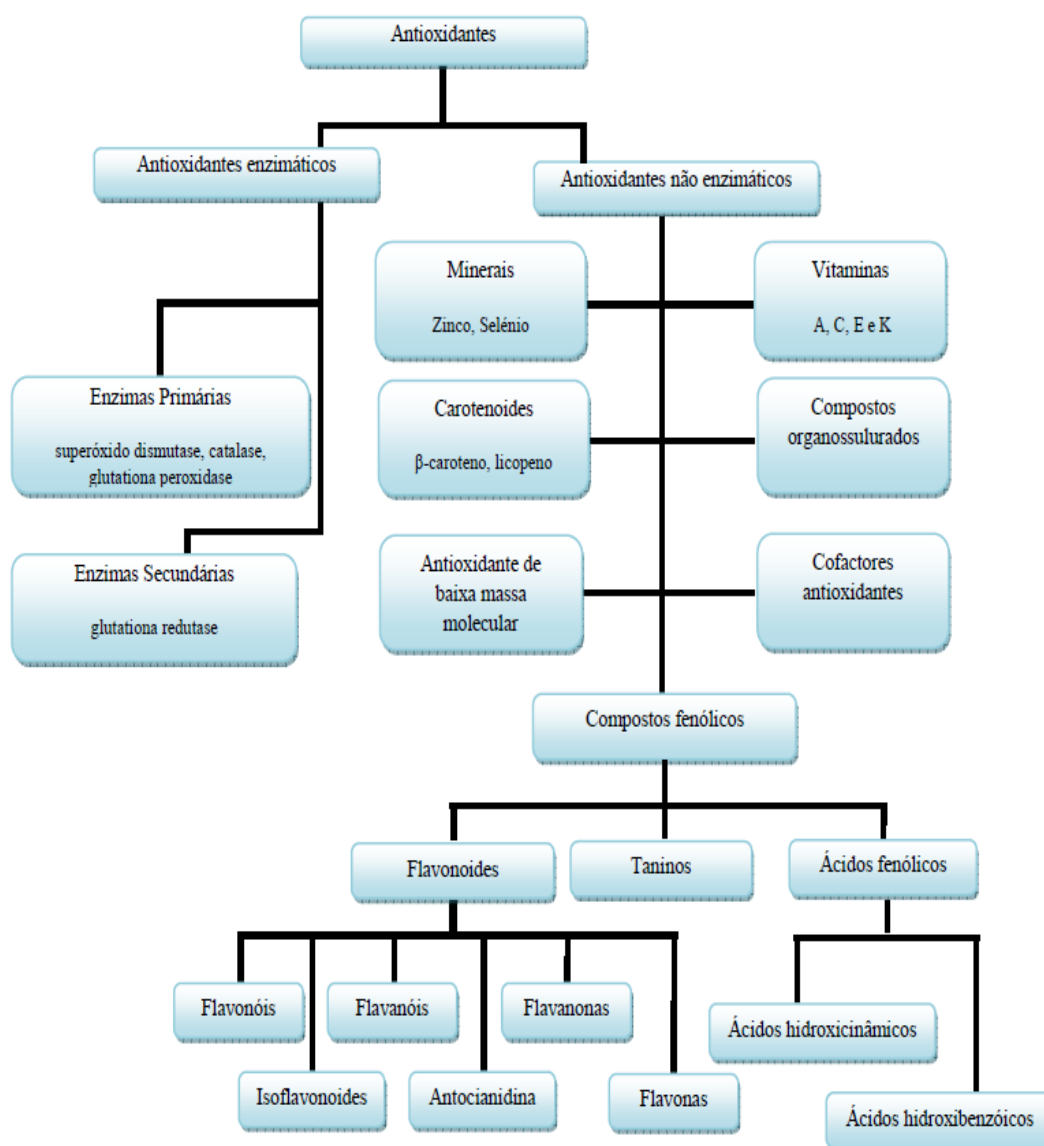
Próprio autor (2016)

A formação de radicais livres pode ser ocasionada por fatores endógenos (respiração celular, inflamações, peroxissomos, enzimas do citocromo P450, dentre outros) e exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, dieta alimentar, tabagismo, alcoolismo, dentre outros fatores).

A ação dos antioxidantes é de grande importância para que não haja o excesso de formação de radicais livres. Naturalmente, alguns antioxidantes são produzidos pelo corpo humano e outros podem ser adquiridos pelo consumo de alimentos (ARAÚJO, 2004). São considerados duas categorias de compostos antioxidantes, os de origem natural e os designados sintéticos (CHEUNG et al., 2003). Os antioxidantes

naturais dividem-se em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos (Figura 2). Os antioxidantes enzimáticos incluem as principais enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C, compostos fenólicos e compostos lipossolúveis (vitamina E e carotenoides) (NDHLALA et al., 2010).

Figura 2 - Classificação dos antioxidantes



De acordo com Sun et al. (2011), atualmente existem disponíveis muitos antioxidantes sintéticos tais como butilhidroxianisol e butil-hidroxitolueno, entretanto, estes podem se acumular no organismo resultando em lesão hepática e carcinogênese. Por esta razão, como um esforço para proteção do ser humano aos radicais livres e retardamento do progresso de muitas doenças crônicas tem se dado grande atenção aos antioxidantes naturais.

Antioxidantes naturais são obtidos a partir de recursos vegetais incluindo ervas aromáticas, especiarias, frutas, legumes, oleaginosas e produtos (SHAHIDI; ZHONG, 2010). Alguns estudos mostraram que a ingestão de frutas e verduras reduz a taxa de doenças cardíacas, câncer, e outras doenças degenerativas, e que este fato pode ser atribuído à presença de antioxidantes naturais nestes alimentos (MOTAMED; NAGHIBI, 2010).

De acordo com Niki et al. (2010) as evidências que implicam o estresse oxidativo no desenvolvimento de diversas doenças e desequilíbrios conduzem ao reconhecimento do papel dos antioxidantes na preservação da saúde humana e na prevenção e ajuda no tratamento de doenças. A diversidade química existente entre os compostos antioxidantes, em especial entre os compostos fenólicos, impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diversos ensaios, com diferentes mecanismos de ações. Neste sentido, várias metodologias têm sido desenvolvidas, as quais diferem tanto em relação ao mecanismo de reação, como no que se referem às espécies-alvo, as condições em que ocorre a reação e na forma de expressar os resultados. Dentre os métodos que determina a habilidade dos antioxidantes em sequestrar radicais livres, destacam-se: Método de Complexação do Fosfomolibdênio, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS (2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid), Método de Redução do Ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power – FRAP), entre outros.

As vantagens e desvantagens dos métodos para avaliação da atividade antioxidante têm sido discutidas em termos de simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação e relevância biológica (NIKI, 2010).

2.5.1 Fosfomolibdênio

Atualmente, este é um dos métodos preconizados para avaliar a capacidade antioxidante através do poder redutor de extratos de amostras vegetais (PRIOR et al., 2005). O método de complexação do fosfomolibdênio, descrito por Prieto (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm. A solução teste inicial possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz. Este método possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (Prieto et al., 1999).

2.5.2 DPPH

O teste de DPPH é um dos métodos mais antigos para determinar a atividade antioxidante, sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em produtos naturais. Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (BORGES et al, 2011). O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA et al, 2007), fenilpropanóides, flavonóides (LEJA et al, 2007), cumarinas (VOGEL et al, 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (KIM; THOMAS, 2006), antocianinas, antocianidinas (DE LIMA et al, 2007) e carotenóides (AJILA et al, 2007). Este ensaio possui muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade na ausência da luz, simplicidade e viabilidade (DENG, CHEN, YANG, 2011). O DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, com consequente desaparecimento da absorção, esta redução pode ser verificada mediante espectrofotometria entre 515 a 516 nm, com simultânea mudança de coloração violeta escura original, para amarela clara (KOLEVA et al., 2002). Ele é um radical livre estável que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico (OLIVEIR, 2015).

2.5.3 ABTS

Outro método bastante utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS⁺), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al, 2005). Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria num comprimento de onda de 734 nm. Esse radical pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida de ABTS⁺.

2.5.4 Antioxidantes como Fotoprotetores

Os antioxidantes são um dos principais princípios ativos usados em formulações cosméticas para combater os radicais livres. (ROSSI, 2000). Além das vitaminas nos produtos cosméticos com a propriedade antioxidante, os extratos vegetais ricos em compostos fenólicos também são utilizados em cosméticos, tendo sua eficácia comprovada (GUARATINI, MEDEIROS e COLEPICOLO, 2007; RIBEIRO, 2010).

A pele é a primeira barreira de defesa (SCOTTI; VELASCO, 2003) e a excessiva exposição da pele aos ROS tem um papel importante no desenvolvimento de câncer, imunossupressão cutânea e envelhecimento prematuro (BALOGH, 2011). Além disso, o estresse oxidativo é capaz de produzir danos celulares na pele, tais como: peroxidação lipídica, desnaturação proteica e alterações no DNA (NICHOLS et al., 2010).

Na pele, a radiação UV desencadeia reações fotoquímicas a partir da excitação de elétrons em moléculas cromóforas, podendo interagir diretamente com substratos moleculares, como o DNA (reações de foto-sensibilização tipo I) ou indiretamente, gerando oxigênio molecular (reações de foto-sensibilização tipo II) e produzindo ROS (WONDRAK et al., 2006). Nos sistemas biológicos, a luz pode interagir tanto com moléculas fotossensíveis exógenas, originárias de fármacos ou cosméticos, quanto

endógenas, como ácidos nucleicos e proteínas. Dependendo do tempo de exposição, comprimento de onda e da região exposta, essas interações podem produzir, direta ou indiretamente, efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células da pele (DE GRUIJL, 2002, FRUET, 2015).

Os cosméticos possuem ativos antioxidantes com o propósito de proteger a pele das radiações solares UVA e UVB, impedindo a ação dos radicais livres e a oxidação das células evitando os danos ao DNA e fibroblastos, resultando em uma proteção geral, retardando o envelhecimento e prolongando a boa qualidade e aparência da pele (GÁLVEZ et al., 2010). Diversos compostos de origem vegetal têm recebido especial atenção para uso como agentes fotoprotetores (TOMARINO et al., 2006). As plantas que absorvem na região ultravioleta têm na sua composição grandes quantidades de metabolitos secundários, tais como os compostos fenólicos (flavonoides, taninos), antraquinonas e alcaloides (DI MAMBRO & FONSECA 2006).

Os compostos fenólicos apresentam fotoproteção relacionado à sua propriedade antioxidante (NICHOLS et al, 2010). A presença de grupos hidroxilas no anel aromático e de grupamentos doadores de prótons (como exemplo hidroxilas, carboxílico, tiol) são estruturas que permitem aos compostos fenólicos apresentarem atividade antioxidante (LEE et al., 2013). Compostos derivados do ácido cinâmico como os ácidos rosmarínico (AR) e clorogênico (ACG) são de grande importância na fotoproteção devido a semelhanças estruturais com substâncias com conhecida atividade fotoprotetora como, por exemplo, o metoxicinamato de octila (EDREVA et al., 2005). Antioxidantes aplicados topicamente ou administrados oralmente apresentam uma perspectiva promissora de prevenção de doenças cutâneas ao enriquecer o sistema antioxidante cutâneo endógeno (ROPKE et al., 2003).

2.6 ÚLCERAS PÉPTICAS

Úlcera é uma lesão profunda, onde componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem estar destruídos (MILANI E CALABRO, 2001). Úlceras pépticas são lesões caracterizada pela perda circunscrita de tecido que ultrapassa os limites da camada muscular da mucosa que pode desenvolver-se na porção inferior do esôfago, no

estômago e no duodeno (SILVA, 2014). Se as úlceras pépticas são encontradas no estômago, elas são chamadas de úlceras gástricas. A úlcera péptica gastroduodenal é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese. Dados epidemiológicos mostram que a úlcera gástrica é uma doença que cresce continuamente em todo o mundo. Aproximadamente 10% da população que vive em países industrializados é afetada em algum estágio da doença. Ela possui uma tendência em se tornar crônica perdurando por 20 anos ou mais, com episódios de cicatrização e re-exacerbação (KLEIN-JÚNIOR et al., 2012; ZAGHLOOL et al., 2015).

Mesmo com grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica, a sua etiopatogenia não é totalmente conhecida. O entendimento dos eventos chave no desenvolvimento do processo de ulceração é crucial para a elaboração de novas drogas com ampla margem de segurança (KLEIN-JÚNIOR et al., 2012; SZABO, 2014). Dentre as hipóteses mais aceitas como causa dessa patologia, são citados: fatores genéticos, fatores endógenos (distúrbios fisiopatológicos) e fatores exógenos (estresse, tabagismo, dieta alimentar, uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), ingestão de álcool, fumo e infecção por *Helicobacter pylori*) (CARVALHO, 2000). Por outro lado, o organismo possui potentes mecanismos de defesa (barreira muco-bicarbonato, fosfolipídios da superfície epitelial de revestimento, camada lipoproteica da membrana, fluxo sanguíneo, síntese de prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) e sistema antioxidante) que protegem a mucosa de possíveis lesões (POTRICH, 2009).

Um fator de grande importância no desenvolvimento de úlceras gástricas é o consumo de álcool pela população, que pode produzir erosão gástrica aguda hemorrágica. A ingestão excessiva pode resultar em gastrite caracterizada por edema, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (JAHOVIC et al., 2007). Além disso, em modelos experimentais o etanol tem efeito ulcerogênico e necrotizante que resulta em dano direto da mucosa (ROZZA et al., 2013). O etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de prostaglandinas (PGs) e consequente redução da produção de muco, além de provocar danos no endotélio vascular da mucosa gástrica, desordem da microcirculação e isquemia, aumentando a produção de ROS (PAN et al., 2008).

O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ROS pelos processos de oxidação na mucosa, dentre os quais participam: xantina oxidase, amina oxidase, aldeído oxidase, bem como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida oxidase (NADPH oxidase) encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos).

Quando ocorre o desequilíbrio entre os fatores irritantes e os mecanismos protetores, o resultado é o desenvolvimento de inflamação aguda que é acompanhada pela infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, os quais são recrutados por citocinas pró-inflamatórias, gerando, com isso grandes quantidades de ROS pela ativação da NADPH oxidase (FIALKOW et al., 2007). Portanto, a integridade da mucosa gastrointestinal depende de um equilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores protetores, sendo que a úlcera é o resultado final de uma série de alterações fisiológicas (JAIN et al., 2007).

Diversos compostos de origem vegetal (flavonoides, saponinas, taninos, gomas e mucilagens) demonstram atividade antiúlcera quando testados em animais, porém poucos estudos clínicos foram realizados (POTRICH 2009). Essas classes de compostos citadas, possuem importância terapêutica que podem apresentar tanto atividade anti-inflamatória quanto antiúlcera, uma vantagem em relação aos anti-inflamatórios tradicionais que, em sua maioria, são ulcerogênicos.

2.6.1 Modelo de Indução de Úlceras por Etanol

A utilização do etanol para induzir úlceras é realizada através de procedimentos simples e reprodutíveis, com a administração de diferentes quantidades (0,5 a 2 mL) de etanol concentrado (50-100%). Dependendo da quantidade de etanol administrada, entre 10 e 40% da porção glandular dos estômagos de camundongos e ratos se tornam cobertas por lesões hemorrágicas e úlceras, que são observadas entre 1-2 horas após a administração (JAIN et al., 2007). Pesquisas realizadas com base no tempo do modelo demonstram que a maior parte das lesões se forma dentro de 1-3 minutos do contato do etanol com a mucosa. A tabela 2 mostra os mecanismos envolvidos na formação de lesão da mucosa gástrica.

Tabela 2 - Causas envolvidas na lesão da mucosa gástrica induzida por etanol

Diminuição	Aumento
Produção de muco	Geração de radicais livres
Motilidade gástrica	Refluxo na difusão de ácido
Diferença de potencial transmucosa	Liberação de serotonina
Produção endógena de GSH (glutathiona)	Liberação de histamina
Produção de prostaglandinas	Efluxo de sódio e potássio
Fluxo sanguíneo na mucosa gástrica	Influxo de cálcio
	Produção de leucotrienos
	Isquemia
	Permeabilidade vascular gástrica

Adaptado de GLAVIN (1992)

2.6.2 Tratamento

Visto que os principais fatores que levam à formação de úlceras no trato gastrointestinal envolvem o desequilíbrio entre os fatores que provocam dano da mucosa (como ácido e pepsina) e os agentes protetores (muco e bicarbonato), além da infecção por *H. pylori*, as estratégias de tratamento de úlceras visam corrigir ou atenuar estes problemas, baseadas nos mecanismos de ação dos fármacos disponíveis, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Fármacos utilizados no tratamento de úlceras e seus respectivos mecanismo de ação

Fármacos	Mecanismo de Ação
Omeprazol Lansoprazol Pantoprazol	Inibidores da bomba de prótons
Hidróxido de magnésio Hidróxido de alumínio Bicarbonato de sódio	Antiácidos
Amoxicilina Metronidazol Claritromicina Tetraciclina	Antibióticos
Carbenoxolona Misoprostol	Citoprotetores

Próprio autor (2016)

Inúmeras classes de agentes farmacologicamente ativos provaram suas efetividades no tratamento de distúrbios ácido-pépticos. Essas classes incluem: antiácidos (hidróxido de alumínio e magnésio); agentes supressores da produção ácida (antissecretóres), que incluem inibidores da bomba de H^+/K^+ ATPase (IBP, omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol, dexlansoprazol, tenatoprazol); antagonistas reversíveis dos receptores H_2 de histamina (ARH_2 , cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina); anticolinérgicos (pirenzepina, via receptor M_1 e M_3); agentes citoprotetores (sucralfato e análogos de prostaglandinas) e antimicrobianos para a erradicação do *Helicobacter pylori* (CORDEIRO et al., 2012; AWAAD; EL-MELIGY; SHIMOYAMA et al., 2013; JÚNIOR et al., 2014). Diante dos efeitos colaterais provocados pela utilização crônica desses fármacos, se faz necessário investigar alternativas que agreguem efeitos farmacológicos capazes de promover a prevenção e a cicatrização de úlceras, com ausência ou redução de efeitos colaterais.

3 RESULTADOS

3.1 ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF *Spondias tuberosa* ARRUDA LEAVES EXTRACTS

Amanda D. A. Uchôa¹, Wesley F. Oliveira¹, Aline P. C. Pereira¹, Alexandre G. Silva², Bruna M. P. C. Cordeiro¹, Carolina B. Malafaia¹, Clébia M. A. Almeida¹, Nicácio H. Silva¹, Juliana F. C. Albuquerque³, Márcia V. Silva¹, Maria T. S. Correia¹

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

2 Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Campina Grande, Brazil

3 Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

*Autor correspondente

Amanda Dias de Araújo

Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil. Telefone: (55) 81 2126-8936, e-mail: amandabiologa1@gmail.com

Abstract

Spondias tuberosa Arruda (umbuzeiro), a Brazilian semiarid plant, is a species of great economic, social, and ecological importance. In folk medicine, the leaves have been used in the treatment of diabetes, inflammation, stomach and uterine pains, and constipation. In this study, the antioxidant properties of ethyl acetate and methanol leaves extracts were evaluated in vitro using different methods: free radicals elimination by DPPH and ABTS assays, and transition metal reduction by phosphomolybdenum assay. In addition, a phytochemical study was also carried out. The methanolic leaves extracts showed the strongest antioxidant activity and the higher values for total phenolic and flavonoids. The results showed that *S. tuberosa* leaves have antioxidant activity and this seems to be related to the phenolic content.

Key-words: Umbuzeiro, phenolic compounds, flavonoids, antioxidants.

Introduction

The oxidative stress induced by free radicals is considered a primary factor in neurodegenerative diseases as Alzheimer's, Parkinson's and cardiovascular diseases as atherosclerosis [1]. The in vitro ability of phenolic compounds in the free radicals elimination and pro-oxidant metals reduction may explain the effectiveness in the treatment of many chronic non-transmissible diseases [2]. Natural antioxidants derived from plants are generally required to neutralize the damage caused by reactive oxygen species (ROS) to the cells [3].

Antioxidant compounds can be defined as substances that show at low concentrations the capability to inhibit or retard substrate oxidation when compared to oxidizable substrates [4]. Antioxidants such as flavonoids, tannins, coumarins, curcumanoids, xanthonenes, phenols, lignans and terpenoids have been found in various plant products as fruit, leaves, seeds and oils [5].

Spondias tuberosa Arruda (Anacardiaceae), known as "umbuzeiro", is a tropical plant that plays a major role in the Northeast of Brazil as an important nutritional resource [6]. It is endemic to the Caatinga zone and produces flowers and fruits during the dry season [7], when most species of plants remain in a completely deciduous state [8, 9]. In addition, the fruits represent an investment for the local population as food for humans and animals [10, 11]. This species has great ecological, social, economic, and cultural importance [12]. The "Umbu", the fruit of *S. tuberosa* provides a source of vitamins (B1, B2, B3, A, and C) and minerals (calcium, phosphorus and iron) [13] and possesses antibacterial activity [14]. In popular medicine, leaves are also used for treating several pathologies as diabetes, inflammations, uterine pain, stomach pain and constipation [15].

The aim of this study was the evaluation of the phytochemical profile and the determination of total phenolics, flavonoids, and the antioxidant activity of the ethyl acetate and methanol leaves extract of *S. tuberosa* by different methods (ABTS, DPPH and phosphomolybdenum assays).

Material and methods

1. Tratamento

The plant was collected in Catimbau National Park, Pernambuco, Northeast of Brazil, at April 2014. The botanical identification was made by the herbarium staff of the Instituto de Agrônomo de Pernambuco (IPA) and a voucher specimen was deposited in the herbarium (No. 91090).

2. Tratamento Extract preparation

The leaves were dried in an oven at 45 °C. The material was triturated in mill (Tecnal/Willye mill/ET-650) to obtain a powder. The extracts were obtained in a mechanical Accelerated Solvent Extractor (ASE 350 Dionex). The extracts were concentrated under a nitrogen stream in a heating block at 60 °C. 20 g of the powder were transferred to the cells of the ASE and extracted with ethyl acetate and methanol and then dried at 50 °C using a rotary evaporator.

3. Phytochemical analysis

The phytochemical screening of the plant extracts was performed by thin layer chromatography (TLC) according to Wagner and Bladt [15], Harborne [16] and Roberts et al. [17]. Aliquots of ten microliters of the extracts of the extracts were applied on silica gel chromatography plates, using elution systems and suitable developers to investigate the presence of saponins, flavonoids, cinnamic derivatives, phenylpropanoids, triterpenoids, steroids, mono- and sesquiterpenes, alkaloids, proanthocyanidins and leucoanthocyanidins, coumarins, and quinones.

4. Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method to Li et al. [18] Two hundred microliters of diluted sample were added to 1 mL of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. After 4 min, 800 mL of saturated sodium carbonate solution (75 g/L) was added. After 2 h of incubation at room temperature, protected from light, the absorbance at 765 nm was measured in triplicate. Gallic acid (0–500 mg/L) was used for calibration of standard curve. The results were expressed as milligram gallic acid equivalent (mg GAE) / g dry weight of plant extract.

5. Determination of flavonoids

The determination of flavonoids follows the methodology proposed by Woisky and Salatino [19] To 0.5 mL of diluted samples, was added 0.5 mL of 2 % AlCl_3 (w / v) solution prepared in methanol. After 30 minutes of incubation at room temperature, protected from light, the absorbance at 420 nm was measured in triplicate. The results were expressed as milligram quercetin equivalent (mg QE)/ g dry weight of plant extract.

6. Antioxidant activity using 2,2-azino-bis-(3 ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid (ABTS)

According to Silva et al. [20], the ABTS assay is based on the generation of chromophore cationic radical obtained from the oxidation of ABTS by potassium persulfate. The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS stock solution plus 140 mM potassium persulfate (final concentration) and the mixture was left in the dark at room temperature (23 – 25 °C) for 12 – 16 h (time required for radical formation) before its use. The ABTS⁺ solution was diluted in ethanol to an absorbance of 0.7 (± 0.02) units at 734 nm. The effect of extract amount on the antioxidant activity was carried out using aliquots of 30 µL, and mixing with 3 mL diluted ABTS⁺ solution. The absorbances at 734 nm were measured at different time intervals (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as a reference standard. The values of oxidative inhibition percentage were calculated and plotted as a function of the reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, µM). All determinations were carried out in triplicate.

7. DPPH radical scavenging assay

The DPPH free radical scavenging activity of the extracts was performed according to Brand-Williams et al. [21] with some modifications. A methanolic DPPH stock solution (200 µM) was further diluted in methanol to obtain a UV-VIS absorbance between 0.6 - 0.7 at 517 nm, obtaining the DPPH working solution. Different concentrations of the extracts (40 µL) were mixed with DPPH solution (250 µL) and after 30 min incubation in darkness the absorbances were read at the same wavelength

mentioned above. The measurements were triplicated and their scavenging activities were calculated based on the percentage of DPPH scavenged.

8. Total antioxidant capacity by phosphomolybdenum assay

According to Pietro et al. [22], the total antioxidant capacity (% TAC) was evaluated by phosphomolybdenum assay. An aliquot of 0.1 mL of sample solution (100 µg/mL) was combined with 1 mL of reagent solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were capped and incubated in a boiling water bath at 90 °C for 90 min. Afterward, the absorbance was measured at 695 nm against a blank (1 mL of reagent and 0.1 mL of solvent). Total antioxidant activity was expressed in relation to ascorbic acid.

9. Statistical Analysis

Pearson correlation analysis was performed using a Statistical (Statistical Statsoft, Tulsa) software; P-values < 0.05 were considered significant.

Results and discussion

The phytochemical screening was performed to identify the classes of chemical compounds present in the extracts. Other studies have already demonstrated the antioxidant activity of sterols, terpenoids, oils, flavonoids, alkaloids and other phenolic compounds [23, 24].

The preliminary phytochemical analysis for the *S. tuberosa* leaves (Table 1) revealed the presence of high levels of flavonoids, triterpenes. The phytochemical profile results showed that the plant extract has molecules with high technological potential for the development of new drugs with application in the treatment and prevention of various diseases.

Table 1. Phytochemical profile of the methanolic and ethyl acetate extracts of the *S. tuberosa* leaves

Secondary metabolites	Extract			
	Standards	Elution system	Ethyl acetate	Methanol
Flavonoids	Quercetin and rutin	A	+++	+++
Cinnamic derivatives	Chlorogenic acid	A	+	+
Triterpenes and steroids	β -sitosterol	B	+++	+++
Mono and sesquiterpenes	Thymol	C	-	-
Alkaloids	Pilocarpine	A	-	-
Coumarins	Coumarin	D	-	-
Condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins	Catechin	A	-	-

A - AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:27 v/v); B -Toluene:AcOEt (90:10 v/v); C -Toluene:AcOEt (97:03 v/v); D - CHCl₃-MeOH (98:2 v/v). + = Presence and - = Absence; + = low, ++ = intermediate, +++ = high

In the determination of total phenolics and flavonoids, the results showed that the methanol solvent was better than ethyl acetate to extract phenolic compounds (Table 2) which may be explained by its good polarity and solubility for phenolic compounds extracted from plants [25, 26].

The lower polarity solvent, the ethyl acetate, showed much lower capacity for extracting phenolic compounds, compared with the more polar solvent. Numerous studies have shown a strong relationship between total phenolic content and antioxidant activity in fruits, vegetables and medicinal plants [27]. Phenolic compounds have been reported to have multiple biological effects including antioxidant activity. In addition, they can act in the free radical elimination or prevent its formation [28].

Table 2. Total phenolic and flavonoids compounds quantifications from *S. tuberosa* leaves extracts. Mean $\pm$ SD (n=3)

Sample	Total phenolic content (mgGAE/g)	Flavonoid content (mgQE/g)
Ethyl acetate extracts	75.69 $\pm$ 0.73	10.24 $\pm$ 0.66
Methanolic extracts	100.07 $\pm$ 0.02	15.74 $\pm$ 0.04

GAE: gallic acid equivalent. QE: quercetin equivalent

It has been reported that most of the antioxidant activity may be associated with phytochemicals such as flavonoids, isoflavones, anthocyanins, flavones, catechins and other phenolic compounds [29].

There are several methods to determine the antioxidant capacity of phytochemical compounds. The methods used in this study to determine the antioxidant capacity of the ethyl acetate and methanolic extract were ABTS, DPPH and phosphomolybdenum assay. Antioxidants act in many of biological responses as inflammation and immunity, they function as signaling mechanisms for redox regulation. Even at minimal levels of oxidative stress, they are strongly detected and then the protective antioxidant mechanism is put into action, which is essential for maintaining the structural integrity of proteins. Recently, particular attention has been made on the antioxidant properties of plants derived from dietary food constituents [29].

The ABTS assay results were shown in Fig.1. All extracts (1 mg/ml) of *S. tuberosa* had antioxidant activity as a function of the time according to the Pearson correlation coefficient ($r = 0.958$, $p < 0.05$), which means that the beneficial antioxidant effect of the extracts improves significantly over time.

The methanol leaves extract had the highest antioxidant capacity with oxidation inhibition rate of 70.25 % $\pm$ 0.49 after 120 min equivalent to TEAC of 1489.99 $\pm$ 12.02 μ M of Trolox, while the ethyl acetate extract showed 58.724 $\pm$ 0.93 % inhibition with TEAC of 1211.11 $\pm$ 22.68 μ M of Trolox after 120 min.

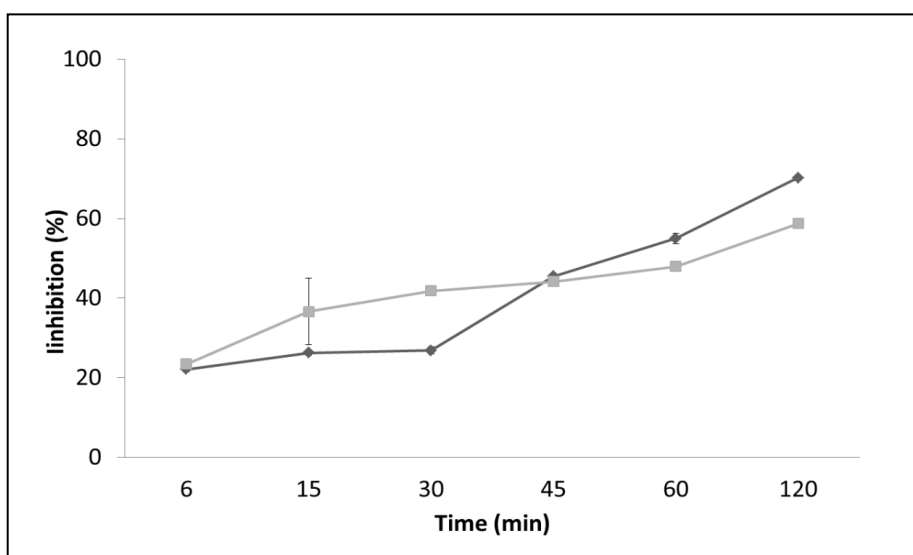


Figure 1. Effect of the incubation time on antioxidant activity of *S. tuberosa* leaves extracts in ABTS assay. Ethyl acetate (—■—), Methanol extract (—◆—)

The assay of the DPPH radical elimination expressed as a percentage of the radical reduction was presented in Table 3. The radical elimination activity was detected only in the methanolic leaves extract (68.12 ± 2.67 %). The percentage of radical reduction for the ethyl acetate extract cannot be calculated due to the formation of precipitates in the sample in contact with the DPPH radical. According to the Pearson correlation coefficient, there is a positive correlation between the methanol leaves extract concentration and the free radicals elimination ($r = 0.967$, $p < 0.05$).

Table 3. Antioxidant activity of methanolic extract of *S. tuberosa* leaves in different concentrations. Gallic acid was used as standard. Mean $\pm$ SD (n=3)

Extract Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH RSA%
1000	68.12 ± 2.67
500	49.66 ± 1.66
250	35.29 ± 1.17
125	18.41 ± 1.40
62.5	18.03 ± 0.79
31.25	9.47 ± 0.36

RSA %: Percentage of DPPH radical reduction activity after 30 min.

It was observed positive results in the ABTS and DPPH test sample, indicating that the extracts had comparable activities in both assays. However, only the methanolic leaves extract showed antioxidant activity in both assays (ABTS and DPPH).

Regarding the applicability of each assay reported by our results, DPPH is a free radical that is obtained directly without preparation (ready to dissolve), while the ABTS is a cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), which should be generated by enzymatic activity (peroxidase and myoglobin) or chemical (manganese dioxide and potassium persulfate) reactions [30, 31].

The total antioxidant activity (TAC) assay performed by phosphomolybdenum, which molybdenum ion reduction capability of *S. tuberosa* extracts indicating that both extracts (methanolic and ethyl acetate) leaves were antioxidants. However, differences were observed in the antioxidant activity between these two types of extracts. The methanolic extract showed better activity ($31.02\% \pm 0.01$ TAC) than the ethyl acetate extract ($22.58\% \pm 0.03$ TAC) using ascorbic acid as standard. Likewise the other methods, the methanol was the most effective solvent for extracting the antioxidant with potential secondary metabolites from *S. tuberosa* leaves in comparison with ethyl acetate.

According to the results, we note that there was a significant difference between the results of phosphomolybdenum and ABTS/DPPH assays, which can be explained by the fact that the hydrogen transfer electrons from antioxidant varies with its chemical structure [32]. In addition, non-phenolic compounds such as tocopherols and ascorbic acid may also act as reducer, thus cannot be observed a positive relationship between phenolic content and phosphomolybdenum reduction activity [33]. Other compounds, such as carotenoids, which were not measured in this study, can be present in the extract and could contribute to antioxidant activity in the samples.

Conclusions

These results showed that leaves extracts of *S. tuberosa* possess antioxidant activity in all methods analyzed. The use of methanol was an efficient method of extraction of secondary metabolites with antioxidant activity compared to the use of ethyl acetate. The antioxidant properties of the secondary metabolites of the leaves

extract of this plant may represent a potential source of components that could improve the health, being applied as functional foods or incorporated biomolecules into pharmaceutical or nutraceutical preparations.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support given by the laboratório de produtos Naturais and Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] Alves, L.F., 2013. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. *Revista Virtual de Química*, 5, 450-513. doi: 10.5935/1984-6835.20130038
- [2] Zardo, D.M., Zielinski, A.A.F., Alberti, A., Nogueira, A., 2015. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Brazilian Apples. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 727-735. [doi:10.5530/ax.2011.1.4](https://doi.org/10.5530/ax.2011.1.4)
- [3] Wu, P., Guangzhi, M., Nianhui, L., Qian, D., Yanyan, Y., Ruqiang, H., 2015. Investigation of in vitro and in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtustomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chemistry*, 173, 194–202. [doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.023](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.023)
- [4] Niki, E., 2010. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515. [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016)
- [5] Roby, M.H.H., Sarhana, M.A., Selima, K.A.H., Khalel, K.I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.029
- [6] Omena, C.M.B., Valentim, I.B., Guedes, G.S., Rabelo, L.A., Mano, C. M., Bechara, E.J.H., Sawava, A.C.H.F., Trevisam, M.T.S., Costa, J.G., Ferreira, R.C.S., Sant'Ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2012. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research*

International, 49, 334-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>

[7] Nadia, T.L., Machado, I.C., Lopes, A.V., 2007. Pollination of *Spondiastuberosa* Arruda (Anacardiaceae) and analysis of pollinators share with *Ziziphusjoazeiro* Mart. (Rhamnaceae), fruit species endemic to the Caatinga. *Brazilian Journal of Botany*, 30, 89-100. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042007000100009>

[8] Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Barbosa, M.R.V., Bocage Neta, A.L., Figueiredo, M.A., 2002. *Espécies endêmicas da caatinga*. In *Vegetação & flora da Caatinga Associação Plantas do Nordeste – APNE*, 1th ed., Centro Nordestino de Informação sobre Plantas – CNIP, Recife.

[9] Araújo, E.L., Castro, C.C., Albuquerque, U.P., 2007. Dynamics of Brazilian Caatinga e a review concerning plants, environment and people. *Functional Ecosystems and Communities*, 1, 15-28. http://www.academia.edu/1191277/Dynamics_of_Brazilian_Caatinga_A_review_concerning_the_plants_environment_and_people

[10] Cavalcanti, N.B., Resende, G.M., Brito, L.T.L., 2000. Processamento do fruto do imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). *Ciência e Agrotecnologia*, 24, 252-259. http://www.academia.edu/1191277/Dynamics_of_Brazilian_Caatinga_A_review_concerning_the_plants_environment_and_people

[11] Lins Neto, E.M.F., Peroni, N., Albuquerque, U.P., 2010. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the SemieArid region of northeastern Brazil. *EconomicBotany*, 64, 11-21. doi:10.1007/s12231-009-9106-3

[12] Barreto, L.S., 2007. *Plano de manejo para conservação do umbuzeiro (Spondias tuberosa) e de seus polinizadores no Território Indígena Pankararé, Raso da Catarina*, Dissertation, Bahia: Bahia State University.

[13] Vidigal, M. C.T.R., Minim, V.P.R., Carvalho, N.B., Milagres, M.P., Gonçalves, A.C.A., 2011. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciariadubia*), Cajá (*Spondiaslutea* L.) and Umbu (*Spondiastuberosa* Arruda). *Food Research International*, 44, 1988–1996. [doi:10.1016/j.foodres.2010.11.028](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.028)

[14] Rocha, E.A.L.S.S., Carvalho, A.V.O.R., Andrade, S.R.A., Medeiros, A.C.D., Trovão, D.M.B., Costa, E.M.M.B., 2013. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Revista de*

Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 34, 351-355. http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2636/1461.

[15] Agra M.F., Freitas P.F. Barbosa-Filho J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 114-140. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300023>

[15] Wagner H., Bladt S., 1996. *Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas*. 2th ed., Springer, Munich.

[16] Harborne JB., 1998. *Phytochemical Methods*. 3th ed., Londres, Chapman & Hall.

[17] Roberts E.A.H., Cartwright R.A., Oldschool M., 1957. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Science of Food and Agriculture*, 8, 72-80.
[doi:10.1002/jsfa.2740080203/abstract](http://doi.org/10.1002/jsfa.2740080203/abstract)

[18] Li, A.B., Wonga, C.C., Ka-Wing, C., Chen, F., 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Swiss society of food science and technology*, 41, 385-390. [doi:10.1016/j.lwt.2007.03.011](http://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.011)

[19] Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 99-105.
<http://europepmc.org/abstract/AGR/IND21966817>

[20] Silva, R. A., Lima, M.S.F., Viana, J.B.M., Bezerra, V.S., Pimentel, M.C.B., Porto, A.L.F., Cavalcante, M.T.H., Lima Filho, J.L., 2012. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135, 1533–1538.
[doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.058](http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058)

[21] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
[doi:10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

[22] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341. [doi:10.1006/abio.1999.4019](http://doi.org/10.1006/abio.1999.4019)

[23] Ji, H.F., and Zhang, H.Y., 2008. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29, 143–151. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00752.x

- [24] Omena, C.M.B., Valentim, I.B., Guedes, G.S., Rabelo, L.A., Mano, C.M., Bechara, E.J.H., Sawaya, A.C.H.F., Trevisan, M.T.S., Costa, J.G., Ferreira, R.C.S., Sant'Ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2012. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International*, 49, 334–344. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.010
- [25] Siddhuraju, P., Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringaoleiferea*Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2144–2155. doi:10.1021/jf020444+
- [26] Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, I.K., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanummajorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831. doi:10.1016/j.indcrop.2012.08.029
- [27] Berłowski, A., Zawada, K., Wawer, I., Paradowska, K., 2013. Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 71-77. doi:10.4236/fns.2013.48A009
- [28] Hossain, M.A., Rahman. S.M.M., 2011. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44, 672–676. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.036
- [29] Garg, D., Shaikh, A., Muley, A., Marar, T., 2012). *In-vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, 2, 3-6. doi:10.5530/ax.2012.3.6
- [30] Arnao, M. B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 419–421. doi:10.1016/S0924-2244(01)00027-9
- [31] Almeida, M.M.B., Sousa, P.H.M., Arriaga, A.M.C., Prado, G.M., Magalhães, C.E.C., Maia, G.A., T.L.G., 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155–2159. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.051
- [32] Loo, A.Y., Jain, K., Darah, I., 2008. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid *Rhizophoraapiculata*. *Food Chemistry*. 107, 1151–1160. doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.044

- [33] Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A., 2015. Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1–6. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.012

3.2 PHYTOCHEMICAL SCREENING, *IN VITRO* ANTIOXIDANT, HEMOLYTIC AND PHOTOPROTECTIVE ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *Spondias tuberosa* ARRUDA

Amanda Dias de Araújo¹; Fernanda Granja da Silva Oliveira²; Carlos Eduardo Sales da Silva¹; Bruno de Souza Santos¹; Clóvis Macedo Bezerra-Filho¹; Alexandre Gomes da Silva³; Nicácio Henrique da Silva¹; Patrícia Maria Guedes Paiva¹; Wolfgang Harand³; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida²; Márcia Vanusa da Silva¹; Maria Tereza dos Santos Correia^{*1}

1. Departamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Núcleo de estudos e pesquisas de plantas medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.
3. Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Campina Grande-PB, Brasil.

*Autor correspondente

Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Glicoproteína, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil. Telefone: (55) 81 2126-8936, e-mail: mtscorreia@gmail.com

ABSTRACT

Spondias tuberosa is a medicinal plant used by several local communities in Brazilian's northeast to infections treatment, inflammatory conditions and digestive disorders. The phytochemical screening, antioxidant, hemolytic and photoprotective activities of ethyl acetate extracts from the fruits and branches were investigated. The identification of classes of compounds was performed by HPLC. Antioxidant activities of the extracts were evaluated using DPPH, ABTS and phosphomolybdenum assays. The photoprotective and hemolytic activities was evaluated by the spectrophotometric method. The CCD analysis demonstrated the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, triterpenes and steroids and proanthocyanidins and leucoanthocyanidins, and it was identified by HPLC gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid. The branches extracts showed higher amount of total phenolic compounds (83.88 ± 0.2) and flavonoids (11.24 ± 2.0). Also presented the best antioxidant activity for DPPH scavenging (88.80 ± 0.4), ABTS ($68.92 \pm 0.7\%$) and phosphomolybdenum ($27.94 \pm 0.26\%$). The hemolytic activity extracts didn't show any toxicity. The extract showed characteristic absorption bands in regions UVB. The branches extract showed the highest sun protection factor (SPF) with 15.50 ± 0.41 . Therefore, the studied extracts can be used in the production of photoprotective application with phytocosmetics.

Key Words: Umbu, Antioxidant Activity, Hemolytic, Photoprotective Activity, Medicinal

INTRODUCTION

Spondias tuberosa (Anacardiaceae) is a native and endemic species distributed throughout northeast Brazil and popularly known as “umbuzeiro” or “umbu” (1). Several parts of the plant are used in folk medicine, such as the bark, stem bark, fruits, roots, resin and leaves, to treat a great range of diseases such as infections, venereal diseases, digestive disorders, diarrhea, diabetes, menstrual disturbances and placental delivery; in addition, they are used as an antiemetic and tonic (2).

Oxidative stress responses induced by ultraviolet radiation (UV) can cause a variety of harmful effects in skin, including premature photoaging and the induction of immunosuppression and skin carcinogenesis (3).

Plants produce a variety of antioxidants against molecular damage promoted by reactive oxygen species (ROS), and phenolic compounds are the major class of plant-derived antioxidants (4). Among the phenolic compounds can include flavonoids. Flavonoids absorb electromagnetic radiation in the ultraviolet range (UV) and visible and thus have a defensive role in plants against UV radiation from sunlight. (5). Besides scavenging UV-induced radicals, flavonoids might provide protective effect against UV radiation by acting as strong UV absorbing screens (6).

The spectrum of UV radiation is subdivided into three bands, classified according to wavelength: UVA, UVB e UVC. The UVA radiation present the longest wavelengths (320-400 nm), and it is characterized as inducer of oxidative processes in the skin. (7). For these reasons, the use of sunscreen products has been stimulated for the prevention of severe skin diseases.

Nowadays, one of the trends of the cosmetic market is the development of products with the use of natural resources (8). Several plant extracts and oils have been used in cosmetic products such as sunscreen because of the photoprotective action (9). In this context, the aim of this study was to evaluate the antioxidant, hemolytic and photoprotective potential of ethyl acetate extracts of the fruits and branches of the *S. tuberosa*.

Materials and Methods

1. Plant material

Fruits and branches were collected in Catimbau National Park, Pernambuco, Northeast of Brazil, in April 2015 (collection authorization: nº 26743-3). The materials were identified and authenticated at the Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), with the voucher number 91090.

2. Extraction

The fruits and branches were dried at 45°C and was triturated in mill (Willye® mill/ET-650) to obtain a powder. The extracts were obtained in a mechanical Accelerated Solvent Extractor (ASE 350 Dionex®). Twenty grams of the powder were transferred to the cells of the ASE, extracted with ethyl acetate and then dried at 50°C using a rotary evaporator. The extracts were concentrated under a nitrogen stream in a heating block at 60°C.

3. Determination of total phenols

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method (10). Two hundred microliters of diluted sample were added to 1 mL of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu reagent. After 4 min, 800 mL of saturated sodium carbonate solution (75 g/L) was added. After 2 h of incubation at room temperature, protected from light, absorbance was measured at 765 nm. Gallic acid (50 - 500 mg/L) was used for calibration of standard curve. The results were expressed as milligram of gallic acid equivalent (mg GAE) / g of dry weight of plant extract. All experiment was made in triplicate.

4. Determination of Flavonoids

The flavonoid contents were measured by aluminum chloride colorimetric method (11). Five hundred microliters of diluted sample were added to 500 µL of 2% methanolic AlCl₃. After 30 min incubation at room temperature, the absorbance was measured against a blank of methanol and aluminum chloride in a spectrophotometer at 420 nm. Flavonoid content was estimated using a quercetin standard curve (5-35 mg/mL) and the results were expressed as milligram quercetin equivalent (mg QE)/g dry weight of plant extract.

5. Phytochemical Analysis

The phytochemical screening was performed by thin layer chromatography (TLC). Aliquots of ten microliters of the extracts of the extracts were applied on silica gel chromatography plates, using elution systems and suitable developers (12, 13) to investigate the presence of saponins, flavonoids, cinnamic derivatives, phenylpropanoids, triterpenoids, steroids, mono- and sesquiterpenes, alkaloids, proanthocyanidins and leucoanthocyanidins, coumarins and quinones.

6. HPLC Analysis

Chromatographic separation was carried out on an HPLC-DAD Agilent® 1200 using a C18 column C18 Zorbax® SB (250 x 4,6 mm, 5 µm) at $30 \pm 0.8^\circ\text{C}$. HPLC analysis was carried out using a mobile phase consisting 0.3% acetic acid (A) and acetonitrile (B) was applied for a total running time of 20 min. Gradient: 0 min: 92 (A) % and 8 % (B); 15 min: 65% (A) and 35 % (B); 17 – 20 min: 92% (A) and 8 % (B). The flow rate constant at 2.4 mL / min. and the detection carried out at 256 and 360 nm to acquire UV spectra.

7. ABTS assay

The ABTS assay is based on the generation of chromophore cationic radical obtained from the oxidation of ABTS ((2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid; Sigma-Aldrich) by potassium persulfate (14). The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS stock solution plus 140 mM potassium persulfate (final concentration) and the mixture was left in the dark at room temperature (23°C - 25°C) for 12 - 16 h (time required for radical formation) before its use. The ABTS⁺ solution was diluted in ethanol to an absorbance of 0.7 (± 0.02) at 734 nm. The effect of extract amount on the antioxidant activity was carried out using aliquots of 30 µL the extracts solution (1mg/ml) and mixing with 3 mL diluted ABTS⁺ solution. The absorbances at 734 nm were measured at different time intervals (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a reference standard. The values of oxidative inhibition percentage were calculated and plotted as a function of the reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, µM).

8. DPPH assay

The DPPH free radical scavenging activity of the extracts was performed according to Brand-Williams (15) with some modifications. A stock solution of DPPH 200 μ M in methanol was further diluted in methanol to obtain an absorbance between 0.6 - 0.7 at 517 nm, resulting in the DPPH working solution. Different concentrations of the extracts (1000 μ g/mL – 31.25 μ g/mL) were mixed with DPPH solution and after 30 min incubation in darkness, the absorbance were read at the same wavelength mentioned above. Gallic acid was used as standard. The methanol was used as control. The measurements were triplicate and their scavenging activities were calculated based on the percentage of DPPH scavenged calculated using the following formula:

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

Where, A_c is the Control absorbance, and A_s is the Sample absorbance.

9. Phosphomolybdenum Assay

The total antioxidant activity (% TAA), was evaluated by phosphomolybdenum assay (16). An aliquot of 0.1 mL of sample solution (100 μ g/mL) was combined with 1 mL of reagent solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were capped and incubated in a boiling water bath at 90°C for 90 min. Afterwards, the absorbance was measured at 695 nm against a control (1 mL of reagent and 0.1 mL of solvent). Total antioxidant activity was expressed in relation to ascorbic acid and calculated by the following formula:

$$\% \text{ TAA} = \frac{(A_s - A_c)}{A_{aa} - A_c} \times 100$$

Where A_c was the absorbance of the control. A_s was the absorbance in the presence of the extract and A_{aa} was absorbance of ascorbic acid.

10. Hemolytic Assay

Erythrocytes from citrated blood were immediately isolated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min at 4°C. After removal of plasma and buffy coat, the erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and then resuspended using the same buffer and a 1% erythrocyte suspension was prepared. Each tube received 1.1 mL of erythrocyte suspension and 0.4 mL of extract at various concentrations (31.25–1000 µg/mL) were added. The negative control was only solvent (saline solution 0.9%) and the positive control received 0.4 mL of Triton X-100. After 60-min incubation at room temperature, cells were centrifuged and the supernatant was used to measure the absorbance of the released hemoglobin at 540 nm (17). The average value was calculated from triplicate assays. The relative hemolytic activity was expressed in relation to Triton X-100 and calculated by the following formula:

$$\text{Relative hemolytic activity (\%)} = \frac{(As - Ab) \times 100}{Ac - Ab}$$

Where Ab was the absorbance of the negative control. As was the absorbance in the assay with extract, and Ac was the absorbance in the assay with Triton X-100. Hemolysis concentration was calculated.

11. Determination of the Sun Protection Factor (SPF) *in vitro*

The photoprotective activity was evaluated using a spectrophotometric method of diluted solutions (18). The extracts were previously dried on oven at 40 °C for 60 minutes. Dilutions were prepared in the concentrations of 5, 25, 50 and 100 mg.L⁻¹. Scans from 260 to 400 nm with intervals of 5 nm were realized. A spectrophotometer was used, with quartz cuvettes with 1 cm optical path for the acquisition of the spectra. Calculations of the Sun Protection Factor (SPF) were made considering the intervals λ determined.

$$SPF = FC \times \sum_{320}^{290} EE(\lambda) \times (abs(\lambda))$$

Where FC = Correction factor; = sum of the absorption from 290 to 320 nm,
 EE = eritemogenic effect; abs = absorption. The values of EE used to the SPF
 calculation were the same found in the literature (16).

12. Statistical analysis

All determinations were conducted in triplicates. The data obtained were expressed as mean $\pm$ S.D. The concentration needed for 50% of hemolysis was calculated by linear regression analysis.

Results and Discussion

The phytochemical analysis demonstrated that both extracts were positive for the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, triterpenes and steroids and positive for proanthocyanidins and leucoanthocyanidins only to extract the branches (Table 1). The main substances found in the extracts studied were flavonoids, cinnamic derivatives and terpenoids, substances with a great antioxidant potential (19, 20).

Table 1. Phytochemical profile of the ethyl acetate fruits and branches extracts of the *S. tuberosa*.

Secondary metabolites	Standards	Elution system	Extracts	
			Fruits	Branches
Flavonoids	Quercetin and rutin	A	+++	+++
Cinnamic derivatives	Chlorogenic acid	A	+	+++
Triterpenes and steroids	β -sitosterol	B	+++	++
Mono and sesquiterpenes	Thymol	C	-	-
Alkaloids	Pilocarpine	A	-	-
Coumarins	Coumarin	D	-	-
Condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins	Catechin	A	-	++

A: AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:27 v/v); B: Toluene:AcOEt (90:10 v/v); C: Toluene:AcOEt (97:03 v/v); D: CHCl₃-MeOH (98:2 v/v). (+) = Presence and (-) = Absence; (+) = low, (++) = intermediate, (+++) = high.

The Table 2 summarizes the results from the quantitative determination of phenolic and flavonoids as well as the effect of extracts from on the DPPH, ABTS free radical scavenging and phosphomolybdenum.

Table 2. Total phenolic content (TPC), total flavonoid (TF) DPPH, ABTS and TAA of extracts from *Spondias tuberosa*. Mean $\pm$ SD (n = 3).

Sample	TPC (mgGAE/g)	TF(mg QE/g)	DPPH %	ABTS %	TAA %
Fruits	43.67 $\pm$ 1.3	6.58 $\pm$ 0.2	2.01 $\pm$ 1.6	55.14 $\pm$ 3.0	21.26 $\pm$ 1.3
Branches	83.88 $\pm$ 0.2	11.24 $\pm$ 2.0	88.80 $\pm$ 0.4	68.92 0.7	27.94 $\pm$ 0.26

Values are given as mean $\pm$ SD (n=3).

In agreement with the secondary metabolites classes found in the ethyl acetate of *S. tuberosa*, significant contents of phenolic compounds and flavonoids were found. These the major classes of secondary metabolites found in the genus *Spondias* (21).

Flavonoids are important bioactive compounds from plants biosynthesized from the phenylpropanoids way (22). This group of secondary metabolites can be highlighted with a high therapeutic potential, such as antioxidant, anti-inflammatory and inhibiting unregulated cell proliferation (22), demonstrating the importance of this class of substance found in the extracts of *S. tuberosa*. Due to the better results presented by ethyl acetate extract of branches, it was realized HPLC analysis. The quantification of the phenolic compounds from the chromatographic profile (fingerprint) obtained by HPLC-DAD is shown in the table below (Table 4).

The hemolytic assay showed these extracts did not exhibit hemolytic activity since the extract of the fruits and branches have maximum degrees of hemolysis of 3.127% and 0.043%, respectively, at a concentration of 1000 μ g/mL. Hemolysis refers to the lysis or rupture of red blood cell membranes allowing the release of hemoglobin into plasma. The absence of hemolytic activity in human erythrocytes from unprocessed extracts suggest that in the analyzed concentrations they did not have the lysis capacity of the red blood cells.

The SPF values were calculated. The extract obtained from the fruits (FPS: 0.83 $\pm$ 0.11), values obtained were not significant, according to the National Health

Surveillance Agency (23), which indicates 6.0 for the minimum value for SPF for sunscreen products. On the other hand, the SPF values obtained with the branches extract was 15.50 ± 0.41 , which is beyond the indicated in the National Health Surveillance Agency (23), demonstrating the biotechnological potential of this species.

This important data can be related to the content of total phenolic compounds and antioxidant activity. Since studies have shown that plants that absorb in the ultraviolet region have in their composition different molecules, highlighting metabolites such as flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids and polyphenols (24). The ethyl acetate extract of the branches possess in its composition great amounts of phenolic compounds. According to Costa (25) the presence of the metabolite indicates a potential absorption of UV radiation.

The heightened production of ROS due to UV radiation results in oxidative damage to macromolecules, proteins and lipids (26), activating or inactivating enzymes and changing signaling cascades.

An important point to prevent skin damage induced by UV radiation is the application of compounds with antioxidant activity. Among these are compounds include those derived from plant extracts. The combination of polyphenols in sunscreens and in products for skin care could provide an effective strategy to reduce these harmful effects and thus help prevent skin cancer and photoaging due to exposure to sunlight (27, 28).

Antioxidants act by different mechanisms sunscreens, providing protection to the skin through the cellular response modulation, and combination of these would provide better sunscreen effect to the skin (29).

Due to the better results presented by ethyl acetate extract of branches, it was realized HPLC analysis. The quantification of the phenolic compounds from the chromatographic profile (fingerprint) obtained by HPLC-DAD is shown in the table below (Table 3).

Table 3. Major phenolic compounds identified in ethyl acetate extract of *S. tuberosa* by HPLC.

Compounds	Retention time (min)	Content (µg/mg)
Gallic acid	1.81	19.4
Chlorogenic acid	4.24	106.2
Caffeic acid	5.44	2.36
Ferulic acid-t	8.36	6.88
Ellagic acid	8.42	1.5

The HPLC analysis demonstrates important bioactive substances present in the extract of *S. tuberosa*. Mainly constituted by phenolic compounds, the extract demonstrated important results for the antioxidant and photoprotective evaluation. Many studies have shown that polyphenolic compounds extracted are effective antioxidants in vitro (30, 31).

Chlorogenic acid, the major compound among the phenolics analyzed in this study, showed anti-diabetic and anti-lipidemic effects (32, 33), corroborating the traditional use of this plant (2). Granado-Serrano (34) showed that chlorogenic acid decreased the formation of ROS and increased glutathione levels in hepatoma cells. Murine keratinocytes when exposed to UVB radiation and treated with chlorogenic acid present reduction of AP-1 and NF-κB and MAPK phosphorylation (JNK, p38, ERK, MKK4) (35).

The results of this study indicate that *S. tuberosa* contain important phenolic compounds which can serve as antioxidants and photoprotective agents. The phenolic compounds present in the extracts could be responsible by photoprotective effect presented in this study, mainly for the ethyl acetate extract of the branches, and showed no hemolytic activity, there is need for further studies for future activities that best prove the photoprotective effect of *S. tuberosa*. These data indicate the great biochemical and biotechnological potencial of *S. tuberosa*, and can aggregate chemical and medicinal value to a species native to the Caatinga forest. Further investigation of this species will be conducted to reach the substance responsible for antioxidant and photoprotective activities of extracts, for the future development of pharmaceuticals and cosmetics products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support given by the Laboratório de Produtos Naturais and Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Instituto Nacional do semiárido (INSA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Omena, C. M., B. Valentim I. B. Guedes, G. S. Rabelo, L. A. Mano, C. M. Bechara, E. J. H. Sawava, A. C. H. F. Trevisam, M. T. S. Costa, J. G. Ferreira, R. C. S. Sant'Ana, A. E. G. and M. O. F Goulart (2012) Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase and Cytotoxic Activities of Ethanol Extracts of Peel, Pulp and Seeds of Exotic Brazilian Fruits. *Food Res. Int.* 49, 334-344.
2. Siqueira, E. M., S. Félix-Silva, J. Araújo, L. M. L. Fernandes, J. M. Cabral, B. Gomes, J. A. S. Roque, A. A. Tomaz, J. C. Lopes, N. P. Fernandes-Pedrosa, M. F. Giordani, R. B and S. M Zucolotto (2016) *Biomed Chromatogr.* 30, 1656–1665.
3. Vilela, F. M., P. Fonseca, Y. M. Vicentini, F. T. M. C. Fonseca, M. J. V. and M. P. H Amaral (2011) Determination of three ultraviolet filters in sunscreen formulations and from skin penetration studies by high-performance liquid chromatography. *Quim Nova*.34, 879-883.
4. Neto, J. R., L. Uchôa, A. D. A. Moura, P. A. Bezerra-Filho, C. M. Tenório, J. C. G. Silva, A. G. Ximenes, R. M. Silva, M. V. and M. T. S. Correia (2016) Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *J. Med. Plants Res.* 10, 409-416.
5. Cooper-Driver, G. A. (2001) Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochem*, 56, 229–236.
6. Oliveira-Júnior, R. G. Araújo, C. S. Souza, G. R. Guimarães, A. L. Oliveira, A. P. Lima-Saraiva, S. R. G. Moraes, A. C. S. Santos, J. S. R. and J. R. G. S Almeida (2013) In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *J. Appl. Pharm. Sci.* 3, 122-127.
7. Popim, R. C. Corrente, J. E. Marino, J. A. G and C. A. Souza (2008) Skin cancer: use of preventive measures and demographic profile of a risk group in the city of Botucatu. *Ciênc. Saúde Colet.* 13, 1331-1336.

8. Oliveira-Júnior, R. G and J. R. G. S Almeida (2012) Technological prospecting of photoprotective derived from natural products. GEINTEC.3, 32-40.
9. Violante, I. M., P. Souza, I. M. Venturini, C. L. Ramalho, A. F. S. Santos, R. A. N. and M. Ferrari (2009) In vitro photoprotective activity of plant extracts of Mato Grosso cerrado. Rev Bras Farmacog. 19, 452-457.
10. Li, A. B. Wonga, C. C. Ka-Wing, C and F. Chen (2008) Antioxidant Properties in vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. Swiss. Soc. Food Sci. Technol. 41, 385-390.
11. Woisky, R. G and A. Salatino (1998) Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. J. of Apicul. Res. 37, 99-105.
12. Harborne, J. B (1998) Phytochemical Methods. (Chapman & Hall, Londres). 3rd Edition.
13. Roberts, E. A., H (1957) Cartwright RA, Oldschool M. Phenolic Substances of Manufactured Tea. I. Fractionation and Paper Chromatography of Water-Soluble Substances. Sc.of Food and Agricult. 8, 72-80.
14. Uchôa, A. D., A. Oliveira, E. F. Pereira, A. P. C. Silva, A. G. Cordeiro, B. M. P. C. Malafaia, C. B. Almeida, C. M. A. Silva, N. H. Albuquerque, J. F. C. Silva, M. V. and M. T. S Correia (2015) Antioxidant Activity and Phytochemical Profile of *Spondias tuberosa* Arruda Leaves Extracts. American J. of Plant Sc. 6, 3038-3044.
15. Brand-Williams, W. Cuvelier, M. E. and C. Berset (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Food Sc. and Tec. 28, 25-30.
16. Prieto, P. Pineda, M. and M. Aguilar (1999) Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Anal. Bioch. 269, 337-341.
17. De-Qiang, D. Zheng, X. Guang, Y. Jian-Feng, Z. Ying-Kun, Q. Jing-Xian, Y. and K. TingGuo (2011) Prediagnostic methods for the hemolysis of herbal medicine injection. J. of Ethnopharmacol. 138, 445–450.
18. Mansur, J. S. Breder, M. V. R. Mansur, M. C. A. and R. D. Azulay (1986) Determination of the sun protection factor by spectrophotometry. An. Bras. Dermatol. 61, 121-124.
19. Machado, H. Nagem, T. J. Peters, V. M. Fonseca, C. S. and T. T Oliveira (2008) Flavonoids and their therapeutic potential. Bol. Cent. Biol. Reprod. 27, 33-39.

20. Ramalho, V. C. and N. Jorge (2006) Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Quim. Nova.* 29, 755-760.
21. Silva, G. A. Brito, N. J. N. Santos, E. C. G. López, J. A. and M. G Almeida (2014) *Spondias* genre: botanical aspects, chemical composition and pharmacological potential. *Rev. de biol. farm.*10, 1.
22. Machado, H. Nagem, T. J. Peters, V. M. Fonseca, C. S. and T. T. Oliveira (2008) Flavonoids and their therapeutic potential. *Bol. Cent. Biol. Reprod.* 27, 33-39.
23. Brazil. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency (2012). Approves the Mercosur Technical Regulation on Sunscreens in Cosmetics and other measures (Resolution RDC No. 30 of June 1, 2012).
24. Violante, I. M., P. Souza, I. M. Venturini, C. L. Ramalho, A. F. S. Santos, R. A. N. and M. Ferrari (2009) "In vitro sunscreen activity evaluation of plants extracts from Mato Grosso cerrado. *Rev. bras. farmacogn.* 19, 452-457.
25. Costa, S. C., C. Detoni, C. B. Branco, C. R. C. Botura, M. B. and A. Branco (2015) In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. 25, 413–418.
26. Sander, C. S. Chang, H. Salzmann, S. Muller, C. S. Ekanayake-Mudiyansele, S. Elsner, P. and J. J. Thiele (2010) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 118, 618-25.
27. Nichols, J. A. and S. K. Katiyar (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* 302, 71–83.
28. Heo, M. Y. Kim, S. H. Yang, H.E. Lee, S. H. Jo, B. K. and H. P. Kim (2001) Protection against ultraviolet B- and Cinduced DNA damage and skin Carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. *Mutat Res.* 496, 47–59.
29. Murray, J. C. Burch, J. Á. Streilein, R. D. Iannacchione, M. A. Hall, R. P. and S. R. Pinnell (2008) A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation . *J Am Acad Dermatol*, 59, 418–425.
30. Kähkönen, M. P. Hopia, A. I. Vuorela, H. J. Rauha, J. P. Pihlaja, K. Kujala, T. S. and M. Heinonen (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962.

31. Rice-Evans, C. A. Miller, N. K. and G. Paganga (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.
32. Ong, K. W. Hsu, A. and B. K. H. Tan (2013) Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1341-1351.
33. Meng, S. Cao, J. Feng, Q. Peng, J. and Y. Hu (2013) Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2013, 1-11.
34. Granado-Serrano, A. B. Martián, M. A., Izquierdo-Pulido, M. Goya, L. Bravo, L. and S. Ramos (2007) Molecular Mechanisms of (-)-Epicatechin and Chlorogenic Acid on the Regulation of the Apoptotic and Survival/Proliferation Pathways in a Human Hepatoma Cell Line. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2020-2027.
35. Feng, R. Lu, Y. Bowman, L. L. Qian, Y. Castranova, V. and M. Ding (2005) Inhibition of activator protein-, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem.* 280, 27888–27895.

3.3 ANTIOXIDANT ACTIVITY AND EVALUATION OF THE GASTROPROTECTIVE EFFECT *IN VIVO* OF METHANOLIC EXTRACTS OF THE BRANCHES OF *Spondias tuberosa* ARRUDA

Amanda Dias de Araújo¹, Fernanda Granja da Silva Oliveira², Alexandre Gomes da Silva², Nicácio Henrique da Silva¹, Wolfgang Harand, Márcia Vanusa da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia.

1. Departamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Núcleo de estudos e pesquisas de plantas medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.
3. Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Campina Grande-PB, Brasil.

*Autor correspondente

Amanda Dias de Araújo

Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil. Telefone: (55) 81 2126-8936, e-mail: amandabiologa@gmail.com

Abstract

The objective of this research was to investigate the antioxidant properties of the methanolic extract of “umbu” branches against gastric ulcers induced by ethanol in mice. The antioxidant activities were evaluated *in vitro* using different methods of free radicals scavenging: DPPH, ABTS and the reduction of transition metal by phosphomolybdenum assay. Measurements of total phenolic compounds, flavonoids and tannins were also made. The identification of classes of compounds was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Was performed acute toxicity test in accordance with OECD n°423. The investigation of the gastroprotective effects of the extract against ethanol-induced lesions was performed in Swiss mice. The animals were pretreated orally with vehicle, lansoprazole (30 mg / kg) and methanolic extract of the branches (50, 100, 200 mg / kg). The stomachs were removed and opened along the greater curvature to determine the area of the ulcerative lesion. The methanolic extract of the branches showed a great antioxidant activity. The group treated with the extract showed significant gastroprotection compared with the vehicle-treated group. HPLC analysis showed the presence of: gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, t-ferulic acid. In conclusion, the oral treatment with the methanolic extract of the branches showed gastroprotective and antioxidant activities because of the phytochemicals present in the extracts. This study is the first report of the gastroprotective effect of *Spondias tuberosa* Arruda.

Key Words: *Spondias tuberosa*, umbu, photoprotection, hemolytic activity, antioxidants.

Introduction

Antioxidants have been recognized for their protective functions against oxidative damage, and are associated with reduction of chronic diseases [1]. Gastric ulcers, gastric diseases are considered a global health problem which affects approximately 14.5 million people worldwide [2]. Its occurrence is largely genetic, endogenous factors (pathophysiological disturbance) and exogenous factors (*Helicobacter pylori* infection, stress, smoking, alcohol consumption and use of non steroids anti-inflammatory NSAIDs) [3]. Moreover, the body has defense mechanisms (mucus- bicarbonate barrier, phospholipids, epithelial surface coating, lipoprotein layer of the membrane, blood flow, synthesis of prostaglandins, nitric oxide and antioxidant system) protecting the mucosa from injury [4].

Ethanol is commonly used to induce ulcers in experimental animals. Ethanol leads to severe damage of the gastric mucosa, directly and indirectly through mediators such as reactive oxygen species (ROS) and cytokines [5].

There are numerous secondary effects associated with drugs used to treat ulcers, including arrhythmia, impotence, gynecomastia and haematopoietic disorders. Therefore, new approaches have been sought to improve the efficiency of current drugs or to discover new potential agents that are more effective, less expensive and have fewer side effects associated with the health of the currently used [6].

Spondias tuberosa Arruda (Anacardiaceae), known as "umbuzeiro" is a tropical plant that plays an important role in the Northeast of Brazil, being an important nutritional resource. [7] This species has a very important ecological, social and economic. In folk medicine, the plant is widely used as antioxidant [8], antibacterials [9] antiinflammatory [10].

S. tuberosa is rich in flavonoids and flavonoids are a group of naturally occurring secondary metabolites and have numerous pharmacological effects (anti-inflammatory, antimicrobial and gastroprotective) and prevents the formation of gastric ulcers by several mechanisms including antioxidant mechanisms [11].

This study aimed to evaluate the antioxidant activity *in vitro* and investigate the gastroprotective effects of methanolic extract from the branches of *S. tuberosa* against gastric ulcers induced by ethanol in mice. Also it was carried out phytochemical analysis to check the compounds present in the extract.

Materials and methods

1. Collection of plant material

The plant was collected in Catimbau National Park, Pernambuco, Northeastern Brazil. The plant has been identified and authenticated in the Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), with the number of voucher 91090.

2. Preparation of methanolic extract of branches (MEB)

The branches were dried in an oven at 45 °C. The material was milled using a mill (Tecnal / Willye mill / ET-650) to obtain powder. The extracts were obtained in a Puller Accelerated Solvent (ASE 350 Dionex). The extracts were concentrated under a stream of nitrogen in a heating block at 60 °C. Twenty grams of powder was transferred to cells and ASE, extracted with methanol and then dried at 50 °C using a rotary evaporator.

3. Determination of total phenols

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method. Two hundred microliters of the diluted samples was added to 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent 1:10. After 4 min, there was added 800 µL of saturated sodium carbonate solution (75g / L). After 2 h incubation at room temperature and protected from light, the absorbance was measured at 765 nm. Gallic acid (0 - 500 mg / L) was used to construct the standard curve. The results were expressed in mg equivalents of gallic acid (GAE mg) / g dry weight of plant extract. [12]. The determinations were performed in triplicate.

4. Determination of flavonoids

The flavonoid content was measured by the colorimetric method of aluminum chloride. Five hundred microliters of the diluted sample was added 500 µL of AlCl_3 solution prepared in 2% methanol. After 30 min and incubation at room temperature and protected from light, the absorbance was measured at 420 nm. The flavonoid content was estimated using a standard curve of quercetin (5-35 mg / ml) and results were expressed in milligram equivalents of quercetin (QE mg) / g dry weight of plant extract. [13]. The measurements were performed in triplicate.

5. Determination of condensed tannins

The condensed tannin (TC) content in the extract was determined using the method proposed by Hillis and Swain (14). 2 ml of vanillin reagent (1 g vanillin dissolved in 70% sulfuric acid) was mixed with 1 ml of the extract. Shortly after, it was incubated at 50 °C temperature for 20 minutes, the absorbance was measured at 500 nm. The results were expressed as milligrams of catechin equivalent (CE mg) / g dry weight of plant extract. The determinations were performed in triplicate.

6. ABTS Assay

For the ABTS assay - 2,2-Azino-bis- (3 Ethylbenzothiazoline) -6-Sulfonic Acid; (Sigma-Aldrich), an oxidation reaction was performed, solution of ABTS, 7mM prepared stock plus potassium persulfate 140 mM (final concentration), the mixture was left in the dark at room temperature (23 °C - 25 °C) for 12 - 16 h (the time required for the formation of radicals) before use. The ABTS⁺ solution was diluted in ethanol to an absorbance of 0.7 ($\pm$ 0.02) at 734 nm. The effect of the antioxidant activity of the extract was performed using aliquots of 30 μ l by mixing with 3 ml of ABTS⁺ solution. The absorbances were measured at 734 nm at different time intervals (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as reference standard. The values of percent inhibition of oxidation were calculated and plotted versus the concentration of the reference antioxidant (Trolox) and expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, μ M). [15].

7. DPPH assay

DPPH solution was prepared ((2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich) in methanol (8 mg in 100 ml) having an absorbance of 0.6 to 0,7nm measures at 517 nm. In a 96-well plate was added 40 μ L of the extract at different concentrations (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.5) and 250 of the DPPH solution. For control was used methanol. Thirty minutes later, the absorbance was measured at 517 nm. Gallic acid was used as reference standard. The low absorbance of the reaction mixture indicates greater scavenging activity of free radicals [16]. The inhibition of DPPH was calculated using the following formula:

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(\text{Ac} - \text{Ae})}{\text{Ac}} \times 100$$

Where, Ac is the absorption of the control. Ae is the absorbance of the extract.

8. Phosphomolybdenum Assay

For the evaluation of total antioxidant activity (TAA%) the method of phosphomolybdenum complex was used [17]. An aliquot of 0.1 ml of the sample solution was combined with 1 ml reagent solution (600 mM of sulfuric acid, sodium phosphate 28 mM and ammonium molybdate 4 mM). The tubes were closed and taken to a water bath at 90 °C for 90 min. Then the absorbance was measured at 695 nm. For control was used 1 ml of reagent and 0.1 ml of solvent used to dilute the extract. The total antioxidant activity was expressed in relation to ascorbic acid and calculated by the following formula:

$$\% \text{ TAC} = \frac{(\text{Ae} - \text{Ac})}{(\text{Aaa} - \text{Ac})} \times 100$$

Where Ae is the absorbance of the extract, Ac is the absorbance of control and Aaa absorbance of ascorbic acid.

9. HPLC

The chromatographic separation was performed with a liquid chromatograph Agilent Technologies high efficiency brand model 1260 LC INFINITY SYSTEMS with quaternary pump, photodiode arrays detector (DAD) with automatic injector. Data were processed in Agilent OpenLAB CDS software (EZChrom Edition). Vers. A.04.05. Zorbax SB C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm) with a mobile phase gradient of 0.3% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (B) gradient was used: 0 min: 92% A, 15 min : 65% A. The flow was maintained constant at 2.4 mL / min and detection carried out at 256 to acquire UV spectra in the range of 200-400 nm. Column Temperature: 30 ± 0.8 °C. Pressure: 400 bar.

10. Animals

Swiss male (*Mus musculus*) weighing 25-30 g, obtained from the Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE were fed with Presence® diet and free

water access, subject to clear/dark cycles of 12 hours and temperature of 21 ± 2 °C. Before the experiments, animals were subjected to fasting for 16 hours and housed in fasting cages to prevent coprophagy. No anesthesia was done before the oral administration. After the assay, the animals were sacrificed in a chamber pre-saturated with CO₂. All efforts were made to minimize animal suffering. The experimental protocol followed the recommendations of the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) and was approved by the Animal Ethics Committee of UFPE.

11. Acute preclinical toxicology assay

This experiment was performed according to the standards described in the OECD No. 423 and Resolution No. 90 (2004) which provides for the publication of the "Guide for conducting studies of pre-clinical toxicity of phytotherapics" [18]. The animals were subjected to fasting 12 hours and divided into 4 groups (n = 6). The groups received vehicle (0.9% NaCl) as the negative control, or a MEB single dose of 2000 mg / kg orally (gavage). In order to assess the behavioral changes in the SNC and SNA as well as the occurrence of death, behavioral parameters were noted during the first four hours, and once a day until complete 72 hours as recommended by Almeida [19]. During the 14 days of observation, were measured daily water consumption, feed and the weight of the animals. At the end of this period, the animals were euthanized and their organs removed (liver, spleen and kidneys), weighed and examined macroscopically.

12. Gastric ulcers induced by ethanol

Mice (n = 6) were subjected to fasting for 16 hours and divided into groups pretreated orally with vehicle (0.9% NaCl 10 ml / kg) as a negative control, lansoprazole (30 mg / kg) or MEB in the doses 50, 100 and 200 mg / kg. After 50 minutes, it was administered 0.2 ml of a solution of absolute ethanol damaging agent, orally, and one hour later the animals were euthanized. The stomachs were removed, opened along the greater curvature, washed and photographed to determine the ulcerative lesion area (ULA - mm²) [20] using computerized planimetry and software *ImageJ*.

13. Statistical analysis

Quantification of total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activities were performed in triplicate. The values expressed are the average of three replicates with standard deviation. In gastroprotective study, the results were expressed as average $\pm$ s.d. and it was held analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test and analyzed with GraphPad Prism version 5.0.

Results and discussion

The results showed the presence of phenolic compounds in the MEB of *S. tuberosa* (Table 1) and its yield was 26.33%. The extract is rich in phenolic compounds among them flavonoids and tannins. Flavonoids are responsible for antioxidant activity a high amount present in an extract suggestt a good antioxidant activity. Numerous studies have shown a strong relationship between the content of total phenolics and antioxidant activity in fruits, vegetables and medicinal plants [21].

Phenolic compounds are the main plant compounds with high potential antioxidant activity. This activity is due to their ability to scavenge and neutralize free radicals. [22] The ability to capture free radicals is attributed their redox properties. [23].

Table 1. Determination of the compounds in methanolic extract of branches (MEB) of *S. tuberosa*

Compounds	MEB
Total phenolic compounds (mg EAG)/g	193.953 $\pm$ 0,1
Flavonoids (mg EQ)/g	21.610 $\pm$ 0,7
Tannins (mg EC)	87.110 $\pm$ 1,5

The results were expressed as average $\pm$ s.d., n = 3. EAG: the equivalent of gallic acid. EQ: equivalent to quercetin. EC: equivalent to catechin.

Epidemiological studies have suggested an association between the consumption of chlorogenic acid in food and disease prevention [24]. The study of the Itagaki et al 2010 (25) shows the antioxidant activity of chlorogenic acidin vitro and in vivo, and major role in the protective effect against ischemia–reperfusion injury. The high-performance liquid chromatography showed the presence of secondary

metabolites. The retention times of the standards are indicated in Table 2. The results obtained showed the presence of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and Ferulic Acid. All these compounds are considering phyto antioxidants [26].

Table 2. Compounds identified in MEB of *S. tuberosa* by HPLC.

Phenolic component	Retention time (min.)	Content (µg/mg de extract)
Gallic acid	1.81	9.8
Chlorogenic acid	4.24	33.6
Catechin	4.45	25.2
Caffeic acid	5.44	4.8
Rutina	8.20	0.82
t- Ferulic acid	8.36	3.22

The elimination capacity of the radical cation ABTS of the extract and of the Trolox were evaluated. The TEAC values ranged from 1678.89 ± 24.11 to 2145.56 ± 10.18 µM Trolox with inhibition percentage of 78.05 ± 0.99 to 97.33 ± 0.42 in function of time, with scavenging free radicals until 120 minutes (Figure 1). After two hours the activity remained constant, showing that the extract has a good stability. In the study of Almeida [27], it was observed antioxidant activity of the fruits of *S. tuberosa*, which shows that the species has a good antioxidant action. In other studies it was shown that *Spondias* genus has a great pharmacological potential [28].

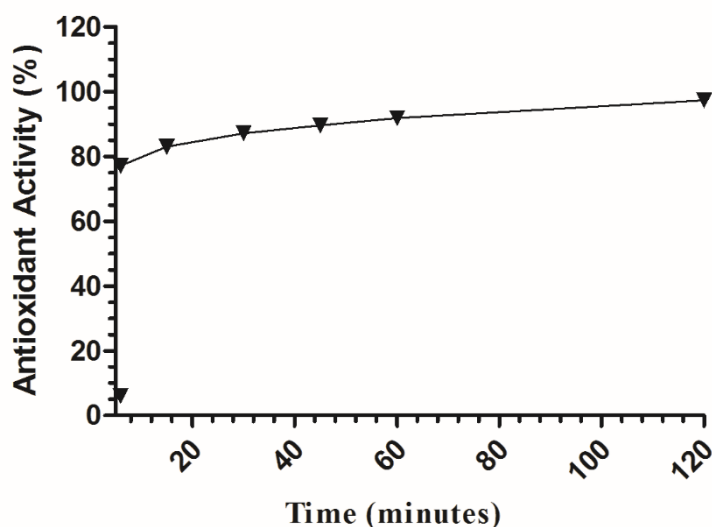


Figure 1. Effect of the incubation time on antioxidant activity of MEB of *S. tuberosa*

DPPH is a relatively stable radical and has been widely used to test the ability of compounds to act as free radical scavengers and hydrogen donors, and, thus to evaluate the antioxidant activity [29]. The capacity of reduction of DPPH radical is determined by the decrease in its absorbance at 517 nm [30]. The extract showed antiradical activity dependent of the concentration reducing the stable DPPH to yellowish derivative color of the diphenylpicrylhydrazyl (Table 3).

Table 3. Antioxidant Activity by DPPH in different concentrations. Average $\pm$ S.D. (n = 3).

Concentration methanol extract ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH RFR%
1000	90.29 $\pm$ 0.22
500	88.36 $\pm$ 0.50
250	87.01 $\pm$ 1.50
125	59.57 $\pm$ 4.33
62.5	34.56 $\pm$ 1.72
31.25	32.83 $\pm$ 1.65

SFR %: Percentage of DPPH radical scavenging in 30 min

The MEB showed significant activity even at low concentrations. A number of hydroxyl groups increases the radical scavenging activity due to the fact that a number of hydrogen atoms of phenolic hydroxyl groups can be donated to stabilize free radicals

[31]. Both trials (ABTS and DPPH) showed that the extract has a great antioxidant potential.

The phosphomolybdenum method is based on the reduction of molybdenum (VI) to molybdenum (V) that occurs in the presence of certain substances with antioxidant capacity, with formation of a green complex between phosphate / molybdenum (V) in acidic pH, which is determined spectrophotometrically at 695 nm. The assay was successfully used to quantify vitamin E in seeds [32] and, as a simple and independent method of other antioxidant ratings, decided to extend its application to plant polyphenols. Greater absorbance indicates a higher antioxidant activity (33). The MEB of *S. tuberosa* presented % TAA of 34.98431 ± 0.06 .

The MEB did not alter the body mass of animals. During treatment, there were no clinical signs of toxicity and no death was recorded, as well as no change in water consumption and animal feed. The results show that oral administration of the extract did not produce toxic effects in adult Swiss mice. Moreover, the general activity of the mice were not altered.

Oxidative stress is believed to initiate and aggravate many digestive system diseases, including stomach ulcers and gastric carcinoma. Especially, ethanol-induced gastric damage has been suggested to be mediated by the generation of free radicals (34). Absolute ethanol acts in multifactorial way and when metabolized by the body, it releases free radicals that extensively damage the gastric mucosa, promoting erosion, cell exfoliation, appearance of haemorrhagic petechiae and break the mucus-bicarbonate barrier, thus causing innumerable damage to membrane [35].

This study investigated the potential of MEB of *S. tuberosa* as protector of the gastric mucosa in gastric ulcer model induced by ethanol in mice. Figure 2 shows that lansoprazole and the extract at doses of 50, 100 and 200 mg / kg protected the gastric mucosa in 73.82%; 73.74%, 72.02% and 72.4%, respectively, compared to the group pre-treated with 0.9% NaCl solution. The development of drug from compounds obtained from plants with gastroprotective effect is an alternative of treatment with less adverse effect.

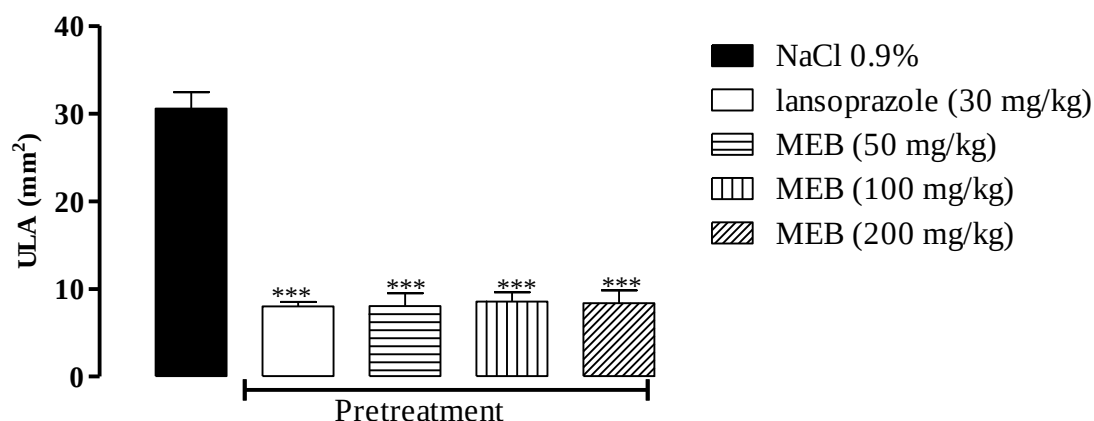


Figure 2. Effect of the orally pretreatment of MEB of *Spondias tuberosa* gastric lesions induced by ethanol in mice. The results are expressed as the mean $\pm$ d.p. ANOVA followed by Dunnet test, *** $p < 0.001$ ($n=6$).

There is evidence that ethanol administration promotes oxidative stress by increasing ROS and decreasing cellular oxidative defenses in a process triggered by activation of neutrophils, causing a sequential induction of ROS mediated by lipid peroxidation and protein oxidation. [36]. Several compounds of vegetable origin (flavonoids, saponines, tannins, gums and mucilages) show antiulcer activity [37].

According to Potrich [38] cited these compounds may have both anti-inflammatory activity and anti-ulcer, an advantage over traditional anti-inflammatory drugs that mostly are ulcerogenic. Due to the generation of ROS, the administration of absolute ethanol causes an inflammatory response is the result of a complex chain of events involving immune response, which releases a number of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) [2].

The process the gastric ulceris induced by ethanol is responsible for generating free radicals, resulting in an acute inflammation of the gastric tissue [35]. The gastroprotection induced extract can be explained by the powerful antioxidant activity. There are several reports in the literature that the administration of natural products antioxidants can prevent gastric lesions induced by ethanol action [39]. This study proved that the MEB *S. tuberosa* acts as a natural antioxidant with gastroprotective action. This can be attributed to their secondary metabolites, such as gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, t-ferulic acid.

The results indicate that the MEB of *Spondias tuberosa* has gastroprotective activity in acute gastric injury models induced by ethanol which can be related to its powerful antioxidant activity. In addition, it contains molecules with great biotechnological potential for the development of new drugs with potential application in the prevention and treatment of pathologies triggered by the action of free radicals.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support given by the Laboratório de Produtos Naturais and Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Instituto Nacional do semiárido (INSA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Sotelo T, Cartea ME, Velasco P, Soengas P (2014) Identification of Antioxidant Capacity -Related QTLs in Brassica oleracea. PLoS ONE 9(9): e107290.
2. Rozza AL, Meira de Faria F, Souza Brito AR, Pellizzon CH (2014) The Gastroprotective Effect of Menthol: Involvement of Anti-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. PLoS ONE 9(1): e86686.
3. Carvalho, AST. (2000) Úlcera péptica. Jornal de Pediatria 76:127–134.
4. Potrich FB (2009) Atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.: envolvimento do sistema antioxidante. Curitiba. Brazil.
5. Rozza AL, Meira de Faria F, Souza Brito AR, Pellizzon CH (2014) The Gastroprotective Effect of Menthol: Involvement of Anti-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. PLoS ONE 9(1): e86686.
6. Saad BA, Nagla AE, Aymn TA, Umama AA, Soad SA, Soad KA, Steve H (2016) Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiulcer Potential of Manuka Honey against Gastric Ulcer in Rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016.
7. Omena CMB, Valentim, IB, Guedes GS, Rabelo LA, Mano CM, Bechara EJH, Sawava ACHF, Trevisam, MTS, Costa JG, Ferreira RCS, Sant'Ana AEG, Goulart MOF (2012) Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase and Cytotoxic Activities of Ethanol Extracts of Peel, Pulp and Seeds of Exotic Brazilian Fruits Antioxidant, anti-Acetylcholinesterase and Cytotoxic Activities in Fruits. Food Research International 49:334-344.
8. Uchôa ADA, Oliveira EF, Pereira APC, Silva AG, Cordeiro BMPC, et al., (2015) Antioxidant Activity and Phytochemical Profile of *Spondias tuberosa* Arruda Leaves Extracts. American Journal of Plant Sciences 6: 3038-3044.
9. Silva AR, Morais SM, Marques MM, Oliviera DF, Barros CC, et al, (2012) Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. Pharm Biol 50(6):740-6
10. Siqueira EMS, Felix-Silva J, Araújo LM, Fernandes JM, Cabral B, et al., (2016). *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. Biomed Chromatogr 10.1002/bmc.3738.

11. Mota KS, Dias GEN, Pinto A, Luiz-Ferreira ARM, Souza Brito CA, et al., (2009) Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14:979–1012.
12. Li AB, Wonga CC, Ka-Wing C, Chen F (2008) Antioxidant Properties *in Vitro* and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Swiss Society of Food Science and Technology* 41:385-390.
13. Woisky RG, and Salatino A (1998) Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105.
14. Swain T, Hillis WE (1959). The phenolics constituents of *prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolics constituents. *J. Sci. F. Agric.* 10: 63–68
15. Uchôa ADA, Oliveira EF, Pereira APC, Silva AG, Cordeiro BMPC, et al., (2015) Antioxidant Activity and Phytochemical Profile of *Spondias tuberosa* Arruda Leaves Extracts. *American Journal of Plant Sciences* 6: 3038-3044.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology* 28:25-30.
17. Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) gSpectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269:337-341.
18. Organisation for economic cooperation and development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.
19. Almeida RN, Falcão ACGM, Diniz RST, Quintans-Júnior LJ, Polari RN, et al., (1999). Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farm* 80: 72-76.
20. Mizui T, and Douteuchi M (1983) Effect of polyamines on acidified ethanol induced gastric lesions in rats. *Jpn. J. Pharmacol* 33: 939-945.
21. Berłowski A, Zawada K, Wawer I, Paradowska K (2013) Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences* 4:71-77.
22. Deepa G, Ayesha S, Muley A, Thankamani M (2012) *In-vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. *Free Rad. Antiox* 2:41-46.

23. Rice-Evans, Miller C, Pagana NG (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152–9.
24. Garambone E, Glorimar R (2007) Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alim. Nutr, Araraquara* 18:229-235.
25. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T et al (2011) In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm.* 403:1-2.
26. Brandwilliams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 28:25–bn30.
27. Almeida MMB, Sousa PHM, Arriaga AMC, Prado GM, Magalhães CEC et al (2011) Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fresh Exotic Fruits from Northeastern Brazil. *Food Research International*, 44:2155-2159.
28. Silva AR, Morais S, Marques MM, Oliveira DF, Barros CC, et al.,(2012) Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharmaceutical Biology* 6: 740–6.
29. Rieger G, Müller M, Guttenberger H, Bucar F (2008) Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compound in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:9080–9086.
30. Borges LL, Tathiana Carvalho Lucio TC, Gil ES, Barbosa EF (2011) Uma abordagem sobre metodos analiticos para determinacao da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer* 7((12):1-20.
31. Uchôa ADA, Oliveira EF, Pereira APC, Silva AG, Cordeiro BMPC, et al., (2015) Antioxidant Activity and Phytochemical Profile of *Spondias tuberosa* Arruda Leaves Extracts. *American Journal of Plant Sciences* 6: 3038-3044.
32. Albernaz LC, De Paula JE, Romero GAS, Silva MRR, Grellier P, et al (2010). Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology* 131(1):116-121.
33. Jao C H, and Ko WC (2002) 1,1-Diphenyl-2-picrylhdrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. *Fisher Science* 68:430–435.
34. Shaw S, Herbert V, Colman N, Jayatilleke E (1990) Effect of ethanol-generated free radicals on gastric intrinsic factor and glutathione. *Alcohol* 7:153-157.

35. Oyagi A, Ogawa K, Kakino M, Hara H (2010) Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10:2-9.
36. Loo AY, Jain K, Darah, I (2008) Antioxidant Activity of Compounds Isolated from the Pyroligneous Acid *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 107:1151-1160.
37. Borrelli F, Izzo AA. (2000) The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* 14:581-591.
38. Potrich FB, Allemand A, Da Silva LM, Dos Santos AC, Baggio CH, et al (2010). Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. *Journal of Ethnopharmacology* 130:85-92.
39. Rocha NF, Oliveira GV, Araújo FY, Rios ER, Carvalho AM, et al., (2011) (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci* 44(4): 455–61.

4 CONCLUSÃO

Os extratos de *Spondias tuberosa* Arruda apresentaram atividade antioxidante pelos métodos utilizados: ABTS, DPPH e fosfomolibdenio, resultados estes, se devem principalmente pela presença de compostos fenólicos (flavonoides e taninos) detectados nesta planta.

O extrato acetato de etila possui uma potente ação fotoprotetora, tornando esta planta uma opção para formulação de fármacos e cosméticos.

O extrato metanólico dos ramos possui atividade gastoprotetora em modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol, esta atividade pode ser atribuída à sua ação antioxidante.

Diante do estudo realizado podemos concluir que *Spondias tuberosa* Arruda possui um grande potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novas drogas com possível aplicação na prevenção e tratamento de diversas patologias.

REFERÊNCIAS

- AGRA M.F.; FREITAS P.F.; BARBOSA-FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, p.114-140, 2007.
- AJILA, C.M.; NAIDU, K.A.; BHAT, SG; RAO, UJS. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. V.105, 982-988, 2007
- ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALBUQUERQUE, U.P; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica**. São Paulo. Brasil. v. 16 n.3, 2002.
- ALLEGRETTI, S. M. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) D. **Experimental Parasitology**, v.132, p.135-43, 2012.
- ALMEIDA, M.M.B., SOUSA, P.H.M., ARRIAGA, A.M.C., PRADO, G.M., MAGALHÃES, C.E.C., MAIA, G.A. AND DE LEMOS, T.L.G. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fresh Exotic Fruits from Northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, p.2155-2159, 2011.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5 p. 450-513, 2013.
- ANDRADE, L.A.; PEREIRA, I. M; LEITE, U.T; BARBOSA, M.R.V. Análise da cobertura de duas fisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. *Cerne, Lavras*, v.11, n. 3, p. 253 – 262, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plantas medicinais e fitoterápicos: Uma resposta nacional**. Curitiba, Brasil. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/institucional/anvisa/atas:2005:23_120705.htm>. Acesso em: 03 nov. 2016.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. – Viçosa: UF. p.335, 2004.
- ARAÚJO, E.L., CASTRO, C.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Dynamics of Brazilian Caatinga e a Review Concerning Plants, Environment and People. **Functional Ecosystems and Communities**, v.1, p.15-28, 2007
- ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A

new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72–80, 2008.

ARNOUS, A.H; SANTOS, A.S; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço Para A Saúde**, v. 6, n. 2, p.1-6, 2005.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. **Chemotherapy**, v.58, p. 70-7, 2012.

AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, G. A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 101-124, 2013.

BAHIA, M.V. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R.; Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n.4 p.732-42. 2011

BARNETT, R. N., BONGIORNO, A., CLEVELAND, C. L., JOY, A., LANDMAN, U. E SCHUSTER, G. B. Oxidative damage to DNA: counterion-assisted addition of water to ionized DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v.28 p.10795-10800, 2006.

BARRETO, L.S. Conservação do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câmara) e de seus polinizadores no contexto agroecológico para a agricultura familiar indígena Pankararé no semi- árido. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1580-1583, 2007.

BHATTACHARYA, S., AHMED, K. E CHAKRABORTY, S. Free Radicals and Cardiovascular Diseases: An Update. **Free Radicals and Antioxidants**, v.1, p.17-22, 2011.

BIESKI, I.G.C. Plantas medicinais e aromáticas no Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá – MT. Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá – MT. **(Monografia)** - Especialização em Plantas Medicinais. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2005.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A.F.M.; EASA, A.M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1636–1641, 2008.

BILICI, M.; OZTURK, C.; DURSUN, H.; ALBAYRAK, F.; SAGLAM, M.B.; UYANIK, A.; GULABOGLU, M.; TEKIN, S.B. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. **Digestive Diseases and Sciences**, 2008.

BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; GOMES, R. C. M. & CAVALCANTI, N. B. 2006. Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. **Química Nova**, v. 2, n.1, p. 49-52, 2007.

BORGES, L.L.; LÚCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais, **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.7, n.12, p. 1-20, 2011.

BOULANOUAR, B.; ABDELAZIZ, G.; AZZA, S.; GAGO, C.; MIGUEL, M. G. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.46, p. 85– 96, 2013.

BRASIL, Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação. **Sinopse do censo demográfico para o Semiárido Brasileiro**. Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande – PB, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde). p.60, 2006.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefcf7d1535461/reso-lucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 04.nov.2015.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, p.416, 2010.

CALDERON, L.A. et al. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1001-1023, 2009.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, São Paulo, 2003.

CARRERA, C. R. Estudo bibliográfico sobre o potencial farmacológico de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **(Trabalho de Conclusão de Curso)** - Bacharelado em Farmácia - Universidade Feevale. Novo Hamburgo, 2010.

CARVALHEIRA, J.B.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.46, n.4, p.419-425, 2002

CARVALHO, A.S.T. Úlcera péptica. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 127 – 134, 2000

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**, p.480, 2004.

CASTROGIOVANNI P, IMBESI, R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. **Italian journal of anatomy and embryology**, v.117, p. 107-17.

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K. E OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v.80, p.249-255, 2003.

CORDEIRO, K. W.; PINTO, L. A.; FORMAGIO, A. S. N.; ANDRADE, S. F.; KASSUVA C. A. L.; FERITAS, K. C. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, p. 331-337, 2012.

CORREIA, S. J., DAVID, J. P., DAVID. J. M. Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 36-38, 2003.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; ALDENIR FEITOSA DOS SANTOS, A.F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR, Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.3, p.231-7, 2013.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

DAL'BELO, S.E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*. **(Tese)** – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2008.

DA SILVA, L. M. **Atividade gastroprotetora e efeito sobre a função motora gástrica de ratas das folhas de *Arctium lappa* L. (Bardana): um estudo sob condições normais e aumentadas de glicemia.** Tese (Doutorado em Ciências Biológica) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

DAVID, C.Q.J.M.; DAVID, J.P.; BHAIA, M.V; AGUIAR, AM.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

DEEPA, G.; AYESHA, S.; ADITYA, M.; THANKAMANI, M. *In-vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. **Free Radicals and Antioxidants**, v.2, Issue 3, 2012.

DE GRUIJL, F.R. PhotoCarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v.15, p.316–320, 2002.

DE LIMA, AA, SUSSUCHI, EM, DE GIOVANI, WF. Eletrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica Chemica Acta**, v.80, p.29-34. 2007.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay., **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

ISSN 0308-8146.

DERWICH, E., BENZIANE, Z., CHABIR, R. Aromatic and medicinal plants of Morocco: chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Juniperus phoenicea*. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.2, p.145–153, 2011.

DEVI, R.S.; NARAYAN, S.; VANI, G.; DEVI, C.S.S. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, p. 71 -83, 2007.

DI MAMBRO V.M.; FONSECA M.J.V. Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vivo* de formulações contendo extratos de *Ginkgo biloba* e *Glycyrrhiza glabra*. **XX Congresso Brasileiro de Cosmetologia**. São Paulo, Brasil. 2006

DINIZ, A.C B.D.; ASTARITA, L.V., SANTAREM, E R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, p. 443-450, 2007.

DOGRU, Z., NACAR, T., UNAL, D., AKSAK, S., ALBAYRAK, A., ODABASOGLU, F., CETIN, N., KARAKUS, E., GUNDOGDU, C., GUMUSTEKIN, K. E UNAL, B. Effects of diabetes mellitus and postmenopausal period on the lungs of rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.6: p.1989-2010, 2012.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 599 – 606, 2006.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 106, 135–146, 2005.

FERREIRA, V F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v.33, n. 9, p. 1829-1829, 2010,

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 42, p. 153 -164, 2007.

FRANCESCHINI FILHO, S. **Plantas terapêuticas**. São Paulo: Editora Organização Andrei, 2004.

FRUET, A.C. Avaliação do Efeito Fotoprotetor de Compostos Fenólicos sobre culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB. **(Tese) Doutorado em Fármacos e Medicamentos, área de Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo. 2015.

FORZZA, R.C. Introdução. **In Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do RJ, 2013.

GÁLVEZ, M.V.D. Antioxidantes en fotoprotección: realmente funcionan? **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 101, n. 3, p. 197-200, 2010.

GAMBETA, R. M. Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* st. Hilaire. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). **Erechim**, 2008.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; PRANDO, T. B.; LEME, T. S.; GASPAROTTO, F.M.; LOURENÇO, E. L.; RATTMANN, Y. D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; KASSUYA, C. A.; MARQUES, M. C. J. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. **Ethnopharmacol**, v.141, p. 501, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, p.127-33, 2012.

GOMES, W.A.; MENDONÇA, R.M.N.; SOUZA, E.P.; ESTRELA, M.A.; MELO, V.E.S.; SILVA, S.M.; SOUZA, A.P. Garfagem e diâmetro de porta-enxerto na obtenção de mudas de umbuzeiro do acesso laranja. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p.952-959, 2010.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G. e COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, n.1, p.206- 213, 2007.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p. 481-504, 2000.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v.13, n.19/20, p. 894-901, 2008.

HAZRA, S.; GHOSH, S.; DEBNATH, S.; SEVILLE, S.; PRAJAPATI, V. K.; WEIGHT, C. W.; SUNDAR, S.; HAZRA, B. Antileishmanial activity of cryptolepine analogues and apoptotic effects of 2,7-dibromocryptolepine against *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal Parasitology Research**, v.111, p.195, 2012.

HERNANDEZ-MONTES, E., POLLARD, S.E., VAUZOUR, D., JOFRE-MONTSENY, L., ROTA, C., RIMBACH, G., WEINBERG, P.D.E SPENCER, J.P.E. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,

v.346, p.851-859, 2006.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C.; **Princípios ativos de plantas superiores**, Ed. UFSC ar: São Carlos cap. 1, 2003.

INEU, R.P.; PEREIRA, M.E.; ASCHNER, M.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3023 – 3029, 2008.

JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sciences**, v. 80, p. 1040 - 1045, 2007.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advanceds in proton pump inhibitors and management of acidpeptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181 – 1205, 2007.

JÚNIOR, F. E. B.; OLIVEIRA, D. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; KAMDEM, J. P.; MACEDO, G. E.; SILVA, G. F.; MENEZES, I, R, A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodent: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 469-477, 2014.

KIM, K.W.; THOMAS, RL. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. 2006.

KLEIN-JÚNIOR, L.C.; SANTIN, J.R.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; CECHINEL-FILHO, V. The therapeutic lead potential of metabolites obtained from natural sources for the treatment of peptic ulcer. **Phytochemistry**. v. 11, p. 567-616, 2012.

KONRATH, E.L.; NEVES, B. M.; LUNARDI, P.S.; PASSOS, C.S.; SIMÕES-PIRES, A.; ORTEGA, M.G.; GONÇALVES, C.A.; CABRERA, J.L.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, A.T. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p.58-67, 2012.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI_FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LANG, Y.; CHEN, D.; LI, D.; ZHU, M.; XU, T.; ZHANG, T.; QIAN, W.; LUO, Y. J. Luteolin inhibited hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration by suppressing the src and akt signalling pathways.

Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.64, p.597-603, 2012.

LEE, L.T.; TSAI, Y.F.; HU, N.Y.; WANG, C.W.; HUANG, K.K.; HSIAO, J.K.; SHIH, Y.C.; MUNEKAZU, I. Anti-arthritis effect of mangostins from *G. Mangostana*.

Biomedicine & Preventive Nutrition, v. 3, p. 227–232, 2013.

LEJA, M, MARECZEK, A, WYZGOLIK, G, KLEPACZ-BANIAK, J, CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**. 100, 237-240. 2007.

LIMA, C.R.; VASCONCELOS, C.F.; COSTA-SILVA, J.H.; MARANHÃO, C.A.; COSTA, J.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; SOARES, L.A.; FERREIRA, F.; WANDERLEY, A G.J. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. Leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p. 517-25, 2012.

LIMA, D. F.; BRANDÃO, M. S.; MOURA, J. B.; LEITÃO, J. M.; CARVALHO, F. A.; MIÚRA, L. M.; LEITE, J. R.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, F. R. J. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Pharmaceutical Pharmacology**, v.64, p.283-92, 2012.

LINS NETO, E.M.F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U.P. Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): An Endemic Species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Economic botany**, v. 64, p. 11-21, 2010.

LIOCHEV SI. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology Medicine**, v.60, p.1-4, 2013.

LI, P.P.; LIU, D. D.; LIU, Y. J.; SONG, S. S.; WANG, Q. T.; CHANG, Y.; WU, Y. J.; CHEN, J. Y.; ZHAO, W. D.; ZHANG, L. L.; WEI, W. BAFF/BAFF-R involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis via PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p.290-300, 2012.

LOIOLA, M.I.B.; ROQUE, A.A.; OLIVEIRA, A.C. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Ecologi@**, v.4, p.14-19, 2012.

LOPES, M. F. Fisiologia da Maturação e Conservação Pós-Colheita do Aceso Umbu- Laranja (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara). **(Dissertação)** Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

LUZ, C. L. S. Anacardiaceae R. Br. na flora fanerogâmica do estado de São Paulo. **(Dissertação)** Mestrado em Botânica - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MACHADO, B.F.M.T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos gerais

e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAHDY, K.; SHAKER, O.; WAFAY, H.; NASSAR, Y.; HASSAN, H.; HUSSEIN, A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.3, p.31-42, 2012.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. **São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004.**

MALHOTRA, A.; NAIR, P.; DHAWAN, D. K. Premature mitochondrial senescence and related ultra structural changes during lung carcinogenesis modulation by curcumin and resveratrol. **Ultrastructural Pathology**, v.36, p.179-84, 2012.

MMA- Ministério do Meio Ambiente. Monitoramento dos biomas brasileiros: **Bioma Caatinga**. Brasília: MMA. 2010.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. CASTELLANI, D.C, DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. UFV; 2000.

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; WATANABE, S. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 434 – 441, 2007.

MEDEIROS, S. S.; CAVALCANTE, A. M.B.; MARIN, A. M. P.; TINÔCO, L. B. M.; SALCEDO, I. H.; PINTO, T. F. **Sinopse do Censo Demográfico para o Semiárido Brasileiro**. Campina Grande, PB: INSA, 2012.

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Technique**. v.53, p.3060-371, 2001.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v.130, p. 1036–1043, 2012.

MOREIRA, V.S. Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros *in natura* e encapsulado. **(Dissertação)** Mestrado em Engenharia de Alimentos, área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2013.

MOTAWI, T.K.; ELGAWAD, H.M.A. SHAHIN, N.N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 15, p. 405-412, 2008.

MULAUDZI, R.B.; NDHLALA, A.R.; KULKAMI, M.G.; VAN STADEN, J. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, 185-93. 2012.

NADIA, T.L., MACHADO, I.C. AND LOPES, A.V. Pollination of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) and Analysis of Pollinators Share with *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), Fruit Species Endemic to the Caatinga. **Brazilian Journal of Botany**, v.30, p.89-100, 2007.

NDHLALA, R., MOYO, M. E VAN STADEN, J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules. **Molecules**, v.15, p.6905-6930, 2010.

NICHOLS, J. A.; AND KATYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v.302, n.2, p.1-19, 2010.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, p.503-515, 2010.

NIU, X.; XING, W.; LI, W.; FAN, T.; HU, H.; LI, Y. *Int.* Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects in vivo and inhibited TNF- α production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages in vitro via the MAPK pathway. **Immunopharmacol**, v.14, p.164-71, 2012.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 59 – 65, 2006.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1017-1032, 2004.

OLIVEIRA, A.B.; LONGH, J.G.; ANDRADE, C.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 7, nº 2, 2006.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.17 n.1, 2015.

OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L.; SANTOS OLIVEIRA, A. S.; JUNIOR, I. M.; DE CARVALHO, J. E.; DE RUIZ, A. L.; JERALDO, V. L.; LINHARES, A. X.; SILVA, F. V.; GUIMARÃES, A. G.; SILVA, E. R.; SOUSA-NETO, B. P.; MACHADO, F. D.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; ARCANJO, D. D.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. J. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal of Medicinal Food**, v.15, p.984-91, 2012.

OMENA, C.M.B.; VALENTIM, I.B.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A.; MANO, C.M.;

BECHARA, E.J.H.; SAWAVA, A.C.H.F.; TREVISAM, M.T.S.; COSTA, J.G.; FERREIRA, R.C.S.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase and Cytotoxic Activities of Ethanol Extracts of Peel, Pulp and Seeds of Exotic Brazilian Fruits Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase and Cytotoxic Activities in Fruits. **Food Research International**, v. 49, p.334-344, 2012.

ORHAN, I. E. Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.2252-61, 2012.

PAN, J.S.; HE, S.Z.; XU, H.Z.; ZHAN, X.J.; YANG, X.N.; XIAO, H.M.; SHI, H.X.; REN, J.L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanolinduced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 5857 - 5867, 2008.

PESSOA, C. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Advances in Phytomedicine**, v.2, p. 197-211, 2006.

PRIETO, P., PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, 337-341, 1999.

POLITI F.A.Z, PIETRO R.C.L, MOREIRA R.R.D. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae). **(Dissertação)** Mestrado em Desenvolvimento de fármacos e medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L. M.; DOS SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MENDES, D. A.; ANDRE, E.; WERNER, M. F.; MARQUES, M. C. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 85-92, 2010.

POTRICH, F. B. Atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.: envolvimento do sistema antioxidante. **(Dissertação)** Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds.). Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, p. 3-73, 2003.

PRAKASH, D. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.58, n.1, p.18-28, 2007.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants, and cofactors. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v.2, p. 219-13, 2007.

RATNAM, D., ANKOLA, D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D. E KUMAR M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v.113, p.189-207, 2006.

RÊGO JÚNIOR, N. O. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

RISSATO, S.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, L. C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco, **Salusvita**, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.

ROBARDS, K., PRENZLER, P. D., TUCKER, G.; SWATSITANG, P. E GLOVER, W. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. **Food Chemistry**, v.66: 401-436, 1999.

ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, p.351-355, 2013.

RODRIGUES, A. C. F.; DA COSTA, J. F.; SILVA, A. L.; DO NASCIMENTO, E. P.; SILVA, F. R. G.; DE SOUZA, L. I. O.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p.43 – 53, 2013.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A.; Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235–254, 2005).

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p. 306-310, 2012.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. *Pothomorphe umbellata* Extract Prevents α -Tocopherol Depletion After UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, p.436, 2003.

ROSSI, A.B. Filtros solares e fotoproteção. **Revista Anfarmag**, v. 24, p.32-34, 2000.

ROZZA, A. L.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAKAHIRA, R.K.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C.H. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 202-278, 2013.

SAINT-EXUPERY, Antoine. O pequeno príncipe. Rio de Janeiro: Agir, 2005.

SANTOS, A. F. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p.43 – 53, 2013.

SANTOS-BUELGA, C. E SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds– nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1094-1117, 2000.

SANTOS, M.M.; NUNES, M.G.S.; MARTINS, R.D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.327-334, 2012.

SANTOS, M. R. A; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n.2, 2008.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. E PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.91 p. 21-40, (2001).

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudos das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção. São Paulo: **Tecnopress**, 2003.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and healthy promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, n.9, p.930-940, 2010.

SHIMOYAMA, A. T.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; SILVA, A. M. O.; MELO, I. L. P.; MANCINE-FILHO, J.; FARSKY, S. H. P. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, p. 5-14, 2013.

SILVA, A.R.A. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 406-413, 2011.

SILVA, B.S.; FERRERES, F.; MALVA, J.O.; DIAS, A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 157-167, 2005.

SILVA, C.J.D. Caracterização genética de Cajazeiras (*Spondias mombin* L.)

(Anacardiaceae) por meio de marcadores moleculares. **(Dissertação)** Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2009.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M.; Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v.34, n. 2, p. 300-5, 2011.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, G.A.; BRITO, N.J.N.; SANTOS, E.C.G, LÓPEZ, J.A. ALMEIDA, M.G. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista de biologia e farmácia**, v.10, n.1, 2014.

SILVA, L. M.; Atividade gastroprotetora e efeito sobre a função motora gástrica de ratas das folhas de *Arctium lappa* L. (Bardana): um estudo sob condições normais e aumentadas de glicemia. **(Tese)** Doutorado em Farmacologia - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014

SILVA, L. P.; ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MININEL, F. J.; SANTOS, L. C.; DELELLA, F. K.; FELISBINO, S. L.; ROCHA, L. R. M.; RAMOS, M. A. S.; BAUAB, T. M.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Terminalia catappa L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-Helicobacter pylori and antiulceration in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015.

SILVA-LUZ, C.L.; & PIRANI, J.R. Anacardiaceae. In R.C. Forzza et al. (org.) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 599-602, 2010.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R..S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n o 3, p. 669-682, 2010.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Constituintes micromoleculares de Plantas do Nordeste com Potencial Farmacológico: com dados de RMN 13 C. Fortaleza: **Expressão Gráfica e Editora**, v. 1, p.213, 2009.

SIQUEIRA, E. M. S.; FÉLIX-SILVA J.; ARAÚJO, L. M. L.; FERNANDES, J. M.; CABRAL, B.; GOMES, J. A. S.; ROQUE, A. A.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; GIORDANI, R. B.; ZUCOLOTTI, S. M. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. **Biomedical Chromatography**, v.30, p. 1656–1665, 2016.

SISODIA, B.S.; NEGI, A.S.; DAROKAR, M.P.; DWIVEDI, U.N.; KHANUJA, S.P. Antiplasmodial activity of steroidalchalcones: evaluation of their effect on hemozoin synthesis and the new permeation pathway of Plasmodium falciparum-infected

erythrocyte membrane. **Chemical biology & Drug Design**, v. 79, n. 4, p. 610 – 615, 2012.

SOARES, S., MATEUS, N., DE FREITAS, V. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.3966–3972, 2012.

SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v.78, p. 393-9, 2012.

STRINGHETA, P. C. **Compostos Bioativos em Alimentos**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/biochatartigos/artigo.asp?id=50>. Acesso em 14/09/2016.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZKANG, L.; Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p. 2689–2696, 2011.

SZABO, S. Gastric cytoprotection is still relevant. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, n. 9, p. 124-132, 2014.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M.C; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, p. 382, 2003.

THE PLANT LIST. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em 16 de setembro de 2016.

TOMAINO, A.; CRISTANI, M.; CIMINO, F.; SPECIALE, A.; TROMBETTA, D.; BONINA, F.; SAIJA, A. In vitro protective effect of a Jacques grapes wine extract on UVB-induced skin damage. **Toxicology in Vitro**, 20, 1395–1402, 2006.

TOMAZZONI, M I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 308, 2008.

VIDIGAL, M.C.T.R.; MINIM, V.P.R.; CARVALHO, N.B.; MILAGRES, M.P; GONÇALVES, A.C.A. Effect of a Health Claim on Consumer Acceptance of Exotic

Brazilian Fruit Juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-Camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v.44, p.1988-1996, 2011.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

VOGEL, H, GONZALEZ, M, FAINI, F, RAZMILIC, I, RODRIGUEZ, J, SAN MARTIN, J, URBINA, F. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *haplopappus*-species known as bailahue'n. **Journal of Ethnopharmacology**. 2004.

VOKURKOVA, M., XU, S. E TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. **Future Cardiology**. v.3, p.53-63, 2007.

WANG, Z., HSU, C.; YIN, M. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**. v.112, p.914–918, 2009.

WONDRAK, G.T.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.5, p.215–237, 2006.

XING, Y.; CHEN, J.; WANG, J.; GAO, Y.; NIU, W.; ZHAO, M.; ZHU, H.; GUO, L.; LU, P.; WANG, S. J. The effects of allitridi and amiodarone on the conduction system and reverse use-dependence in the isolated hearts of rats with myocardial infarction. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p.674, 2012.

ZAGHLOOL, S. S.; SHEHATA, B. A.; ABO-SEIF A. A.; EL-LATIF, H. A. A. Comparison between the protective effects of famotidine, ginger and marshmallow on pyloric ligation-induced peptic ulcer in rats. **Bioequivalence & Bioavailability**. v. 7, n. 4, p. 170-178, 2015.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson (Torre), s/n
50721-400 - Recife - PE - Brasil
Telefone: (81) 3213-4000 Fax: (81) 3213-4001
E-mail: (81) 3213-4001
www.ufpe.br

Recife, 02 de maio de 2017.

Ofício nº 37/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.^a Maria Tereza dos Santos Correia

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.052951/2015-71

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo Fitoquímico e avaliação do potencial bioativo de *Spondias tuberosa* Arnuda (Anacardiaceae)" registrada com o nº 23076.052951/2015-71 sob a responsabilidade de Prof.^a Maria Tereza dos Santos Correia - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanas), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.090, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/04/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/04/2017 a 02/03/2018
Especie/Inoculação	Camundongos Mus musculus/Swiss
Nº de animais	84
Idade	30-35g/ 30-60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIRA)

Atenciosamente

Pedro V. L. L.
Prof. Dr. Pedro V. L. L.
Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE